

RAFAEL REIS DE REZENDE

**TUBULAVÍRUS: EVOLUÇÃO, TAXONOMIA E INTERAÇÃO COM SEU
HOSPEDEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Poliane Alfenas-Zerbini

Coorientadoras: Flávia de Oliveira Souza
Maria Cristina D. Vanetti

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R467t
2022
Rezende, Rafael Reis de, 1991-
Tubulavírus: evolução, taxonomia e interação com seu
hospedeiro / Rafael Reis de Rezende. – Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (182 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Poliane Alfenas Zerbini.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.247>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Tubulavírus. 2. *Ralstonia solanacearum*. 3. Biofilmes.
4. RNA. 5. Tubulavírus – Evolução. 6. Tubulavírus –
Classificação. I. Zerbini, Poliane Alfenas, 1977-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.24

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

RAFAEL REIS DE REZENDE

**TUBULAVÍRUS: EVOLUÇÃO, TAXONOMIA E INTERAÇÃO COM SEU
HOSPEDEIRO**

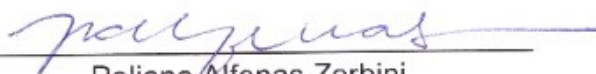
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 08 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



Rafael Reis de Rezende
Autor



Poliane Alfenas Zerbini
Orientadora

Pai, eu consegui! Agora eu sou "Doutor".

Nosso sonho se realizou!

Com saudade doendo, eu dedico ao senhor este trabalho.

Te amo!

AGRADECIMENTOS

Grato sou ao Eterno, pela sabedoria e pelo cuidado. Por me permitir contemplar e explorar Suas obras.

Grato sou a todos os Budas e Bodhisatvas por ensinarem a viver como água, achando o caminho entre as pedras.

Grato sou ao Felipe, meu marido e amigo por todo apoio, paciência e principalmente por aceitar essa minha jornada de fazer ciência no Brasil. Por ser meu porto seguro nas horas de tempestade. Por sempre me motivar a continuar correndo atrás do meu sonho. Por nunca deixar eu esquecer que forte sou.

Grato sou a meu pai, *in memoriam*, que com sangue sempre cuidou de mim para que eu corresse atrás do meu sonho.

Grato a sou a minha mãe, minha irmã Rafaela e ao meu padrasto Alison por todo carinho.

Grato sou aos amigos que conheci pela estrada, Andréa, Claudinéia, Débora Batista, Stefanni, Débora Sousa e Peter por todas as aventuras.

Grato sou a Professora Juliana, por despertar em mim a vocação pela ciência e pela microbiologia.

Grato sou a todos os Professores da minha graduação e pós-graduação, por todo esforço desempenhado na minha formação, por todo conhecimento transmitido.

Grato sou a Professora Poliane, minha “chefa”, amorosamente chamada como Poli. Você tem sido um exemplo de humano para mim. Sua energia e forma sabia de viver a vida, o caminho do meio. Já tentei por vezes mensurar o quanto me desenvolvi desde que estou sob sua orientação, mas nunca consegui. Diante de mim você abriu um mundo lindo a ser explorado, os vírus que infectam micro-organismo. Com todos meus neurônios e com todas minhas moléculas de dopamina, obrigado.

Tereza, agora respiro fundo e meu coração se aquece. Estive perdido, cai em um espaço escuro, profundo e frio e não conseguia achar a saída. Suas palavras me ensinaram a achar o caminho, me erguerem e me refizeram forte. Sem você essa jornada não teria esse final feliz. Muito obrigado!

Grato sou a Professora Denise, Professora Marisa, Professor Tiago, e ao Professor Murilo pelas melhores aulas que tive até hoje e por serem meus exemplos acadêmicos.

Grato sou a André pelo olhar naturalista e a Juliana, por darem os primeiros passos que me permitiram desenvolver esta tese.

Grato sou a Fernanda, carinhosamente chamada por mim como “Fernandinha”, por todo ensinamento, pela paciência e principalmente por sempre acreditar no meu potencial.

Grato sou a Flávia, carinhosamente chamada por mim como “Coxinha”, pelo companheirismo e principalmente por ser minha comparsa nas aventuras, digo de passagem que são muitas, mas que sempre rendem ótimos momentos de risadas.

Grato sou ao Túlio, carinhosamente o membro do “clube do bolinha” você chegou nos acréscimos do segundo tempo e foi essencial para conclusão de alguns capítulos desta tese. Obrigado por sempre topa a me ajudar a executar minhas ideias e principalmente por ensinar muito. Isso não tem valor.

Grato sou a Bruna, carinhosamente chamada por mim como “Brunex”, pelo companheirismo e contribuições, sua ajuda foi essencial para alguns capítulos desta tese.

Grato sou ao Sávio, por me ensinar a ensinar.

Grato sou a Nayara, nosso maior apoio, nosso socorro presente nos momentos de desespero. Muito obrigado por todo suporte e especialmente pela paciência com minha bagunça no laboratório.

Grato sou ao Laboratório de Microbiologia Industrial que evolui para o Laboratório de Vírus, a turma do fundão, o melhor laboratório do BIOAGRO. A todos que passaram pela nossa equipe desde 2015 até momento, muito obrigado por tudo.

Grato sou ao Laboratório de Ecologia e Evolução de Vírus, por sempre me socorrer com equipamentos, reagentes e ajuda intelectual. Grato sou especialmente ao Professor Murilo, João Paulo, Tarsi, Ayane e Anelise.

Grato sou ao Giarlã, por se juntar a mim nessa jornada e por me ensinar tanto sobre vesículas.

Grato sou ao Núcleo de Microscopia, pela disponibilização dos equipamentos em especial Karla por toda disposição em ajudar.

A todos que mesmo por instante estiveram comigo nessa jornada, muito obrigado.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização deste curso.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço aos órgãos de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradeço a empresa Suzano Papel e Celulose por acreditarem na ciência produzida pelo Laboratório de Vírus apoiando financeiramente os projetos desenvolvidos pela nossa equipe.

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

A vida é pra quem sabe viver
Procure aprender a arte
Pra quando apanhar não se abater
Ganhar e perder faz parte

Levante a cabeça, amigo, a vida não é tão ruim
Um dia a gente perde
Mas nem sempre o jogo é assim
Pra tudo tem um jeito
E se não teve jeito ainda não chegou ao fim

Mantenha a fé na crença
Se a ciência não curar
Pois se não tem remédio
Então remediado está
Já é um vencedor
Quem sabe a dor de uma derrota enfrentar
E a quem Deus prometeu, nunca faltou
Na hora certa o bom Deus dará

Deus é maior!
Maior é Deus, e quem tá com Ele
Nunca está só
O que seria do mundo sem Ele?

Chega de chorar
Você já sofreu demais, agora chega
Chega de achar que tudo se acabou
Pode a dor uma noite durar
Mas um novo dia sempre vai raiar
E quando menos esperar, clareou
Clareou, ô, ô, ô, ô...

Clareou, Serginho Meriti e Rodrigo Leitte
Interpretação, Vocal Livre



BIOGRAFIA

Sou biólogo, cientista, desbravador, um rebelde por todas as causas, aventureiro em teologia e budismo.

Nasci em uma cidade montesa no sul de Minas Gerais chamada Campo Belo. Sou filho de Rosimar Reis e Onofre Mizael de Rezende, irmão de Rafaela Reis Rezende.

Em 2010, ingressei na Universidade Federal de São João del-Rei no curso de Ciências Biológicas. Durante a graduação fiz parte do centro acadêmico, da coordenação do curso, principalmente de pesquisas, junto à Professora Juliana Pereira Lyon, onde defini minha trajetória como microbiologista.

No ano de 2015 fui aprovado para cursar o mestrado sob a orientação da Professora Poliane Alfenas Zerbini. Neste período fui membro da Comissão Coordenadora do Programa em Microbiologia Agrícola. Juntamente com os meus colegas participei da construção do Núcleo de Estudos em Microbiologia (NEMA), que tem como objetivo pesquisa, extensão e ampliação do ensino dos estudantes do programa. Em janeiro de 2017 concluí o mestrado sendo o título da minha dissertação “Caracterização molecular e filogenética de dois genomovírus associados a plantas silvestres no Brasil”.

Ingressei no doutorado em 2017, sob a orientação da Professora Poliane Alfenas-Zerbini. Durante a pandemia da COVID-19, junto a equipe do meu laboratório pude contribuir como voluntário na detecção por RT-PCR. No doutorado desenvolvi estudos de diversidade, evolução e interação com hospedeiro de vírus que infectam micro-organismos. Alguns destes trabalhos estão presentes nesta tese.

Continuo fazendo ciência e me esforçando para poder continuar, pois, ser um cientista é um ato resistência e resiliência.

RESUMO

REZENDE, Rafael Reis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Tubulavírus: Evolução, taxonomia e interação com seu hospedeiro.** Orientadora: Poliane Alfenas-Zerbini. Coorientadoras: Flávia de Oliveira Souza e Maria Cristina Dantas Vanetti.

Os tubulavírus são vírus filamentosos que infectam procariotos sem causar lise celular. O processo de infecção por esses vírus, em muitos casos, induz modificações no perfil fenotípico do hospedeiro. Alguns tubulavírus que infectam bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Ralstonia* e *Xanthomonas* geram modificações do perfil fenotípicos, em alguns casos aumento em outros redução da patogenicidade dessas bactérias. A biologia e a aplicação biotecnológica dos tubulavírus têm sido amplamente exploradas, mas estudos sobre a interação com hospedeiros e evolução deste grupo de vírus são escassos. As bactérias do complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS) são habitantes naturais do solo capazes de infectar e matar plantas. Estas bactérias migram do solo para o xilema através das raízes da planta, onde desenvolvem um denso biofilme que interrompe o fluxo do xilema, causando a morte das plantas. *Ralstonia solanacearum* inovirus Brazil 1 (RSIBR1) é um tubulavírus que infecta a bactéria *Ralstonia solanacearum* isolado UB2014, o qual é incapaz de causar morte em plantas de tomates. Para determinar se há relação entre a ausência de patogenicidade da *R. solanacearum* e a infecção pelo RSIBR1, o isolado *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000 agressivo foi infectado com o RSIBR1. Após a infecção o isolado *R. pseudosolanacearum* perdeu a capacidade de causar em morte de plantas de tomate, porém foi capaz de colonizar as plantas ao longo do tempo. Portanto, este trabalho teve como objetivo ampliar o entendimento da interação tubulavírus-*Ralstonia*, bem como estudar a evolução dos tubulavírus e propor um sistema para sua classificação taxonômica. Observamos que a evolução dos tubulavírus é principalmente impulsionada pelos hospedeiros e que a reconstrução filogenética a partir de genomas completos dos tubulavírus pode ser uma ferramenta adequada para a classificação desse grupo de vírus, que permite associar sua história evolutiva com suas características biológicas. Estudo de formação de biofilme *in vitro* mostrou que a infecção pelo RSIBR1 induz um aumento na produção de biofilme pela bactéria *Ralstonia pseudosolanacearum*; modula a produção de biofilme em diferentes condições como a disponibilidade ou ausência de

glicose e nutrientes; induz a perda da motilidade do tipo *swimming*, e reduz da motilidade do tipo *twitching*. Além disso, a infecção pelo RSIBR1 altera a estrutura do biofilme da bactéria *R. pseudosolanacearum* com estrutura semelhante a tapete para um biofilme com estruturas com estruturas esféricas. Além disso, a infecção por RSIBR1 leva a uma redução na produção das vesículas externas, afeta a quantidade de DNA e proteínas nestas vesículas. Por fim, também detectamos que o RSIBR1 expressa dois RNAs pequenos. Em conjunto, esses fatores podem estar envolvidos na conversão fenotípica das bactérias do CERS.

Palavras-chave: Tubulavírus. Complexo de espécie *Ralstonia solanacearum*. Biofilme. Vesículas extracelulares. Pequenos RNAs regulatórios. Evolução dos tubulavírus. Taxonomia de tubulavírus.

ABSTRACT

REZENDE, Rafael Reis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Tubulaviruses: Evolution, taxonomy and interaction with host.** Adviser: Poliane Alfenas-Zerbini. Co-advisers: Flávia de Oliveira Souza and Maria Cristina Dantas Vanetti.

Tubulaviruses are filamentous viruses that infect prokaryotes without causing cell lysis. The infection process by these viruses often induces changes in the phenotypic profile of the host. Some tubulaviruses that infect phytopathogenic bacteria of the genera *Ralstonia* and *Xanthomonas* generate modifications of the phenotypic profile, in some cases increasing and in others reducing the pathogenicity of these bacteria. The biology and biotechnological application of tubulaviruses have been widely explored, but studies on host interaction and evolution of this group of viruses are scarce. Bacteria of the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) are natural soil inhabitants capable of infecting and killing plants. These bacteria migrate from the soil into the xylem through the plant roots, where they develop a dense biofilm that interrupts the flow in the xylem, causing plant death. *Ralstonia solanacearum* inovirus Brazil 1 (RSIBR1) is a tubulavirus infecting bacterium *Ralstonia solanacearum* isolate UB2014, which is unable to cause death in tomato plants. To determine if there is a relationship between the lack of pathogenicity of *R. solanacearum* and infection with RSIBR1, the aggressive *Ralstonia pseudosolanacearum* isolate GMI1000 was infected with RSIBR1. After infection, the isolate *R. pseudosolanacearum* lost the ability to cause in death of tomato plants but was able to colonize the plants over time. Therefore, this work aimed to increase the understanding of the tubulavirus-*Ralstonia* interaction, as well as to study the evolution of tubulaviruses and propose a system for their taxonomic classification. We observed that the evolution of tubulaviruses is mainly driven by the hosts and that phylogenetic reconstruction from complete tubulavirus genomes may be a suitable tool for the classification of this group of viruses, which allows associating their evolutionary history with their biological characteristics. *In vitro* biofilm formation study showed that RSIBR1 infection induces an increase in biofilm production by *Ralstonia pseudosolanacearum* bacteria; modulates biofilm production under different conditions such as the availability or absence of glucose and nutrients; induces loss of swimming-type motility and reduces twitching-type motility. In addition, RSIBR1 infection changes the biofilm structure of *R. pseudosolanacearum* bacteria

with a mat-like structure to a biofilm with spherical structures. Furthermore, RSIBR1 infection leads to a reduction in the production of the outer vesicles and affects the amount of DNA and proteins in these vesicles. Finally, we also detected that RSIBR1 expresses two small RNAs. Taken together, these factors may be involved in the phenotypic changes of the RSSC.

Keywords: Tubulaviruses. *Ralstonia solanacearum* species complex. Biofilm. Extracellular vesicles. Small RNAs. Evolution of tubulaviruses. Tubulavirus taxonomy.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 1. <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> INFECTADA COM O TUBULAVÍRUS RSIBR1 EXIBE ALTERAÇÕES NO PERFIL DE FORMAÇÃO DO BIOFILME.	26
RESUMO	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
Micro-organismos e condições de crescimento.....	31
Avaliação <i>in vitro</i> do perfil de formação de biofilme.....	31
Avaliação da motilidade do tipo <i>swimming</i> e <i>twitching</i>	32
Avaliação dos componentes presentes no EPS	33
Avaliação da estrutura do biofilme por microscopia confocal de varredura a laser	33
Análises estatísticas	34
RESULTADOS.....	35
RpsGMI-TI apresentam aumento na formação de biofilme aderente	35
RpsGMI-TI apresenta alteração na formação do biofilme aderente em diferentes concentrações de glicose	35
Proteínas e eDNA são componentes principais do biofilme aderente formado pela RpsGMI-TI	36
A RpsGMI-TI apresenta alterações e redução da motilidade	36
A RpsGMI-TI apresenta modificações do perfil do biofilme aderente ao longo do tempo.....	37
O biofilme formado pela RpsGMI-TI apresenta uma estrutura distinta da RpsGMI	38
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	43
AGRADECIMENTOS	43
REFERÊNCIAS.....	44
LEGENDAS DAS FIGURAS	47
FIGURAS	49

CAPÍTULO 2. *Ralstonia pseudosolanacearum* INFECTADA COM O TUBULAVÍRUS RSIBR1 EXIBE ALTERAÇÕES NA PRODUÇÃO E NA COMPOSIÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....58

RESUMO	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS.....	63
Microrganismos e condições de crescimento	63
Isolamento das VEs.....	63
Microscopia eletrônica de transmissão e determinação do tamanho das VEs	63
Quantificação das VEs por citometria de fluxo	63
Quantificação de proteína e DNA carregadas pelas VEs	64
Análise estatística.....	64
RESULTADOS.....	65
VEs de RpsGMI, RpsGMI-TI e RsUB	65
Após a infecção, as VEs produzidas pela RpsGMI apresentam um aumento de DNA e proteína carregadas pelas vesículas.....	65
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO	68
AGRADECIMENTOS	68
REFERÊNCIAS.....	69
LEGENDAS DAS FIGURAS	71
FIGURAS	72

CAPÍTULO 3. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEQUENOS RNAS EXPRESSOS POR UM TUBULAVÍRUS INFECTANDO *Ralstonia solanacearum*.

RESUMO	78
INTRODUÇÃO	79
MATERIAL E MÉTODOS.....	81
Microrganismos e condições de crescimento	81
Identificação e classificação de sRNAs <i>in silico</i>	81
Detecção <i>in vitro</i> dos sRNAs	81

RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
Predição <i>in silico</i> e detecção <i>in vitro</i> dos sRNAs expressos pelo RSIBR1	83
Caracterização dos sRNAINOs	83
REFERÊNCIAS.....	85
LEGENDAS DAS FIGURAS	87
FIGURAS	88
TABELAS.....	93

CAPÍTULO 4. OS HOSPEDEIROS SÃO OS PRINCIPAIS IMPULSIONADORES DA EVOLUÇÃO DOS TUBULAVÍRUS..... 94

RESUMO	96
INTRODUÇÃO.....	97
MATERIAL E MÉTODOS.....	99
Conjunto de Dados.....	99
Análise evolutiva.....	99
Análise estatística.....	100
RESULTADOS.....	101
A filogenia do genoma completo dos tubulavírus revela a formação de seis clados correlacionados às características biológicas distintas	101
Eventos de recombinação detectados apenas entre tubulavírus de um mesmo clado evidenciam distanciamento evolutivo.....	104
Os clados de tubulavirus mostram diferenças na composição de genes ortólogos.....	104
Os hospedeiros são o principal fator que direciona a evolução dos tubulavírus	105
DISCUSSÃO	108
AGRADECIMENTOS	111
REFERÊNCIAS.....	112
LEGENDAS DAS FIGURAS	116
FIGURAS	119
TABELAS.....	130

CAPÍTULO 5. RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA USANDO SEQUENCIAS DE GENOMA COMPLETO É UMA FERRAMENTA ÚTIL PARA A TAXONOMIA DE TUBULAVIRUS.....	159
INTRODUÇÃO	161
RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA USANDO GENOMAS COMPLETOS, UMA FERRAMENTA IDEAL PARA CLASSIFICAÇÃO DOS TUBULAVIRUS	162
PASSO A PASSO PARA CLASSIFICAÇÃO DOS TUBULAVIRUS	164
REVISÃO TAXONÔMICA DOS VÍRUS PERTENCENTES A CLASSE TUBULAVIRALES.....	165
Nova família <i>Rexviridae</i>	166
Reorganização da família <i>Inoviridae</i>	166
Novo gênero <i>Infulavirus</i>	166
Novo gênero <i>Lineavirus</i>	166
Novos gêneros <i>Griphuvirus</i> , <i>Secretuvirus</i> , <i>Ignotusvirus</i> e <i>Mysterivirus</i>	166
Novo gênero <i>Plectrovirus</i>	166
Novo gênero <i>Tertilicivirus</i>	167
Novo gênero <i>Inovirus</i>	167
Novo gênero <i>Paulinovirus</i>	167
Novo gênero <i>Choleravirus</i>	167
CONCLUSÃO	167
AGRADECIMENTOS	167
REFERÊNCIAS.....	168
LEGENDAS DAS FIGURAS	171
FIGURAS	172
TABELAS.....	176
CONCLUSÕES GERAIS	182

INTRODUÇÃO GERAL

Os tubulavírus são vírus filamentosos com genomas de DNA fita simples circular que infectam procariotos pertencentes ao Domínio: *Monodnaviria*, Reino: *Loebvirae*, Filo: *Hofneiviricota*, Classe: *Faserviricetes* e Ordem: *Tubulavirales*. Os tubulavírus são divididos em três Famílias; *Inoviridae*, *Plectroviridae* e *Paulinoviridae*. Análises de mais de 50 mil genomas de procariotos e mais de 6 mil metagenomas revelaram que os tubulavírus estão presentes em todos microbiomas estudados de diversos organismos, em diversos biomas no planeta, infectando bactérias e arqueias (Roux *et al.*, 2019). Durante a infecção, esses vírus podem integrar seu genoma no cromossomo do hospedeiro ou permanecerem estáveis dentro da célula, na forma episomal. No processo de montagem das partículas virais, o DNA genômico viral é transferido para fora da célula por um complexo de proteínas virais dependente de ATP. Durante a passagem pela membrana e parede celular, concomitantemente as proteínas capsidiais vão sendo associadas ao DNA formando assim a partícula viral. Desta forma a partícula viral é exportada para ambiente extracelular sem gerar lise. Desta forma, esse mecanismo de montagem e transporte da partícula através da membrana e da parede celular resulta em uma infecção crônica (Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Hay & Lithgow, 2019; Roux *et al.*, 2019). Em muitos casos os tubulavírus mediam modificações na célula hospedeira resultando em várias alterações fenotípicas. Um clássico exemplo são os tubulavírus que infectam *Vibrio cholerae*, os quais conferem patogenicidade para essas bactérias por conterem os genes *ctxA* e *ctxB* responsáveis por causarem a doença cólera (Waldor & Mekalanos, 1996; Choi *et al.*, 2010; Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Hay & Lithgow, 2019). A biologia e aplicação biotecnológica dos tubulavírus têm sido amplamente exploradas, contudo, estudos de evolução, taxonomia e interação com o hospedeiro são escassos (Rakonjac *et al.*, 2011, 2017; Mai-Prochnow *et al.*, 2015).

Bactérias do complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS) — composto pelas espécies *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia pseudosolanacearum* e *Ralstonia syzygii* — são os agentes causadores da doença murcha bacteriana (MB), que no Brasil acomete culturas como a batata, tomate, pimenta, berinjela, tabaco, jiló, banana, eucalipto e mamona (Álvarez *et al.*, 2010a; Genin & Denny, 2012; Morais *et al.*, 2015b). A MB é conhecida desde o início do século XVII, mas a descoberta das bactérias do CERS como agente causador da MB ocorreu em 1896 por Smith e após

várias mudanças taxonômicas, em 1996 foi criado o gênero *Ralstonia* (Yabuuchi *et al.*, 1990, 1995; Safni *et al.*, 2014).

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em 1922 no estado do Rio Grande do Sul em tabaco e batata. De acordo com os relatos, a MB inicialmente foi disseminada através do cultivo através batata. Atualmente, no Brasil a MB tem sido um grande problema para culturas de tomate, batata, banana e eucalipto. Nas regiões central e sul do Brasil a MB é a principal doença que ocorre em plantações de tomate. Interessantemente, a MB acomete cultivos de banana nas regiões norte e nordeste, não ocorrendo no Acre. As ocorrências em cultivos de eucalipto têm se mantido restritas às áreas quentes e úmidas, porém surtos em outras áreas têm aumentado nos últimos anos (Morais *et al.*, 2015a; Freitas *et al.*, 2020, 2021a).

Os principais fatores de virulência de bactérias do CERS são a capacidade de formar biofilme, motilidade via flagelo (*swimming*) e via pili (*twitching*) e a presença dos sistemas de secreção II e III (Genin & Denny, 2012; Lowe-Power *et al.*, 2018; Corral *et al.*, 2020). A motilidade de bactérias do CERS, tanto via flagelo, quanto via pili contribui para a virulência, porém atuam em momentos diferentes do ciclo de vida da bactéria. A motilidade via flagelo está associada com o sucesso da bactéria em infectar e colonizar a planta nos estágios iniciais da doença. Já o movimento via pili está associado à adesão da bactéria no xilema e em outros tecidos da planta. Os sistemas de secreção II e III estão envolvidos na liberação de vários efetores essenciais tanto para o sucesso da infecção, como para colonização e o estabelecimento da MB (Álvarez *et al.*, 2010b; Genin & Denny, 2012; Meng, 2013). A formação do biofilme confere proteção para a bactéria contra a ação de antimicrobianos produzidos pelas plantas e a formação do biofilme no interior do xilema, interrompe o fluxo do xilema, conseqüentemente gerando a murcha da planta (Álvarez *et al.*, 2010a; Lowe-Power *et al.*, 2018). Um fato notável das bactérias do CERS é que nem todos os isolados causam a MB, ou seja, apresentam uma variação de agressividade. Os isolados menos agressivos, provavelmente, não interrompem o fluxo do xilema com a formação do biofilme. (Álvarez *et al.*, 2010b; Freitas *et al.*, 2021b). No entanto, os mecanismos moleculares desta doença precisam ser aprofundados para o desenvolvimento de formas de controle efetivas da MB.

Diversos tubulavírus que infectam CERS já foram caracterizados e são frequentemente associados com o aumento ou redução da patogenicidade da bactéria hospedeira (Askora & Yamada, 2015; Mai-Prochnow *et al.*, 2015). Por exemplo, o fago

RSS1 aumenta a virulência da *R. solanacearum*. Nesse exemplo, a infecção viral aumenta a motilidade da bactéria, ativa a expressão do gene *pchA* — regulador transcricional global dos mecanismos de patogenicidade — e aumenta a densidade da população bacteriana (Yamada *et al.*, 2007; Addy *et al.*, 2012a). Por outro lado, o fago Φ RSM reduz a patogenicidade da *R. solanacearum*. Nesse caso, a infecção viral reduz a expressão de vários genes relacionados à patogenicidade, ocasionando redução da motilidade e da produção de proteínas do pili (Addy *et al.*, 2012b). Poucos estudos avaliam os mecanismos usados pelos tubulavírus que levam a redução da patogenicidade das bactérias do CERS, em especial o efeito sobre a formação do biofilme, o qual é considerado o principal fator causal da morte pela MB. O tubulavírus, denominado *Ralstonia solanacearum* inovirus Brazil 1 (RSIBR1), espécie *Ralstonia virus RS551* (Família: *Inoviridae*, Gênero: *Habenivirus*) foi encontrado infectando *R. solanacearum* o isolado UB2014, o qual demonstrou ser incapaz de causar a murcha bacteriana. Com objetivo de investigar se a infecção pelo RSIBR1 tem relação com a ausência de patogenicidade da *R. solanacearum*, o isolado GMI1000 a bactéria *Ralstonia pseudosolanacearum* isolado GMI1000 — um patógeno agressivo — foi infectado com o RSIBR1. Após a infecção, *R. pseudosolanacearum* perdeu a capacidade de causar doença, apesar de ser capaz de colonizar a planta ao longo do tempo. Em conclusão, o RSIBR1 tem potencial para converter bactérias patogênicas do CERS em bactérias endofíticas (Almeida *et al.*, 2021).

Durante a infecção, bactérias fitopatogênicas gram-negativas usam distintos mecanismos para infectar o tecido vegetal. Dentre esses mecanismos está o uso de vesículas externas (*External vesicles* - VEs) (Katsir & Bahar, 2017). As VEs são produzidas de forma constitutiva pelas bactérias com objetivo de transportar componentes biológicos, como proteínas, DNA, dentre outros, chamados carga. As cargas são entregues nas células vegetal, atuando sobre mecanismos moleculares das células receptoras, como regulação gênica, favorecendo a infecção (Schwechheimer & Kuehn, 2015; Jan, 2017). Diferente das VEs de bactérias que infectam animais, a caracterização e o papel das VEs na interação planta-bactéria têm sido pouco explorados (Katsir & Bahar, 2017). Poucos trabalhos têm caracterizado e avaliado as VEs de bactérias fitopatogênicas, como, por exemplo *Xanthomas oryzae*, *Pseudomonas syringae* pv *tomato* e *Xylella fastiosa* e *Xanthomas campestris* pv *campestris*. No estudo de análise de proteoma de VEs de *X. campestris* pv *campestris* evidenciou que metade das proteínas cargas têm papel no envolvimento com

virulência (Sidhu *et al.*, 2008; Chowdhury & Jagannadham, 2013; Ionescu *et al.*, 2014; Mordukhovich & Bahar, 2017). Foi demonstrado também que as VEs de *X. campestris* pv *campestris* são reconhecidas por plantas de *Arabidopsis thaliana* induzindo seu sistema imune (Bahar *et al.*, 2016). Dado que os tubulavírus forma na membrana plasmática, no peptidoglicano e membrana externa um sistema extrusão de partículas virais, buscamos caracterizar a produção de VEs de *R. pseudosolacarum* e avaliar o efeito da infecção viral do tubulavírus RSIBR1 na produção das VEs.

RNAs pequenos não-codificante (*small RNAs* - sRNAs) são elementos ubíquos atuando na regulação da expressão gênica formando redes complexas em bactérias (Pichon & Felden, 2008; Repoila & Darfeuille, 2009; Dutta & Srivastava, 2018). Pequenos RNAs virais produzidos por vírus que infectam eucariotos têm sido bem estudados e caracterizados (Zeng *et al.*, 2019). Por exemplo, o vírus Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) expressa um pequeno RNA não-codificante com habilidade de controlar genes do hospedeiro indicando a degradação dos RNA mensageiros (Pawlica *et al.*, 2021). No entanto, sRNAs produzidos por fagos são poucos explorados, principalmente quando comparado aos estudos dos sRNAs expressos por bactérias (Altuvia *et al.*, 2018; Bloch *et al.*, 2021). As modificações fenotípicas geradas por alguns tubulavírus provavelmente requerem regulação da expressão gênica do hospedeiro. Dado que sRNAs apresentam função na regulação da expressão gênica, é possível hipotetizar que os tubulavírus possam expressar sRNAs com objetivos de modular a expressão gênica dos hospedeiros resultando nas alterações fenotípicas. Contudo, até momento não há estudo demonstrando a expressão de sRNAs por tubulavírus.

Em relação a aplicação biotecnológicas, muitos estudos têm explorados os tubulavírus, contudo poucos estudos têm investigado e elucidado a evolução desse grupo viral (Hay & Lithgow, 2019). Por exemplo, um estudo de tubulavírus que infectam bactérias do gênero *Ralstonia*, mostraram esses vírus se separam em duas linhagens evolutivas: a linhagem RSM que aumenta da patogenicidade dos seus hospedeiros; e a linhagem RSS que reduzem a patogenicidade de seus hospedeiros. (Askora & Yamada, 2015; Almeida *et al.*, 2021). Reconstruções filogenéticas usando os genes pVIII (*major coat protein*) e o gene pl (*Zot protein*) de tubulavírus que infectam *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp., *Ralstonia* spp., *Stenotrophomonas* spp., enterobactérias e *Propionibacterium freudenreichii*, sugerem a existência de uma conexão entre os hospedeiros e os clados formados (Mai-

Prochnow *et al.*, 2015). De modo semelhante, uma análise de agrupamento de tubulavírus baseada em conteúdo genético compartilhado com mais de 10.000 sequências obtidas a partir de metagenomas e genomas de procariotos revelou a formação de grupos também relacionados aos hospedeiros (Roux *et al.*, 2019).

O presente trabalho teve como objetivo aprofundar o entendimento do efeito da infecção do tubulavírus RSIBR1 na formação do biofilme e na produção de VEs da bactéria *Ralstonia pseudosolanacearum* isolado GMI1000. Bem como, procurar detectar a expressão de sRNAs pelo tubulavírus RSIBR1, os quais podem estar envolvidos na interação com hospedeiro. Por fim, buscamos neste trabalho, elucidar a evolução dos tubulavírus e as principais forças evolutivas que atuam nesse grupo e propor um método taxonômico para esse grupo viral.

REFERÊNCIAS

- Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T, 2012a. The Filamentous Phage ϕ RSS1 Enhances Virulence of Phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on Tomato. *Phytopathology* **102**, 244–251.
- Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T, 2012b. Loss of Virulence of the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* Through Infection by ϕ RSM Filamentous Phages. *Phytopathology* **102**, 469–477.
- Almeida JCF, da Silva Xavier A, Cascardo R de S *et al.*, 2021. Genomic and Biological Characterization of *Ralstonia solanacearum* Inovirus Brazil 1, an Inovirus that Alters the Pathogenicity of the Phytopathogen *Ralstonia pseudosolanacearum*. *Microbial Ecology*.
- Altuvia S, Storz G, Papenfort K, 2018. Cross-Regulation between Bacteria and Phages at a Posttranscriptional Level. *Regulating with RNA in Bacteria and Archaea* **6**, 499–514.
- Álvarez B, Biosca EG, López MM, 2010a. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 267–279.
- Álvarez B, Biosca EG, López MM, 2010b. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen.
- Askora A, Yamada T, 2015. Two different evolutionary lines of filamentous phages in *Ralstonia solanacearum*: their effects on bacterial virulence. *Frontiers in Genetics* **6**, 1–6.
- Bahar O, Mordukhovich G, Luu DD *et al.*, 2016. Bacterial Outer Membrane Vesicles Induce Plant Immune Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **29**, 374–384.
- Bloch S, Lewandowska N, Węgrzyn G, Nejman-Faleńczyk B, 2021. Bacteriophages as sources of small non-coding RNA molecules. *Plasmid* **113**.

- Choi S, Dunams D, Jiang SC, 2010. Transfer of cholera toxin genes from O1 to non-O1/O139 strains by vibriophages from California coastal waters. *Journal of Applied Microbiology* **108**, 1015–1022.
- Chowdhury C, Jagannadham MV, 2013. Virulence factors are released in association with outer membrane vesicles of *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 during normal growth. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1834**, 231–239.
- Corral J, Sebastià P, Coll NS, Barbé J, Aranda J, Valls M, 2020. Twitching and Swimming Motility Play a Role in *Ralstonia solanacearum* Pathogenicity. *mSphere* **5**, 1–16.
- Dutta T, Srivastava S, 2018. Small RNA-mediated regulation in bacteria: A growing palette of diverse mechanisms. *Gene* **656**, 60–72.
- Freitas RG, Hermenegildo PS, Cascardo RS *et al.*, 2021a. Validation and use of a qPCR protocol to quantify the spread of *Ralstonia solanacearum* in susceptible and resistant eucalypt plants. *Plant Pathology* **70**, 1708–1718.
- Freitas RG, Hermenegildo PS, Guimarães LMS, Zauza EAV, Badel JL, Alfenas AC, 2020. Detection and characterization of *Ralstonia pseudosolanacearum* infecting *Eucalyptus* sp. in Brazil. *Forest Pathology* **50**, e12593.
- Freitas RG, Hermenegildo PS, Guimarães LMS, Zauza EAV, Badel JL, Alfenas AC, 2021b. Molecular characterization and aggressiveness of the *Ralstonia solanacearum* species complex from *Eucalyptus* spp. in Brazil. *Forest Pathology* **51**, e12704.
- Genin S, Denny TP, 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 67–89.
- Hay ID, Lithgow T, 2019. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO reports* **20**.
- Ionescu M, Zaini PA, Baccari C, Tran S, Da Silva AM, Lindow SE, 2014. *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E3910–E3918.

- Katsir L, Bahar O, 2017. Bacterial outer membrane vesicles at the plant–pathogen interface. *PLoS Pathogens* **13**.
- Lowe-Power TM, Khokhani D, Allen C, 2018. How *Ralstonia solanacearum* Exploits and Thrives in the Flowing Plant Xylem Environment. *Trends in Microbiology* **26**, 929–942.
- Mai-Prochnow A, Hui JGK, Kjelleberg S, Rakonjac J, McDougald D, Rice SA, 2015. ‘Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host’ (M Smith, Ed.). *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 465–487.
- Meng F, 2013. *Ralstonia Solanacearum* Species Complex and Bacterial Wilt Disease. *Journal of Bacteriology & Parasitology* **04**, 2–5.
- Morais TP, Lopes CA, Tebaldi ND, Luz JMQ, 2015a. Occurrence and diversity of *Ralstonia solanacearum* populations in Brazil. *Bioscience Journal* **31**, 1722–1737.
- Morais TP, Lopes CA, Tebaldi ND, Luz JMQ, 2015b. Occurrence and diversity of *Ralstonia solanacearum* populations in Brazil. *Bioscience Journal* **31**, 1722–1737.
- Mordukhovich G, Bahar O, 2017. Isolation of Outer Membrane Vesicles from Phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **7**, 5.
- Pawlica P, Yario TA, White S *et al.*, 2021. SARS-CoV-2 expresses a microRNA-like small RNA able to selectively repress host genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**, e2116668118.
- Pichon C, Felden B, 2008. Small RNA gene identification and mRNA target predictions in bacteria. *Bioinformatics* **24**, 2807–2813.
- Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M, 2011. Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. *Current Issues in Molecular Biology* **13**, 51–76.
- Rakonjac J, Russel M, Khanum S, Brooke SJ, Raji M, 2017. *Filamentous Phage: Structure and Biology*.
- Repoila F, Darfeuille F, 2009. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biology of the Cell* **101**, 117–131.

- Roux S, Krupovic M, Daly RA *et al.*, 2019. Cryptic inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes. *Nature Microbiology* **4**, 1895–1906.
- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U, 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. s.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 3087–3103.
- Sidhu VK, Vorhölter FJ, Niehaus K, Watt SA, 2008. Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiology* **8**, 1–16.
- Smith EF, 1896. A bacterial disease of tomato, eggplant, and Irish potato (*Bacterium solanacearum* nov. sp.). *Bull Div Veg Physiol Pathol U S Dep Agric* **12**, 1–28.
- Waldor MK, Mekalanos JJ, 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**, 1910–1913.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y, 1990. Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB: List No. 33. *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**, 212–212.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y, 1995. Transfer of Two Burkholderia and An Alcaligenes Species to Ralstonia Gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutro*. *Microbiology and Immunology* **39**, 897–904.
- Yamada T, Kawasaki T, Nagata S, Fujiwara A, Usami S, Fujie M, 2007. New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Microbiology* **153**, 2630–2639.
- Zeng J, Gupta VK, Jiang Y, Yang B, Gong L, Zhu H, 2019. Cross-Kingdom Small RNAs among Animals, Plants and Microbes. *Cells* **8**, 371.

CAPÍTULO 1

***RALSTONIA PSEUDOSOLANACEARUM* INFECTADA COM O TUBULAVÍRUS RSIBR1 EXIBE ALTERAÇÕES NO PERFIL DE FORMAÇÃO DO BIOFILME.**

Rezende R. R., Pereira B. M. M., Bruckner F. P, Almeida L. F., Maitan-Alfenas G. P., Vanetti M. C. D. and Alfenas-Zerbini, P. *Ralstonia pseudosolanacearum* infectada com o tubulavírus RSIBR1 exibe alterações no perfil de formação do biofilme. A ser submetido.

***Ralstonia pseudosolanacearum* infectada com o tubulavírus RSIBR1 apresenta alteração no perfil de formação do biofilme**

Rafael Reis de Rezende^a, Bruna Maria Magro Pereira ^a, Fernanda Prieto Bruckner^{ab}, Lucas Filipe Almeida^c, Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas^c, Maria Cristina Dantas Vanetti^a, and Poliane Alfenas-Zerbini^{a#}

^aDepartamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

^bDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Ibirité. Ibirité, MG 32412-190, Brazil

[#]Autor de correspondência: Poliane Alfenas-Zerbini; e-mail: palfenas@ufv.br

Palavras-chaves: Tubulavírus, *Ralstonia pseudosolanacearum*, biofilme.

RESUMO

Estudos têm revelados que bactérias do complexo de espécie *Ralstonia solanacearum* após infecção por alguns tubulavírus perdem a capacidade de causar doença em plantas. Por exemplo, o RSIBR1 é capaz de infectar a *R. pseudosolanacearum* que após a infecção perde a habilidade causar a morte de plantas de tomates. *In vitro*, foi observado que a *R. pseudosolanacearum* infectada pelo RSIBR1 apresenta uma maior formação de biofilme aderente comparada a bactéria não infectada. Além disso, a *R. pseudosolanacearum* infectada pelo RSIBR1 apresenta um perfil distinto de formação de biofilme em condições como a disponibilidade ou ausência de carboidratos (glicose) e nutrientes gerando respostas diferentes da bactéria não infectada. Os agregados celulares nas colônias da *R. pseudosolanacearum* infectada pelo RSIBR1 e a perda do fenótipo de motilidade do tipo *swimming* e redução da motilidade do tipo *twitching* são sinais para uma tendência de crescimento séssil. Por fim, a análise por microscopia confocal evidenciou que a *R. pseudosolanacearum* infectada pelo RSIBR1 forma um biofilme com uma estrutura distinta do biofilme formado pela bactéria não infectada. A partir dos resultados é possível hipotetizar que as alterações observadas *in vitro* podem estar relacionadas com a perda da habilidade de causar morte em plantas. Desta forma, novos estudos devem ser realizados para analisar se a ocorrência das alterações observadas *in vitro* no biofilme pelo tubulavírus RSIBR1 ocorrem também *in planta* afetando ou não o fluxo do xilema.

INTRODUÇÃO

Os tubulavírus são vírus com genoma de DNA fita simples circular que infectam procariotos de forma crônica, em outras palavras, não levam o hospedeiro à morte. Isso ocorre devido esses vírus serem capazes de liberarem suas partículas para fora da célula por um processo de extrusão similar aos sistemas de secreções tipo II e III de bactérias (Hay & Lithgow, 2019; Krupovic *et al.*, 2021). Além disso, as infecções por tubulavírus produzem alterações fenotípicas nos hospedeiros, como aumento ou perda de patogenicidade em bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Ralstonia* e *Xanthomonas* (Addy *et al.*, 2012a,b; Askora & Yamada, 2015; Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Hay & Lithgow, 2019; Silva *et al.*, 2019; Tasaka *et al.*, 2020).

O complexo de espécie *Ralstonia solanacearum* (CERS) é formado por três espécies de bactérias relacionadas, porém geneticamente distintas, pertencentes ao gênero *Ralstonia*: *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia pseudosolanacearum* e *Ralstonia syzygii*. Este complexo é o agente causador da murcha bacteriana que afeta diversas plantações de importância agrícola de diferentes famílias botânica, como *Solanaceae* (exemplo tomate) e *Myrtaceae* (exemplo eucalipto). As bactérias do CERS conseguem viver por longos períodos no solo e quando encontram um hospedeiro se ligam e reconhecem o tecido radicular das plantas. Utilizando a motilidade do tipo *twitching*, as bactérias migram dos tecidos radiculares até o canal do xilema onde usam a motilidade do tipo *swimming* para infectar os vasos do xilema. Em seguida, as bactérias do CERS formam um biofilme que interrompe o fluxo no xilema para os tecidos apicais da planta levando a planta a morte por dessecação.

Diversos tubulavírus que infectam bactérias do CERS já foram descritos e caracterizados e sendo frequentemente associados a alterações da patogenicidade da bactéria hospedeira (Mai-Prochnow *et al.*, 2015). Em alguns casos ocorre o aumento da patogenicidade da bactéria, e em outros uma redução (Askora & Yamada, 2015). Por exemplo, o tubulavírus Φ RSS1 aumenta a virulência da *R. solanacearum*. Neste exemplo, a bactéria infectada apresenta um aumento da motilidade; ativa a expressão do gene *pchA*, um dos reguladores globais de virulência em *Ralstonia* spp.; aumenta a densidade da população bacteriana (Kawasaki *et al.*, 2007; Addy *et al.*, 2012a). Já os fagos Φ Rs551 e Φ RSM reduzem a patogenicidade de *R. solanacearum*. Nesse caso, as bactérias infectadas apresentam uma redução da expressão de vários

genes relacionados à patogenicidade, e como resultado ocorre uma redução da motilidade e da produção de proteínas do pili (Addy *et al.*, 2012b; Ahmad *et al.*, 2017).

O biofilme é uma estrutura complexa utilizada por populações e/ou comunidades de micro-organismos permitindo um crescimento sésil e colaborativo. Além disso, é um dos principais estilos de vida utilizada por micro-organismos ocorrendo em diversos ambiente como solo, oceanos e em superfícies biológicas e abióticas. A produção e composição da matriz do biofilme, comumente denominada como substância polimérica extracelular (*extracellular polymeric substance* — EPS) é regulada por diversos fatores como disponibilidade ou ausência de nutrientes; tamanho populacional; presença de agentes antimicrobianos; dentre outros fatores (Flemming *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2018). Bactérias fitopatogênicas do gênero *Ralstonia* são notórias produtoras de biofilme em plantas. No xilema a produção do biofilme interrompe o fluxo de água nos vasos levando à murcha e consequentemente a morte da planta por dessecação, sendo essa característica da murcha dos tecidos apicais é a principal característica que nomeia a doença como murcha bacteriana (Lowe-Power *et al.*, 2018).

O tubulavírus *Ralstonia solanacearum* inovírus Brazil 1 (RSIBR1 — Classe: *Tubulavirales*, família: *Inoviridae*, Gênero: *Habenivirus*) foi identificado infectando a bactéria *R. solanacearum* isolado UB2014, a qual é incapaz de causar doença em plantas de tomate. O RSIBR1 foi transmitido para *R. pseudosolanacearum* isolado GMI1000, um fitopatógeno destrutivo capaz de matar plantas de tomate em cerca de sete dias após a infecção. Contudo, a *R. pseudosolanacearum* isolado GMI1000 infectada pelo tubulavírus RSIBR1 perdeu a capacidade gerar a murcha bacteriana, porém foi capaz de colonizar plantas de tomates ao longo do tempo (Almeida *et al.*, 2021).

Neste trabalho foi buscado avaliar *in vitro* o perfil de formação do biofilme da bactéria *R. pseudosolanacearum* isolado GMI1000 infectada pelo tubulavírus RSIBR1. Juntos, os resultados evidenciam que a *R. pseudosolanacearum* infectada com RSIBR1 apresenta alterações no perfil de formação e na estrutura do biofilme. Além disso, baseado nesses resultados é possível hipotetizar que essas alterações podem estar envolvidas na perda da capacidade de causar a murcha bacteriana.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos e condições de crescimento

Neste trabalho foram utilizadas a bactéria *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000 (RpsGMI) e a bactéria *R. pseudosolanacearum* infectada pelo tubulavírus *Ralstonia solanacearum* inovirus Brazil 1 (RpsGMI-TI, *Tubulavirus infected*). Todos os isolados foram cultivados e mantidos em meio CPG sólido (1% casoaminoácido, 10% peptona, 5% glicose, 1% extrato de levedura e 1,7 % ágar) a 28°C.

Avaliação *in vitro* do perfil de formação de biofilme

O perfil de formação do biofilme foi avaliado pelo teste vermelho congo, o qual determina o morfotipo do biofilme formado sendo realizado em triplicatas biológicas com três repetições técnicas. Para isso, o meio CPG foi acrescido de 0,8 g/L de vermelho congo (Kirmusaoğlu, 2019). Inóculos de cinco microlitros das culturas com OD₆₀₀ = 0,1 das bactérias RpsGMI e RpsGMI-TI foram inoculados em placas com CPG acrescido de vermelho congo. Após cinco dias de crescimento o perfil do morfotipo foi avaliado.

O perfil de formação do biofilme também foi avaliado pelo método cristal violeta em placas de 96 poços realizados em triplicatas biológicas com 10 repetições técnicas (STEPANOVIĆ *et al.*, 2007). As bactérias RpsGMI e RpsGMI-TI foram previamente crescidas em meio líquido CPG durante 24 horas a 28 °C sob agitação (200 RPM), ao final do período de incubação a OD₆₀₀ foi padronizada para 0,1 usando o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific). Em placas de 96 poços de poliestireno, em cada poço foi adicionado de 198 µL de meio líquido CPG e 2 µL de cultura das bactérias com OD₆₀₀ padronizadas. As placas de 96 poços foram incubadas a 28 °C por 24 horas sem agitação para a formação do biofilme. Após o período de incubação, o crescimento bacteriano foi determinado pela leitura da OD₆₀₀ usando o espectrofotômetro Multiskan SkyHigh Microplate (Thermo Scientific). A cultura líquida foi então removida de cada poço e o biofilme aderente foi lavado três vezes com PBS (8g de cloreto de sódio, 0,201 g de cloreto de potássio, 1,42 g de fosfato de sódio dibásico e 0,272 g de fosfato de potássio monobásico). Em seguida o biofilme foi corado com cristal violeta 1% (p/v, diluído em água deionizada) durante 30 minutos, seguido de três lavagens com PBS. O biofilme corado foi então solubilizado com etanol 95% e mensurado à OD₅₇₀ usando o espectrofotômetro

Multiskan SkyHigh Microplate (Thermo Scientific). A formação do biofilme aderente foi então determinada pela razão entre OD_{570}/OD_{600} (OD_{570} indicando a produção de biofilme; OD_{600} indicando o crescimento microbiano) utilizando espectrofotômetro Multiskan Sky (Thermo Scientific). Por fim, as bactérias foram classificadas quanto a formação de biofilme de acordo com escala proposta por Stepanović et al. (2007).

O teste de avaliação de formação de biofilme também realizado usando seiva do xilema como fonte de nutrientes em triplicas biológicas com cinco repetições técnicas. Para a obtenção da seiva do xilema, plantas de tomate foram crescidas durante 40 dias. Após esse período, os caules das plantas de tomates foram cortados em segmentos de 5 cm e a seiva do xilema foi extraída por centrifugação a $4.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C , seguido de esterilização por filtração usando filtro $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore Merck) (Metzner et al., 2010; Yang et al., 2022). Em cada poço da placa de 96 poços de poliestireno foram adicionados $198 \mu\text{L}$ de seiva de xilema e $2 \mu\text{L}$ de cultura dos isolados com $OD_{600} = 0,1$; em seguida as placas foram incubadas a 28°C por 24 horas sem agitação. A avaliação da formação do biofilme foi realizada usando o método cristal violeta como descrito anteriormente.

Avaliação da motilidade do tipo *swimming* e *twitching*

O ensaio de avaliação da motilidade do tipo *swimming* foi realizado em triplicatas biológicas com 10 repetições técnicas analisando o fenótipo típico de *swimming*: projeções do crescimento microbiano nas bordas das culturas em meios semissólidos 0,3 e 0,7% de ágar (p/v) (Corral et al., 2020). O fenótipo de motilidade nas bordas das colônias foi avaliado usando microscópio invertido Olympus IX70 com aumento de 40x.

O ensaio de avaliação da motilidade do tipo *twitching* foi avaliada em triplicatas medindo a locomoção da cultura pelo diâmetro da colônia em meio sólido (1,6% de ágar, p/v) rico (CPG) e pobre em nutriente (MM — 1,75 g de fosfato de potássio dibásico, 0,75 g de fosfato de potássio monobásico, 0,15 g de citrato de sódio, 0,25 g de sulfato de magnésio, e 1,25 g de sulfato de amônio, 2% glicerol p/v) (Addy et al., 2012a; Guttenplan & Kearns, 2013; Rossi et al., 2018; Corral et al., 2020).

Avaliação dos componentes presentes no EPS

Para avaliar se eDNA (*extracellular DNA*) e proteínas estão presente no EPS produzido pelas bactérias RpsGMI e RpsGMI-TI, foi realizado o teste de degradação do biofilme em triplicata biológicas com 10 repetições técnicas de acordo com Andre et al.(2019) com algumas modificações. Os testes de degradações utilizaram biofilme formado pelas bactérias em placas de 96 poços após 24 horas de crescimento a 28 °C sem agitação em meio CPG líquido. Para avaliar se eDNA é um componente presente no EPS, o biofilme formado foi então tratado com DNase I (PROMEGA — concentração no ensaio de 0,5 µg/L, 0,5 M Cloreto de magnésio). Já, para avaliar se proteína é um componente presente no EPS, o biofilme formado foi tratado com Proteinase K (PROMEGA — concentração no ensaio de 0,1 µg/L, 0,02 M Tris-HCL pH 7,5 e M 0,1 cloreto de sódio). Em seguida o biofilme foi analisado pelo método cristal violeta em placa de 96 poços como descrito anteriormente.

Avaliação da estrutura do biofilme por microscopia confocal de varredura a laser

Segmentos de poliestireno (1 cm x 1 cm) foram limpos com lavagens seguidas em etanol 70%, peróxido de hidrogênio 10%, etanol 100% e em seguida esterilizados por irradiação UV, 30 minutos cada lado do cupom. Seguido de tratamento com micro-ondas eletromagnéticas três vezes durante 5 minutos cada em aparelho de micro-ondas convencional (Rohrer & Bulard, 1985).

Os segmentos de poliestireno estéreis foram imersos em meio CPG seguido da adição de uma alíquota de 50 µL de suspensão bacteriana com OD₆₀₀ = 0,1 permitindo crescimento por 24 e 48 horas a 28 °C sem agitação em tubos com 5 mL de meio CPG líquido. Após o crescimento, os segmentos foram lavados com PBS e corados com uma mistura de SYTO 9 e iodeto de propídio (LIVE/DEAD™ — Thermo Fisher Scientific) por 15 minutos no escuro. O biofilme corado foi então lavado para remoção do excesso de corante.

Imagens dos biofilmes formados foram obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (LSM 510 META — Zeiss, Germany) com 20x de aumento. Para o corante SYTO9 foram usados 488nm de excitação e >550nm de emissão; e para o corante iodeto de propídio foram usados 555nm de excitação e >550nm de excitação. *Z-stacks* foi realizado para obtenção da estrutura 3D e da espessura dos biofilmes formados. Os planos (eixo y e x) do *Z-stack* foram obtidas a cada 1,05 µm (ao longo

do eixo Z) a partir da superfície do segmento de poliestireno (primeiro plano onde foram visualizadas as bactérias).

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados usando análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, considerando estaticamente significativos os resultados com $P < 0,05$. As análises foram feitas utilizando o programa R (R Core Team, 2021).

RESULTADOS

RpsGMI-TI apresentam aumento na formação de biofilme aderente

Primeiro, usando o teste ágar vermelho congo (*Congo red agar* — CRA), avaliamos o morfotipo biofilme formado pelas bactérias RpsGMI e RpsGMI-TI. A RpsGMI evidenciou um morfotipo não formador de biofilme (colônia brancas e/ou com tons claros de rosa). Em contrapartida, a RpsGMI-TI mostrou uma coloração típica de um morfotipo formador de biofilme (colônia com tons escuros de vermelho) (Figura 1A). O método CRA tem como princípio a coloração em vermelho das colônias produtoras de polissacarídeos, em especial a produção de celulose (Azeredo *et al.*, 2017). Deste modo, o teste CRA indicou que o biofilme produzido pela RpsGMI-TI pode apresentar diferenças na composição do EPS, maior quantidade de polissacarídeos, em relação ao isolado RpsGMI.

Ambos os isolados foram capazes de produzir biofilme aderente, sendo que RpsGMI-TI apresentou uma produção de biofilme aderente em torno de 50% maior ($P < 0,001$) que o RpsGMI (Figura 1B). Conforme a classificação de Stepanovic *et al.*, (2007) o isolado RpsGMI foi classificado como formador moderado de biofilme e o isolado RpsGMI-TI classificado como um forte formador de biofilme.

Dado que o conteúdo do xilema é rico em sais minerais e pobre em açúcares, e que a disponibilidade de carboidratos pode interferir na formação do biofilme, foi avaliada a formação de biofilme usando seiva de xilema como fonte de nutrientes. Semelhante ao resultado obtido utilizando meio de cultura rico para a formação do biofilme, o isolado RpsGMI-TI apresentou uma maior produção de biofilme em relação ao RpsGMI (Figura 1C).

Em associação, esses resultados indicam que a RpsGMI-TI apresenta um aumento na formação de biofilme aderente.

RpsGMI-TI apresenta alteração na formação do biofilme aderente em diferentes concentrações de glicose

A disponibilidade de carboidratos é um dos principais fatores que afetam a produção de biofilme, pois impactam diretamente a síntese de polissacarídeos que irão compor o EPS. Dado que a RpsGMI-TI apresentou maior formação de biofilme aderente tendo seiva do xilema como fonte de nutrientes (Figure 1C) foi avaliado se a

redução da disponibilidade de açúcar, neste caso a glicose, afeta a formação do biofilme aderente.

Como esperado, foi observado uma redução na formação do biofilme pela RpsGMI à medida que a concentração de glicose foi reduzida, (Figura 2A). Já para a RpsGMI-TI foi observado um comportamento distinto em relação à concentração de glicose, quanto menor foi a concentração de glicose maior foi a formação de biofilme (Figura 2A).

Esse resultado evidencia que a disponibilidade de carboidratos, neste caso glicose, afeta a formação de biofilme pela RpsGMI. Contudo, a RpsGMI-TI apresenta um perfil de resposta distinto ao aumento e redução de glicose na formação do biofilme.

Proteínas e eDNA são componentes principais do biofilme aderente formado pela RpsGMI-TI

O EPS é composto por três principais componentes, polissacarídeos, eDNA e proteínas. Então utilizamos o teste de degradação de biofilme para avaliar se proteínas e eDNA são componentes presentes no biofilme da RpsGMI e da RpsGMI-TI. Após o tratamento com a enzima proteinase K e com a enzima DNase I, não observamos nenhuma redução do biofilme produzido pela RpsGMI em relação ao biofilme não tratado. Ao contrário, foi possível observar uma redução de cerca de 50% ($P < 0,001$), em ambos os testes, no biofilme formado pela RpsGMI-TI em relação ao biofilme não tratado. Como resultado o teste de degradação revelou que proteínas e eDNA são componentes do EPS formado pelo isolado infectado (Figura 3).

A RpsGMI-TI apresenta alterações e redução da motilidade

Bactérias podem apresentar dois estilos de vida, planctônica (locomoção) ou sésil (produção de biofilme). Devido a estímulos externos, uma população e/ou comunidade bacteriana pode alternar entre esses estilos. A redução e alteração de motilidade em bactérias são indicativos de uma tendência para o crescimento com formação de biofilme (Rossi *et al.*, 2018). Portanto, foi avaliado se a bactéria RpsGMI-TI apresenta alguma alteração da sua motilidade em relação a RpsGMI.

Nas colônias da RpsGMI no meio de cultura com concentração de ágar 0,3% é possível observar a presença de projeções da cultura devido ao movimento das bactérias indicando a presença do movimento do tipo *swimmin* (Figura 4A). No meio de cultivo com 0,7% de ágar também foram observadas as projeções nas bordas das

colônias típicas do movimento do tipo *swimming*, com o aumento da concentração do meio, as projeções diminuíram e foi possível observar linhas de crescimento com pequenas projeções em camadas sobrepostas (Figura 4B, painel inferior). Já as colônias da RpsGMI-TI apresentaram bordas sem projeções. Apenas, no meio com 0,7% de ágar foi possível observar projeções bem suaves indicando que a RpsGMI-TI apresenta um fenótipo de motilidade do tipo *swimming*, porém reduzido (Figura 4A, painel inferior). Quando observamos as colônias, notamos diferença entre as colônias das bactérias (Figura 4B). As colônias da RpsGMI-TI apresentam forma arredonda com presença de agregados e uma aparência rugosa, gelatinosa e mais densa. Esse crescimento com produção de agregados é bem nítido em crescimento em meio líquido. Em contraste, a RpsGMI apresenta colônias amorfas, lisas e com aparência viscosa.

Também foi avaliado a motilidade do tipo *twitching* em meio sólido rico em nutriente durante cinco dias e em meio pobre em nutrientes após cinco dias de crescimento. Em meio rico em nutrientes, a RpsGMI apresentou uma maior locomoção até 72 horas. A partir de 96 horas foi possível observar que as bactérias não apresentaram diferença significativa quanto a locomoção (Figura 5A). Em meio pobre em nutriente é observado um resultado semelhante ao meio rico em nutrientes, após cinco de crescimento a RpsGMI apresentou uma maior motilidade do que a RpsGMI-TI (Figura 5B).

Juntos, os resultados mostram que em ambas as condições, meio rico e pobre em nutrientes, a RpsGMI-TI apresentou uma redução da motilidade quando comparada com a RpsGMI (Figura 5A e B).

A RpsGMI-TI apresenta modificações do perfil do biofilme aderente ao longo do tempo

O perfil do biofilme aderente ao longo do tempo das bactérias foi avaliado a cada 24 horas durante 120 horas em duas condições: com ou sem reposição de meio de cultivo a cada 24 horas.

Primeiro, foi avaliado o perfil do biofilme aderente ao longo do tempo na condição sem reposição de meio de cultivo. Em 24 horas foi observada a formação de biofilme aderente pela RpsGMI-TI, sendo que em 48 horas foi observado uma redução. A RpsGMI apresentou uma maior formação de biofilme aderente em 48 horas, contudo, a partir de 72 horas foi observado também uma redução, semelhante

ao perfil da RpsGMI-TI (Figura 6A). Após 72 horas, as bactérias mantiveram o biofilme aderente, no entanto, uma formação menor do que observado em 24 horas para RpsGMI-TI e em 48 horas para RpsGMI.

O biofilme formado pela RpsGMI apresenta o mesmo perfil ao longo do tempo na presença ou diminuição de nutrientes, em resumo maior formação em 48 horas com redução a partir de 72 horas (Figura 6B). Entretanto, a RpsGMI-TI manteve o biofilme formado na presença de nutriente ao longo do tempo, comportamento diferente do perfil na ausência de nutriente em que ocorre a redução do biofilme formado.

Em síntese, a RpsGMI apresenta o mesmo perfil ao longo do tempo do biofilme formado independente da disponibilidade de nutriente. Por outro lado, a RpsGMI-TI apresenta um perfil distinto do biofilme formado ao longo em relação a RpsGMI nas duas condições, com e sem disponibilidade de nutrientes.

O biofilme formado pela RpsGMI-TI apresenta uma estrutura distinta da RpsGMI

As estruturas dos biofilmes formados pela RpsGMI e pela RpsGMI-TI em segmentos de poliestireno foram analisadas por microscopia confocal em 24 e 48 horas, dado que foi observado que os isolados apresentam um perfil de formação de biofilme em tempos diferentes (Figura 6).

Em 24 horas após o início da formação do biofilme, a RpsGMI formou um biofilme denso e homogêneo com uma estrutura semelhante a “tapete” com regiões pouco denso, em outras palavras, é possível observar regiões sem formação de biofilme (regiões escuras, sem emissão de fluorescência) (Figura 7A e C). Já em 48 horas as regiões sem formação de biofilme foram reduzidas e o biofilme formado apresentou-se mais denso quando comparado com biofilme em 24 horas (7E e G). A maior produção do biofilme pela RpsGMI fica mais evidente em 48 horas quando analisamos a imagem 3D do biofilme (Figura 7G).

Os biofilmes formados pela RpsGMI-TI, em 24 e 48 horas, apresentam uma estrutura distinta da RpsGMI (Figura 7B e 7F). O biofilme da RpsGMI-TI apresentou uma estrutura complexa com formatos esféricos. Além disso, entre essas estruturas semelhantes “esferas” é possível observar conexões bem como espaços vazios. Um fato notável é a presença de maior coloração vermelha/amarelada no biofilme do isolado RpsGMI-TI do que no isolado RpsGMI. (Figura suplementar 1).

Para o biofilme formado pela RpsGMI e RpsGMI-TI em 24 e 48 horas foram obtidas imagens equivalentes aos planos (eixo x e z) a cada 1,05 μm a partir superfície (eixo z) (Figuras A, B, E e F; e Figura suplementar 2). Nos biofilmes formados em 24 horas conseguimos obter 17 imagens dos planos para biofilme da RpsGMI, já para a RpsGMI-TI foram obtidas 28 imagens. Baseando no número de imagens obtidas, hipotetizamos que esse fato pode ser indicativo de uma maior espessura do biofilme formado pela RpsGMI-TI, contudo mais estudos devem ser empregados para melhor evidenciar se os biofilmes formados pela RpsGMI e pela RpsGMI-TI apresentam profundidades diferentes. Em 48 horas após o início da produção, observamos um resultado contrário, a RpsGMI apresentou 23 planos e a RpsGMI-TI mostrou 17 planos. Notavelmente, esses resultados estão de acordo com o observado no padrão de produção de biofilme ao longo do tempo (Figura 6). Em 24 horas, a RpsGMI-TI apresentou maior produção de biofilme que o isolado RpsGMI. Contudo, em 48 horas observamos uma maior produção do biofilme pela RpsGMI quando comparado com biofilme formado pela RpsGMI-TI.

Em resumo, a análise de microscopia confocal revelou que a RpsGMI-TI forma um biofilme estruturalmente diferenciado da RpsGMI.

DISCUSSÃO

Dado que, na murcha bacteriana causada pela *Ralstonia* a produção de biofilme é o considerado o principal fator que interrompe o fluxo do xilema levando a planta à morte, na avaliação de produção de biofilme *in vitro*, nós esperávamos observar uma menor produção de biofilme pelo isolado RpsGMI-TI. Contudo, encontramos um resultado contrário, onde o isolado RpsGMI-TI mostrou uma maior produção de biofilme (Figura 1 e 2). A formação do biofilme permite a populações/comunidades bacterianas manterem a colonização de um nicho ecológico (Flemming *et al.*, 2016). Foi demonstrado a RpsGMI-TI coloniza planta de tomate e se mantém crescendo nos tecidos vegetais por até 21 dias pós inoculação sem levar a planta à morte (Almeida *et al.*, 2021). Sendo assim, a maior produção de biofilme se torna um mecanismo favorável para permitir o estabelecimento da população nos sistemas de vasos do xilema no processo de colonização.

Tubulavírus estabelecem infecções crônicas, em que as partículas virais são transportadas através da membrana e da parede celular sem causar lise do hospedeiro (Marvin *et al.*, 2014). Esse fato associado que observamos que a RpsGMI-TI apresenta uma maior coloração de vermelho nas microscopias de confocal, hipotetizamos que o acúmulo de proteínas e eDNA no EPS da bactéria RpsGMI-TI podem ser provenientes de partículas do tubulavírus RSIBR1 que estão se acumulando no EPS afetando sua composição e estrutura. (Figura 7). Já foi descrito que partículas virais podem se acumular no EPS, reforçando está hipótese (Bond *et al.*, 2020). No entanto, novas análises devem ser realizadas para melhor evidenciar esse possível acúmulo viral no EPS.

Ao comparar a motilidade da RpsGMI e da RpsGMI-TI, observamos que o tubulavírus induz uma redução da motilidade do tipo *swimming* e *twitching*, indicando assim uma tendência ao estilo de crescimento sésil, sendo compatível com a maior produção de biofilme. Nós hipotetizamos que a maior motilidade observada no isolado RpsGMI pode indicar que ele migre rapidamente e colonize os vasos do xilema com menor calibre, de modo que mesmo com a pouca formação de biofilme este já seja o suficiente para interromper o fluxo do xilema. Ao contrário, a RpsGMI-TI migraria lentamente, permanecendo assim nos vasos de maior calibre, de forma que a formação de biofilme não interrompe o fluxo no xilema.

Já foi observado que a bactéria *R. solanacearum* forma agregados nos espaços intercelulares nas folhas de tomate os quais formaram um biofilme maduro (Lowe-Power *et al.*, 2018). Da mesma forma observamos que a bactéria RpsGMI-TI crescendo em meio sólido ou líquido também ocorre a formação de agregados (Figura 6B). Já foi demonstrado que a formação desses agregados está associada com expressão de genes envolvidos na produção do pili tipo IV (Kang *et al.*, 2002). *Ralstonia solanacearum* mutantes para genes envolvidos na expressão pili tipo IV apresentam redução de agregados e redução da motilidade do tipo twitching e redução da formação do biofilme (Kang *et al.*, 2002; Corral *et al.*, 2020). Semelhantemente a RpsGMI-TI apresenta redução a motilidade tipo twitching, no entanto, apresenta a formação de agregados e maior formação de biofilme. A produção de agregados celulares nas colônias da RpsGMI-TI associada à perda do fenótipo de motilidade do tipo *swimming* e redução da motilidade do tipo *twitching* são indicativos de uma tendência a um estilo de vida sésil, diferente da RpsGMI a qual apresenta a motilidade do tipo *swimming* típica e uma maior motilidade do tipo *twitching* em relação ao isolado RpsGMI.

A formação de biofilme é um evento dinâmico, podendo haver também a despolimerização ou permanência. A modulação da formação do biofilme pelo tubulavírus fica clara quando analisamos a padrão de produção de biofilme ao longo do tempo em duas condições, com nutrientes limitados e com reposição de nutrientes ao longo do tempo (Figura 6). Os resultados indicam que independente da disponibilidade de nutriente o isolado RpsGMI tende a formar um biofilme seguido de uma redução, contudo *in vitro* o Tubulavírus modula esse comportamento de modo que a redução só ocorre na ausência de nutrientes, ou seja, existindo disponibilidade de nutrientes o Tubulavírus induz o isolado RpsGMI a manter o biofilme ao longo do tempo. Dado que a formação do biofilme pode ser o principal fator que leva ao interrompimento do xilema, hipotetizamos que alterações da composição ou até mesmo estruturais do biofilme afetam a padrão de transporte via xilema pelos elementos de vaso.

A RpsGMI apresenta um biofilme na forma de “tapete” ocorrendo produção por toda área e acima da superfície dos segmentos de polietileno. Hipotetizamos que essa estrutura pode acabar preenchendo todo um espaço tridimensional, como a luz dos vasos do xilema, não permitindo o fluxo no xilema. Sendo assim, esse fato poderia explicar a interrupção do fluxo de xilema. Já a RpsGMI-TI apresenta um biofilme com

produção de estruturas esféricas sob a superfície e na área acima dessa superfície formando caminhos que podem permitir a passagem de líquidos. Isso explicaria por que a RpsGMI-TI coloniza a planta, mas não leva à morte devido à interrupção do fluxo do xilema. Em resumo, o tubulavírus induz uma alteração estrutural do biofilme, isto é, o biofilme denso é convertido para um biofilme com estruturas esféricas apresentando passagens as quais podem possivelmente permitir o fluxo do xilema nos tubos clivados. Estudos adicionais devem ser realizados para mostrarem se as alterações aqui observadas *in vitro* ocorrem *in planta*.

CONCLUSÃO

In vitro foi observado que após a infecção com o tubulavírus a bactéria *R. pseudosolanacearum* apresenta alterações no seu perfil de formação de biofilme. Além disso, foi possível o biofilme formado pela *R. pseudosolanacearum* infectada pelo tubulavírus RSIBR1 apresenta uma estrutura distinta em relação à bactéria não infectada. Juntos, as alterações observadas *in vitro* no perfil de formação e na estrutura do biofilme da *R. pseudosolanacearum* após infecção com o tubulavírus RSIBR1 podem estar associados com perda da capacidade dessa bactéria causar a morte de plantas. Deste modo, novos estudos devem ser realizados para observar se alterações observadas *in vitro* ocorrem também *in planta*.

AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa pelo apoio na execução das análises de microscopia confocal.

Agradecemos, a FAPEMIG, CAPES, CNPq e Suzano Papel e Celulose pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T, 2012a. The Filamentous Phage ϕ RSS1 Enhances Virulence of Phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on Tomato. *Phytopathology* **102**, 244–251.
- Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T, 2012b. Loss of Virulence of the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* Through Infection by ϕ RSM Filamentous Phages. *Phytopathology* **102**, 469–477.
- Ahmad AA, Stulberg MJ, Huang Q, 2017. Prophage Rs551 and Its Repressor Gene orf14 Reduce Virulence and Increase Competitive Fitness of Its *Ralstonia solanacearum* Carrier Strain UW551. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1–10.
- Almeida JCF, da Silva Xavier A, Cascardo R de S *et al.*, 2021. Genomic and Biological Characterization of *Ralstonia solanacearum* Inovirus Brazil 1, an Inovirus that Alters the Pathogenicity of the Phytopathogen *Ralstonia pseudosolanacearum*. *Microbial Ecology*.
- Andre C, de Jesus Pimentel-Filho N, de Almeida Costa PM, Vanetti MCD, 2019. Changes in the composition and architecture of staphylococcal biofilm by nisin. *Brazilian Journal of Microbiology* **50**, 1083–1090.
- Askora A, Yamada T, 2015. Two different evolutionary lines of filamentous phages in *Ralstonia solanacearum*: their effects on bacterial virulence. *Frontiers in Genetics* **6**, 1–6.
- Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R *et al.*, 2017. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology* **43**, 313–351.
- Bond MC, Vidakovic L, Singh PK, Drescher K, Nadell CD, 2020. Matrix-trapped viruses can protect bacterial biofilms from invasion by colonizing cells. *bioRxiv*.
- Corral J, Sebastià P, Coll NS, Barbé J, Aranda J, Valls M, 2020. Twitching and Swimming Motility Play a Role in *Ralstonia solanacearum* Pathogenicity (GR Bowman, Ed.). *mSphere* **5**, 1–16.
- Flemming H, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S, 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 563–575.

- Guttenplan SB, Kearns DB, 2013. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiology Reviews* **37**, 849–871.
- Hay ID, Lithgow T, 2019. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO reports* **20**.
- Kang Y, Liu H, Genin S, Schell MA, Denny TP, 2002. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular Microbiology* **46**, 427–437.
- Kawasaki T, Nagata S, Fujiwara A *et al.*, 2007. Genomic Characterization of the Filamentous Integrative Bacteriophages RSS1 and RSM1, Which Infect *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **189**, 5792–5802.
- Kirmusaoğlu S, 2019. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. In: *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. IntechOpen,.
- Krupovic M, Turner D, Morozova V *et al.*, 2021. Bacterial Viruses Subcommittee and Archaeal Viruses Subcommittee of the ICTV: update of taxonomy changes in 2021. *Archives of Virology* **166**, 3239–3244.
- Lowe-Power TM, Khokhani D, Allen C, 2018. How *Ralstonia solanacearum* Exploits and Thrives in the Flowing Plant Xylem Environment. *Trends in Microbiology* **26**, 929–942.
- Mai-Prochnow A, Hui JGK, Kjelleberg S, Rakonjac J, McDougald D, Rice SA, 2015. ‘Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host’ (M Smith, Ed.). *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 465–487.
- Marvin DAA, Symmons MFF, Straus SKK, 2014. Structure and assembly of filamentous bacteriophages. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **114**, 80–122.
- Metzner R, Schneider HU, Breuer U, Thorpe MR, Schurr U, Schroeder WH, 2010. Tracing cationic nutrients from xylem into stem tissue of French bean by stable isotope tracers and cryo-secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiology* **152**, 1030–1043.
- R Core Team, 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing.

- Rohrer MD, Bulard RA, 1985. Microwave sterilization. *The Journal of the American Dental Association* **110**, 194–198.
- Rossi E, Paroni M, Landini P, 2018. Biofilm and motility in response to environmental and host-related signals in Gram negative opportunistic pathogens. *Journal of Applied Microbiology* **125**, 1587–1602.
- Silva FP da, Xavier A da S, Bruckner FP, de Rezende RR, Vidigal PMP, Alfenas-Zerbini P, 2019. Biological and molecular characterization of a bacteriophage infecting *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, isolated from brassica fields. *Archives of Virology* **164**, 1857–1862.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V *et al.*, 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* **115**, 891–899.
- STEPANOVIĆ S, VUKOVIĆ D, HOLA V *et al.*, 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **115**, 891–899.
- Tasaka Y, Kawasaki T, Yamada T, 2020. Filamentous Phages Affect Virulence of the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Biocommunication of Phages*, 221–237.
- Yang L, Wei Z, Valls M, Ding W, 2022. Metabolic Profiling of Resistant and Susceptible Tobaccos Response Incited by *Ralstonia pseudosolanacearum* Causing Bacterial Wilt. *Frontiers in Plant Science* **12**.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Avaliação da formação de biofilme em 24 horas de crescimento. (A) Teste de morfotipo do biofilme formado pelo método vermelho congo. (B) Avaliação da produção de biofilme pelo método cristal violeta em placa de 96 poços. (C) Avaliação da produção de biofilme pelo usando seiva de xilema de plantas de tomates como fonte de nutrientes. Os asteriscos indicam a diferença estatística ($P < 0,001$).

Figura 2. Avaliação da formação de biofilme com disponibilidade de glicose em diferentes concentrações. As letras indicam resultados estatisticamente iguais ($P > 0,05$).

Figura 3. Ensaio de degradação. Ensaio de degradação para avaliar a presença de eDNA e proteína no EPS. Os asteriscos indicam diferença estatística ($P < 0,001$).

Figura 4. Análise do fenótipo de motilidade do tipo *swimming* após cinco dias de crescimento. Em A, imagens de microscopia óptica (40x de ampliação) com detalhes das bordas das colônias em meio semissólido (0,3 e 0,7 % de ágar(p/v)). Em B, imagens das colônias dos isolados RpsGMI e RpsGMI-TI em meio semissólido 0,7 % de ágar (p/v).

Figura 5. Análise do fenótipo de motilidade do tipo *twitching*. A. Motilidade do tipo *twitching* avaliada em meio CPG sólido contendo 1,7 % ágar (p/v) durante 120 horas. B. Avaliação da motilidade tipo *twitching* em meio MM sólido 1,7 % ágar (w/v) pobre em nutriente após cinco dias de crescimento. Em ambos os casos, a motilidade do tipo *twitching* foram avaliadas pelo tamanho do diâmetro das colônias. Os asteriscos indicam diferença estatística ($P < 0,001$).

Figura 6. Avaliação da produção de biofilme ao longo do tempo. A. A formação de biofilme ao longo do tempo sem reposição de meio de cultivo. B. A avaliação da produção de biofilme ao longo do tempo com reposição de meio de cultivo. As letras indicam resultado iguais estatisticamente a cada hora ($P > 0,05$).

Figura 7. Análise da estrutura dos biofilmes por microscopia confocal com 20x de aumento. A estrutura do biofilme formado foi avaliada em dois tempos de formação, 24 horas (A-D) e 48 horas (E-H). Em A, B, E e F, os painéis principais mostram o plano XY dos biofilmes formados. Os painéis laterais em cada um dos planos principais representam a sobreposição dos painéis obtidos a cada 1,05 μm ao longo do eixo Z. Os valores indicam a obtida como a soma das distâncias dos planos. Por fim, em C, D, G e H são representações em 3D do biofilme formada a partir de planos dos biofilmes a cada 1,05 μm a partir da superfície.

Figura suplementar 1. Imagens de confocal em plano central dos biofilmes formado pela RpsGMI e pela RpsGMI-TI em 24 e 48 horas. Imagens em plano central dos biofilmes das bactérias RpsGMI e RpsGMI-TI formado durante a 24 horas e 48 horas corados com LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability (Thermo Fisher Scientific) composto pelos corantes SYTO 9 (indicador de células viáveis por fluorescência verde) e o iodeto de propídio (indicador de células não viáveis por fluorescência vermelha).

Figura suplementar 2. Z-stack dos biofilmes formados a cada 1,05 μm a partir da superfície.

FIGURAS

FIGURA 1

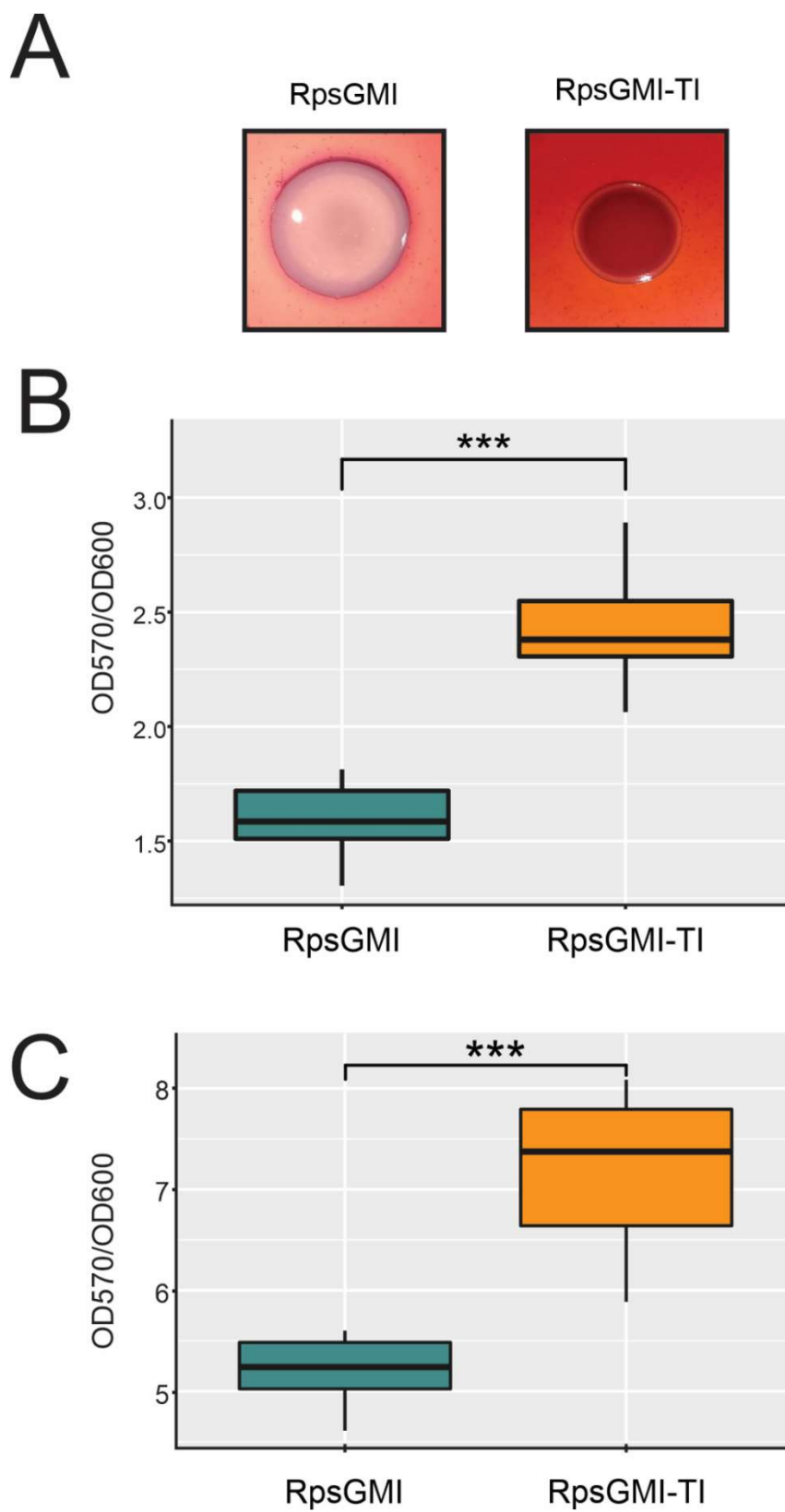


FIGURA 2

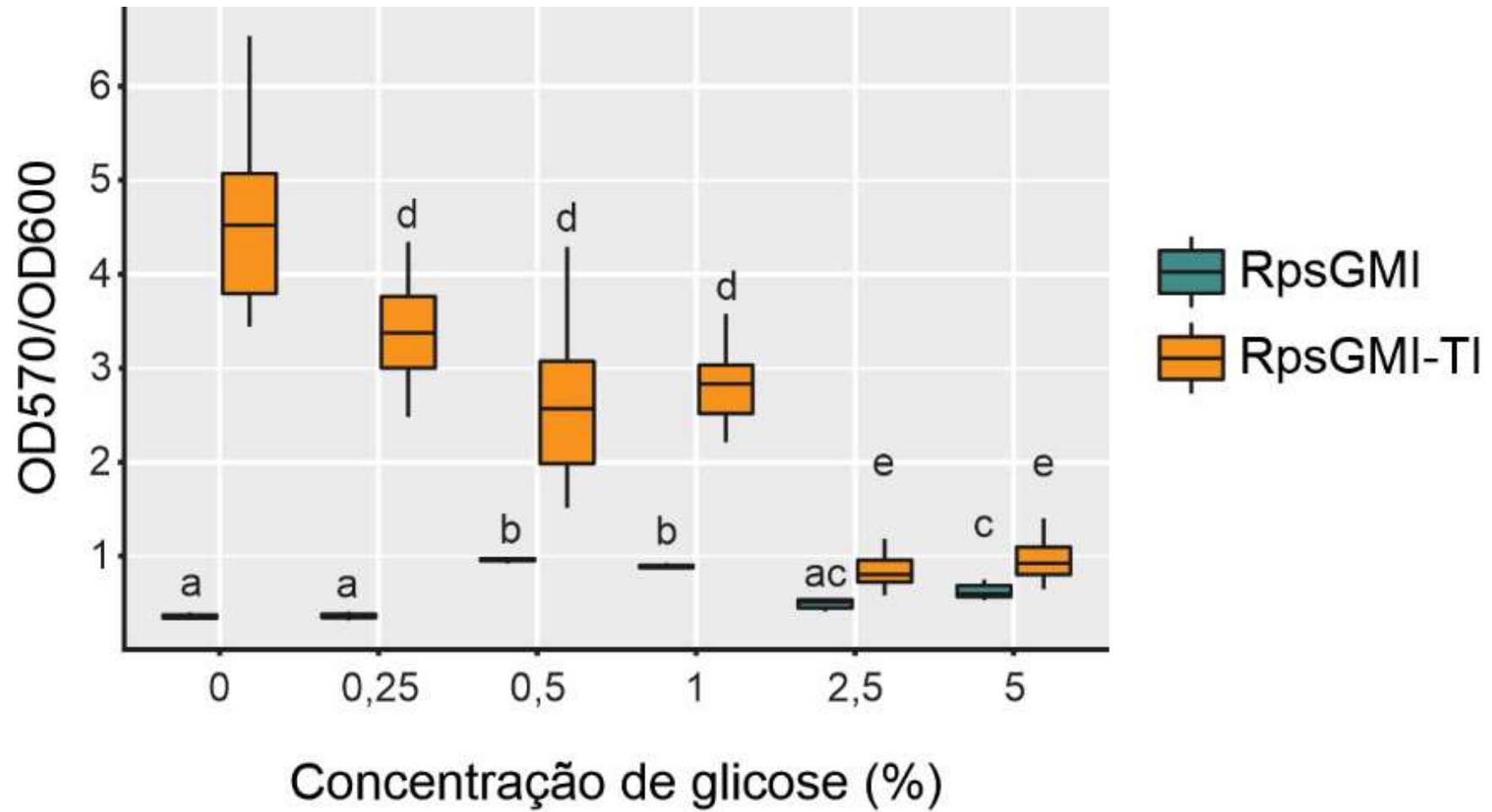


FIGURA 3

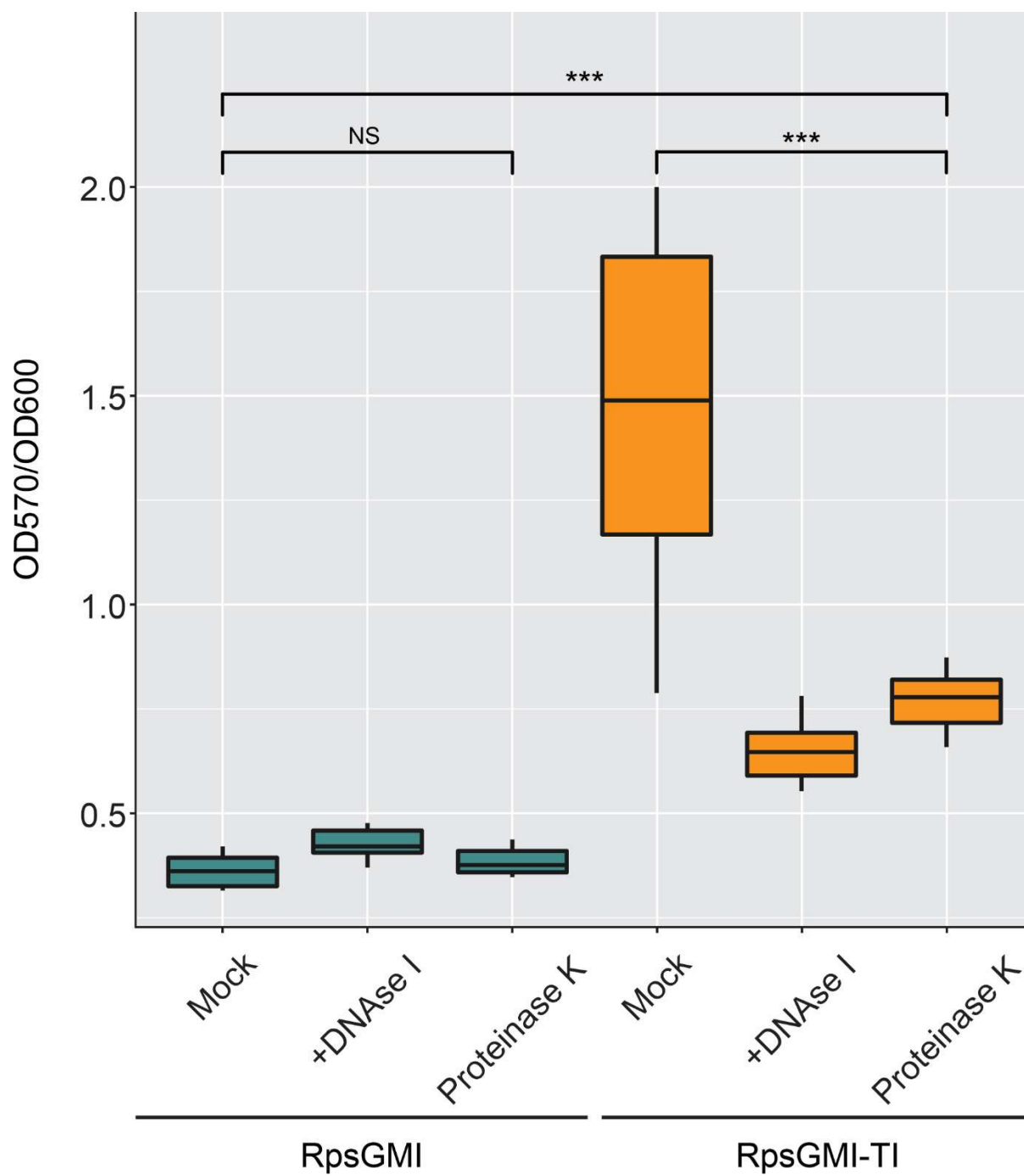
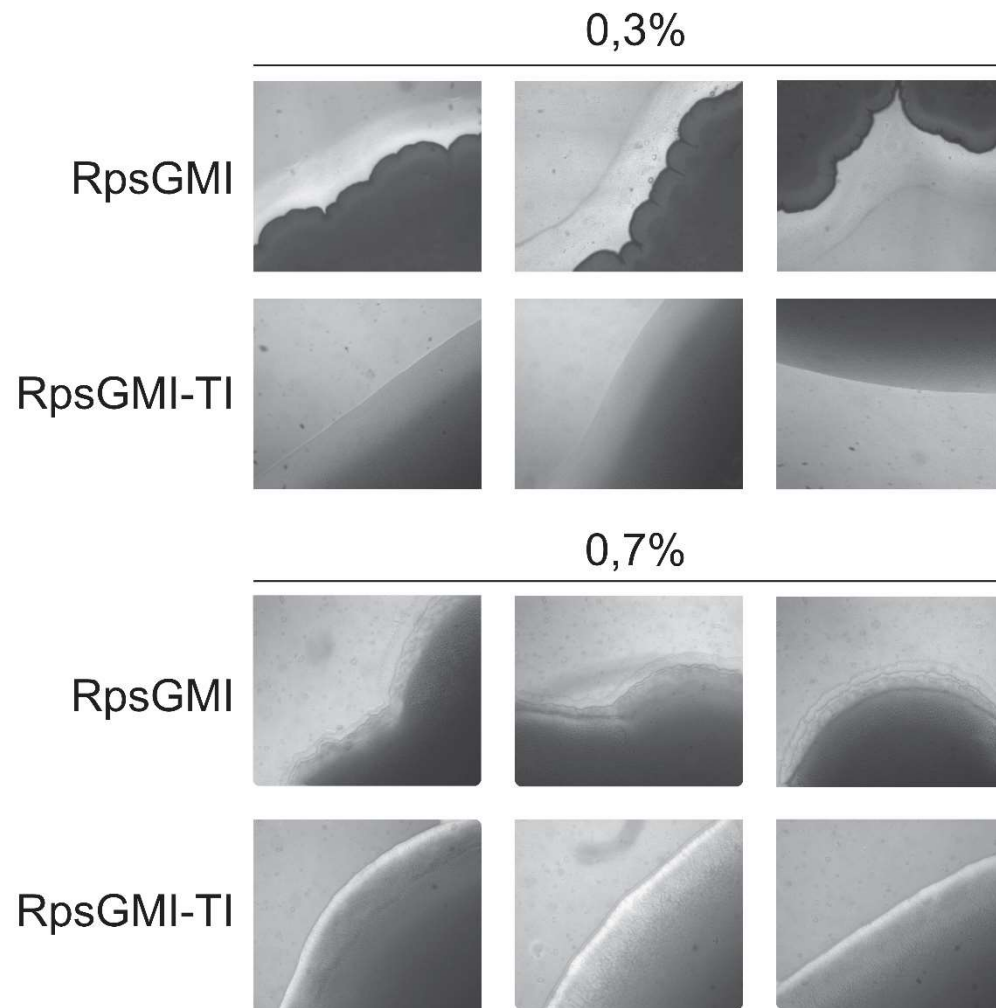


FIGURA 4

A



B

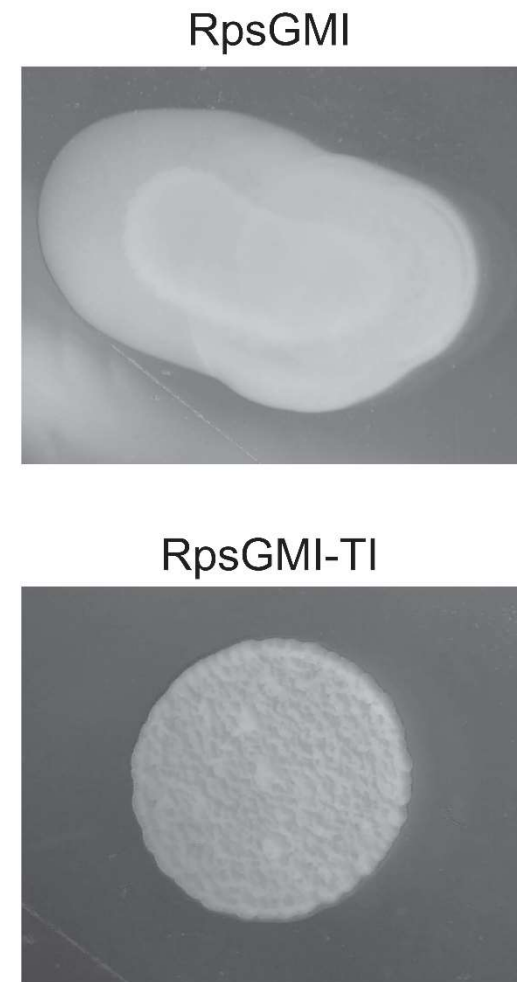
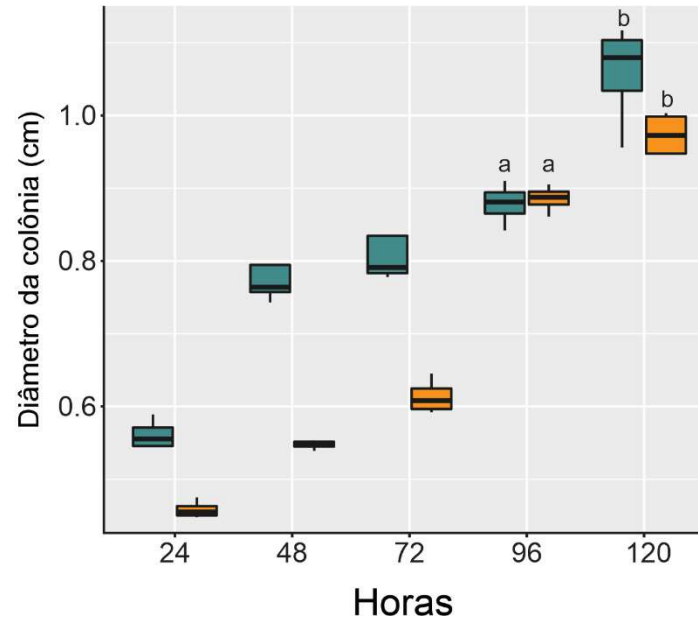


FIGURA 5

A



B

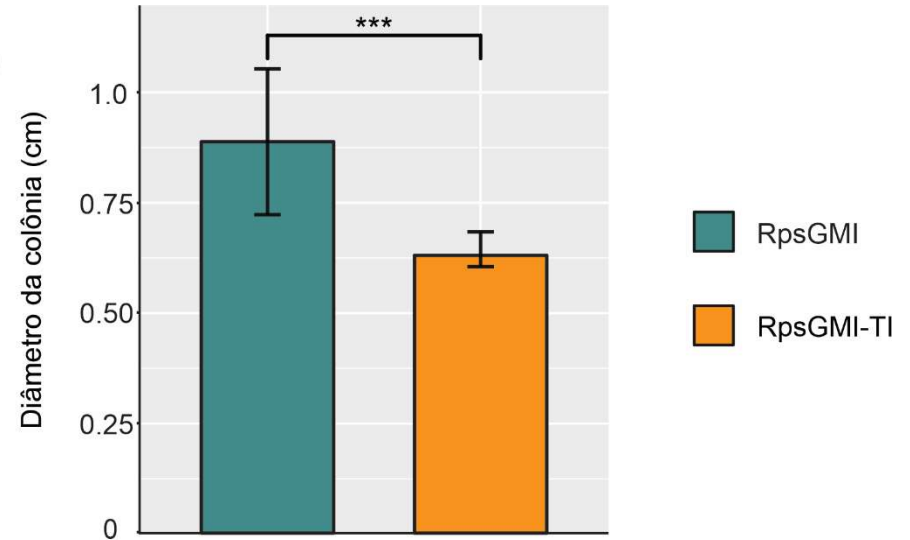
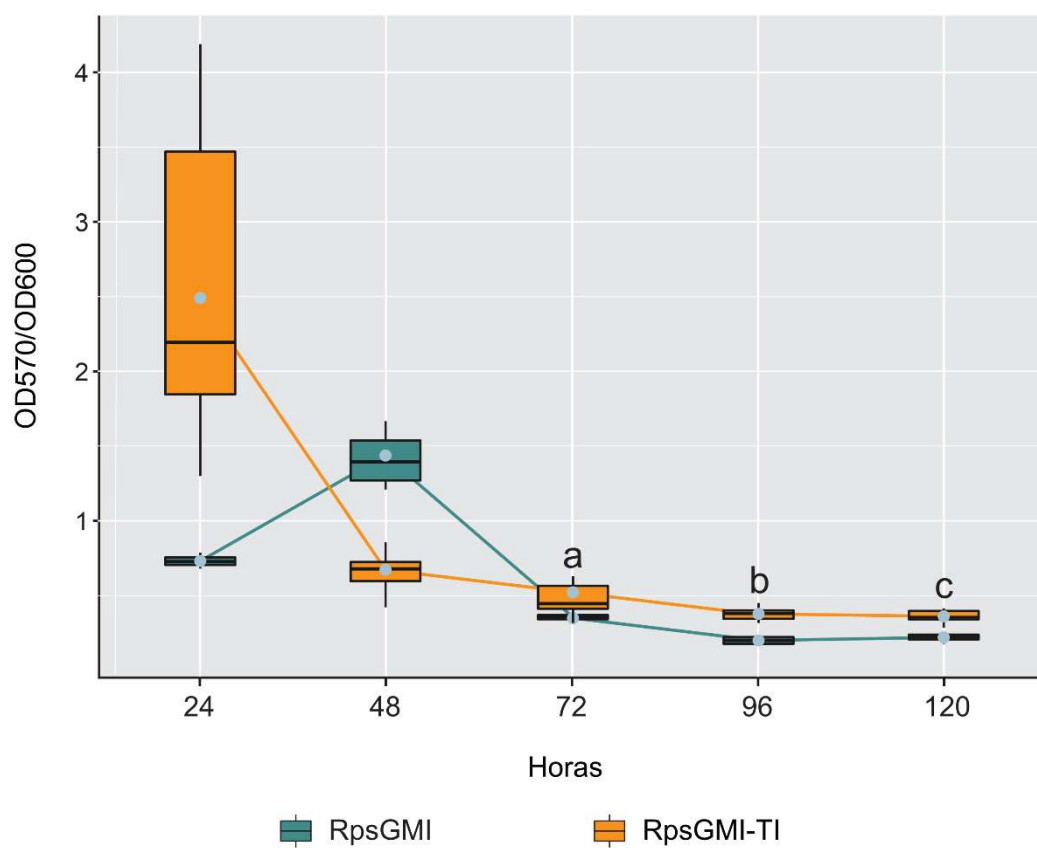


FIGURA 6

A



B

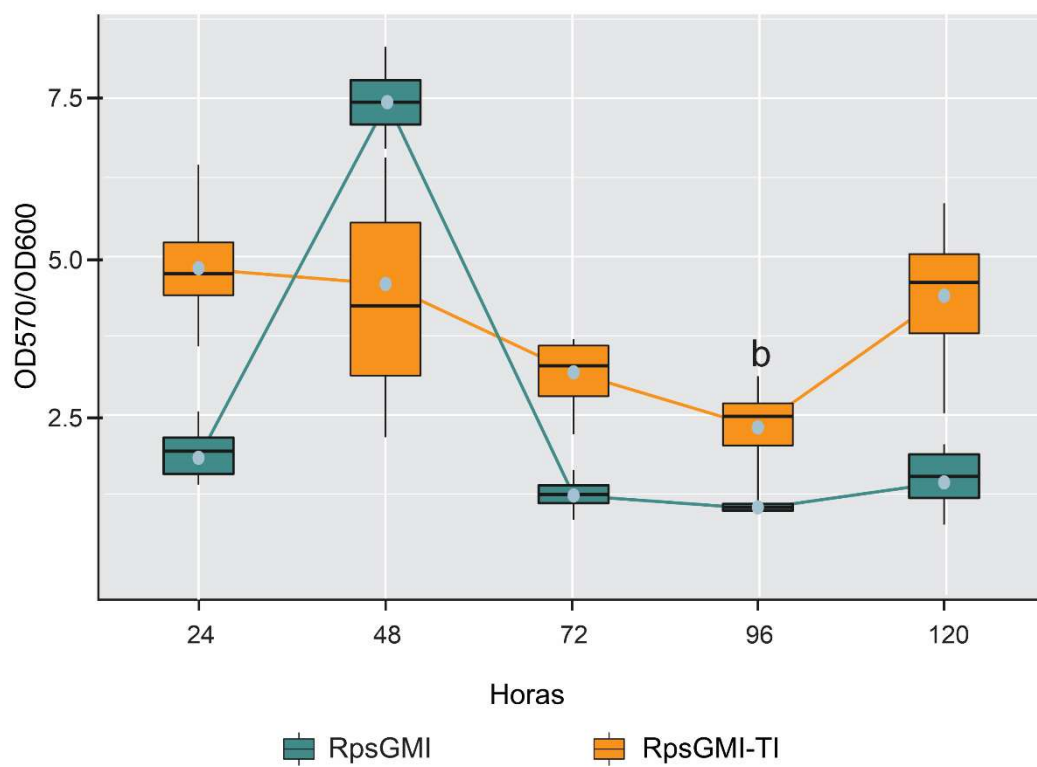


FIGURA 7

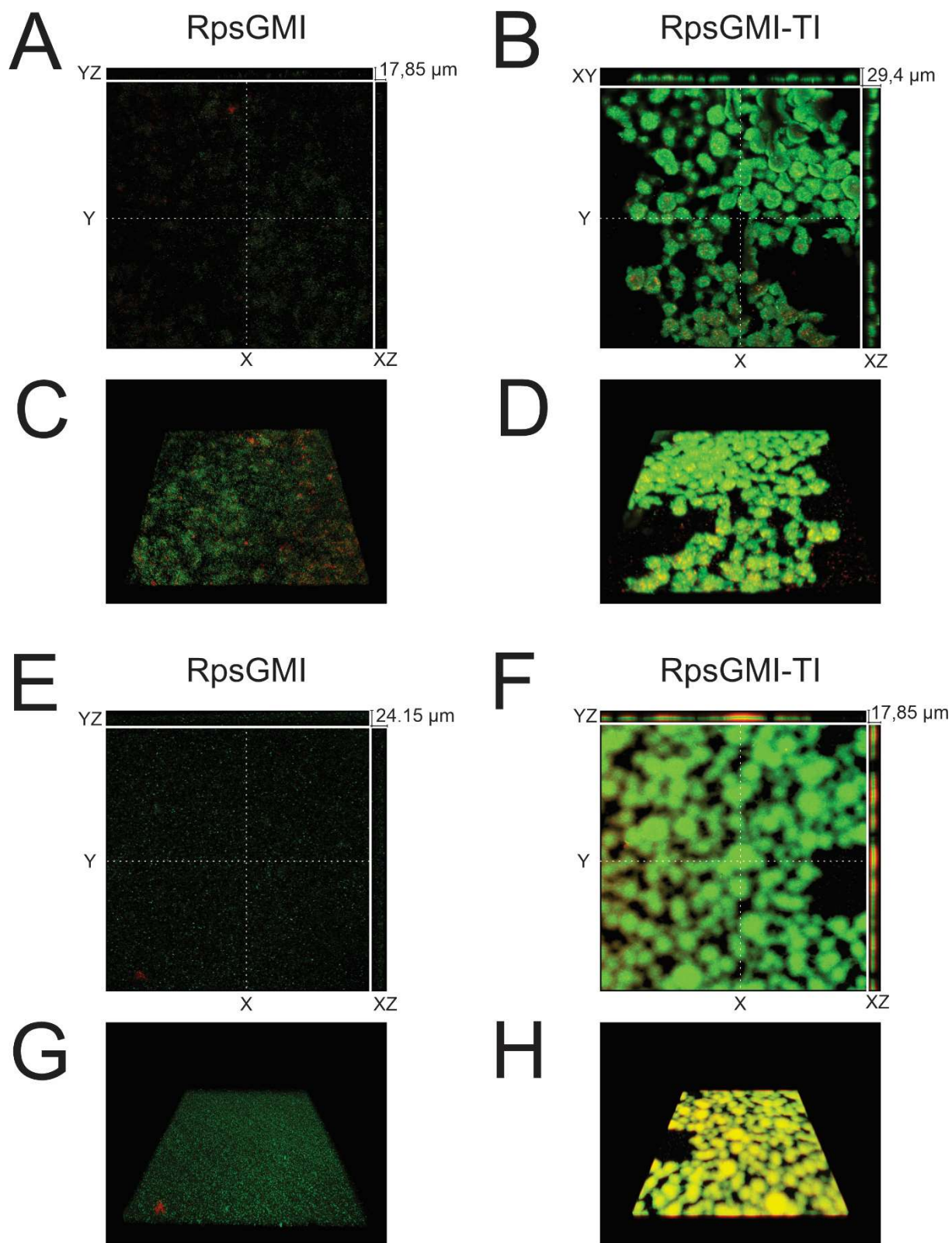


FIGURA SUPLEMENTAR 1

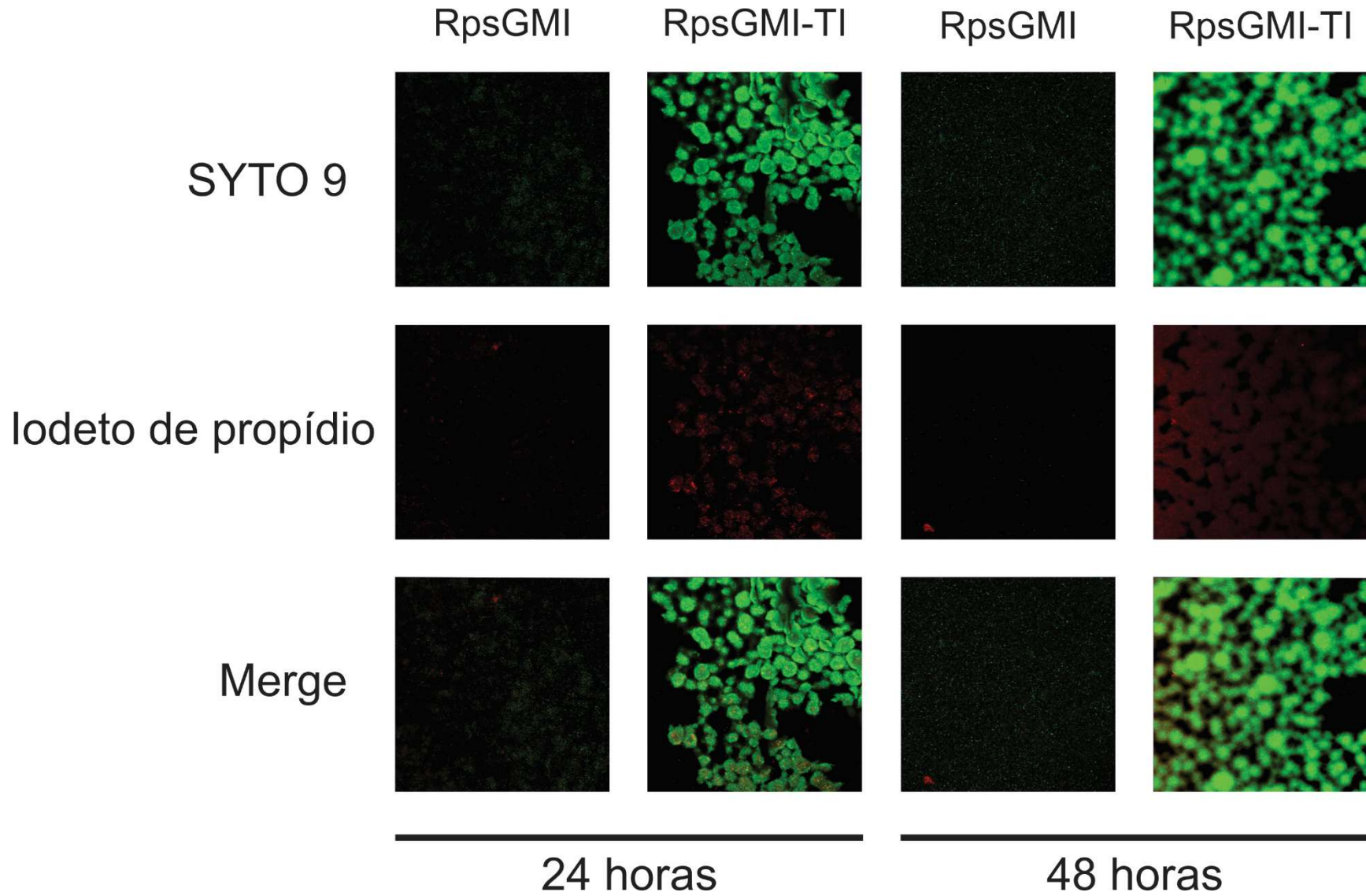
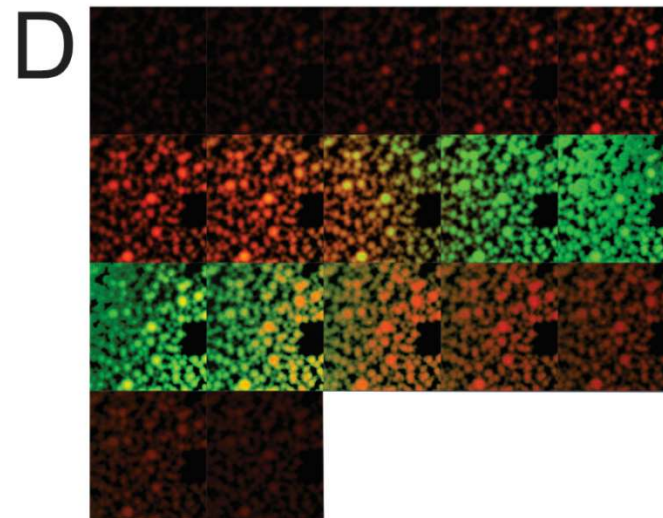
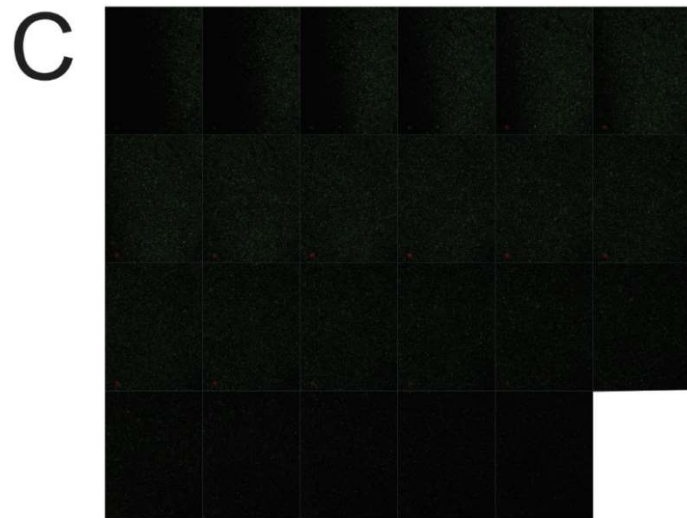
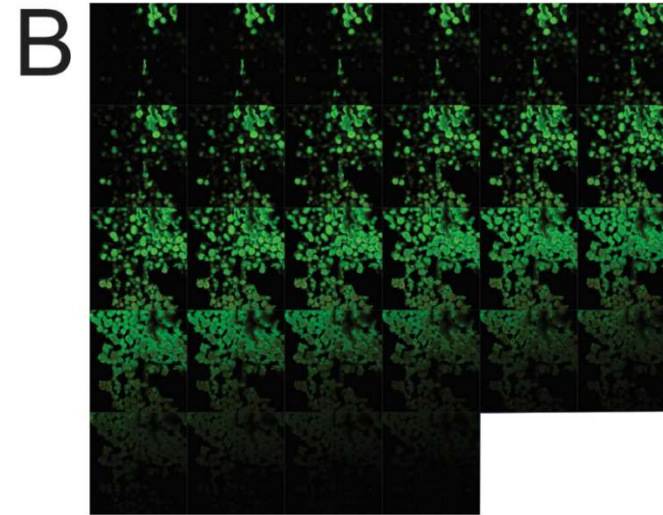
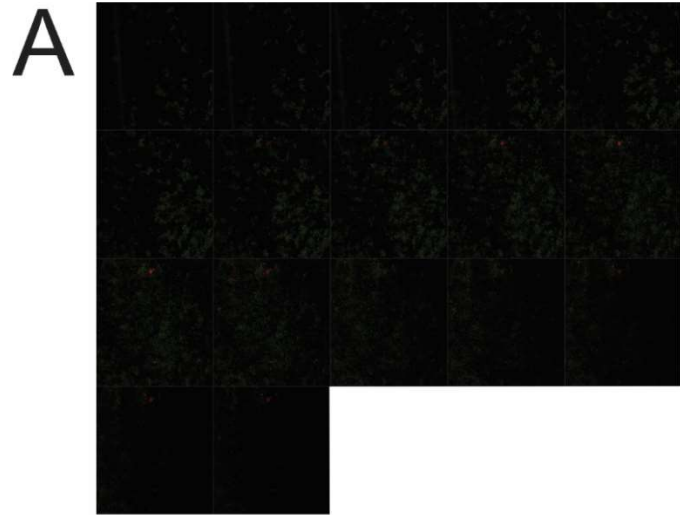


FIGURA SUPLEMENTAR 2



CAPÍTULO 2

***RALSTONIA PSEUDOSOLANACEARUM* INFECTADA COM O TUBULAVÍRUS RSIBR1 EXIBE ALTERAÇÕES NA PRODUÇÃO E NA COMPOSIÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.**

Rezende R. R., Silva G. C., Dias R. S., Clarindo W. R., Bazzolli D. M. S. e Alfenas-Zerbini, P. *Ralstonia pseudosolanacearum* infectada com o tubulavírus RSIBR1 exhibe alterações na produção e na composição de vesículas extracelulares. A ser submetido.

***Ralstonia pseudosolanacearum* infectada com o tubulavírus RSIBR1 exibe alterações na produção e na composição de vesículas extracelulares.**

Rafael Reis de Rezende¹, Giarlã Cunha da Silva¹, Roberto Sousa Dias², Wellington Ronildo Clarindo², Denise Mara Soares Bazzolli¹ e Poliane Alfenas-Zerbini^{1#}

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil.

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

#Autor para correspondência: Poliane Alfenas-Zerbini; e-mail: palfenas@ufv.br

Palavras-chaves: tubulaviruses, vesículas externas, *Ralstonia pseudosolanacearum*.

RESUMO

Os tubulavirus são um grupo de vírus que infectam procariotos que apresentam partículas filamentosas flexíveis e genoma de DNA fita simples circular. Alguns tubulavirus conseguem induzir em seus hospedeiros alterações fenotípicas, tais como, aumento ou redução da patogenicidade de bactérias fitopatogênicas. O tubulavirus *Ralstonia solanacearum* inovirus Brazil 1 (RSIBR1) tem a habilidade de converter bactérias fitopatogênicas complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS) em endofíticas. O CERS é um grupo de bactérias fitopatogênicas ubíquas do solo com capacidade de infectar várias de espécies de plantas, especialmente de importância econômica. Bactérias utilizam vários mecanismos para modular a resposta do hospedeiro contra a infecção, um desses mecanismos é a produção vesículas externas (VEs). As VEs são utilizadas para enviar componentes celulares, tais como DNA e proteínas para célula do hospedeiro com objetivo de torná-la vulnerável. O papel das VEs na interação bactéria-hospedeiro em animais é bem explorado, porém, em bactérias fitopatogênicas são escassos, especialmente as VEs geradas pelas bactérias do CERS. Neste trabalho foi avaliado a produção de VEs pela bactéria *Ralstonia pseudosolanacearum* e *Ralstonia solanacearum* e observado que a infecção pelo tubulavirus RSIBR1 reduz a produção das VEs, além de afetar a quantidade de DNA e proteínas.

INTRODUÇÃO

Os vírus da classe *Tubulavirales* (Domínio: *Monodnaviridae*, Reino: *Loebvirae*, Filo: *Hofneiviricota*, Classe: *Faserviricetes*) tem o genoma composto por um único segmento de DNA circular de fita simples empacotado em uma partícula filamentosa flexível (Marvin *et al.*, 2014; Koonin *et al.*, 2020). Durante a infecção esses vírus podem integrar o seu genoma no cromossomo do hospedeiro ou mantê-lo na forma episomal (Mai-Prochnow *et al.*, 2015). Esses vírus têm a habilidade de infectar seus hospedeiros sem causar lise, gerando uma infecção crônica (Rakonjac *et al.*, 2011). Além disso, é conhecido que alguns tubulavírus tem a habilidade de gerar alterações fenotípicas em seus hospedeiros, como aumento ou redução de patogenicidade de bactérias fitopatogênicas (Askora & Yamada, 2015; Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Hay & Lithgow, 2019).

O complexo de espécies de *Ralstonia solanacearum* (CERS) é um grupo de *Betaproteobacteria* gram-negativas, fitopatogênicas e naturais do solo capazes de infectar mais de 250 espécies vegetais de 50 famílias botânicas, incluindo várias plantações economicamente importantes (Lopes & Rossato, 2018). As bactérias do RSSC infectam as plantas pelas das raízes, em seguida migram para o xilema da planta, onde a produção de biofilme bloqueando o transporte de água causando a morte das plantas (Álvarez *et al.*, 2010; Genin & Denny, 2012; Lowe-Power *et al.*, 2018).

O tubulavírus *Ralstonia solanacearum* inovirus Brazil 1 (RSIBR1) foi caracterizado e identificado infectando a *Ralstonia solanacearum* isolado UB2014 (RsUB) sendo incapaz matar plantas de tomate. Para avaliar a relação entre a não patogenicidade da RsUB e a infecção pelo tubulavirus RSIBR1, a *Ralstonia pseudosolanacearum* isolado GMI1000 (RpsGMI), altamente patogênica, foi infectada com o RSIBR1 e após apresentou perda da patogenicidade. Em resumo, foi demonstrado que o RSIBR1 consegue converter bactérias do CERS em bactérias endofíticas (Almeida *et al.*, 2021).

Vesículas externas (VEs) são produzidas por bactérias para transferir componentes como moléculas de DNA e proteínas, comumente chamados carga (Schwechheimer & Kuehn, 2015; O'Donoghue & Krachler, 2016). Os componentes carregados pelas VEs são protegidos contra degradação e entregues diretamente na célula-alvo. Os componentes iriam manipular as células-alvo tornando-a vulnerável a

bactéria (Schwechheimer & Kuehn, 2015; Jan, 2017). Na interação entre bactérias, as VEs podem também ser utilizadas na comunicação intra e interespecies. Além disso, as VEs podem ser utilizadas como sistema de defesa contra infecção viral. As partículas virais se ligam as VEs, porém não geram novas partículas, atenuando assim a infecção viral contra uma população bacteriana (Schwechheimer & Kuehn, 2015).

Neste trabalho foi caracterizado a produção de VEs pelas bactérias *R. pseudosolanacearum* isolado GMI1000 e *R. solanacearum* isolado UB2014 e o efeito da infecção pelo tubulavirus RSIBR1 sobre a produção das VEs. Os resultados evidenciaram que a infecção pelo RSIBR1 reduz a produção das VEs nessas bactérias, além de afetar a quantidade de DNA e proteínas cargo nas vesículas produzidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e condições de crescimento

Foram utilizados neste estudo os isolados *R. pseudosolanacearum* GMI1000 não infectada (RpsGMI), *R. pseudosolanacearum* isolado GMI1000 infectada pelo tubulavirus RSIBR1 (RpsGMI-TI) e a *R. solanacearum* UB2014 (RsUB), naturalmente infectada pelo RSIBR1. Os isolados bacterianos foram mantidos e cultivados em meio CPG (1% casaminoácido, 10% peptona, 5% glicose e 1% extrato de levedura) a 28 °C.

Isolamento das VEs

As bactérias RpsGMI, RpsGMI-TI e RsUB foram cultivadas em 600 mL de meio CPG sob agitação (150 RPM) a 28 °C durante 20 horas, tempo que corresponde ao final da fase *log* do crescimento em que ocorre a maior produção de VEs (Figura suplementar 1) (Mordukhovich & Bahar, 2017). As culturas foram centrifugadas duas vezes a 10.000 x g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante filtrado em filtro 0,45 µm para remoção total das células bacterianas. O sobrenadante filtrado foi submetido à ultracentrifugação (150.000 x g por 3 horas a 4 °C). Os sedimentos de VEs foram ressuspensos em tampão PBS 1x (0,8 g NaCl, 0,201 g KCl, 1,42 g Na₂HPO₄ e 0,272 g KH₂PO₄, pH = 7,4 ajustados com HCl, H₂O q.s.p. para 1L) e concentrados usando membrana Amicon® Ultra 15 mL 100 MWCO (Merck) para o volume final de 500 µL.

Microscopia eletrônica de transmissão e determinação do tamanho das VEs

As VEs foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (Zeiss, EM 109). Para isso, as VEs foram adsorvidas em *grids* cobertas com formvar por 2 minutos e coradas com acetato de uranila 3% (p/v) durante 1 minuto seguido de lavagem com água deionizada ultrapura. O programa ImageJ v. 1.8.0_172 (Schneider *et al.*, 2012) foi utilizado para estimar o tamanho das VEs a partir das imagens de microscopia eletrônica obtidas.

Quantificação das VEs por citometria de fluxo

As VEs foram tratadas com proteinase K (20 µg/mL) e DNase I (20 µg/mL), e em seguida 200 µL de VEs foram coradas com iodeto de propídio (Live/Dead™ Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. Por fim, as VEs foram quantificadas usando o citômetro de fluxo BD Accuri C6.

Quantificação de proteína e DNA carregadas pelas VEs

VEs previamente tratadas com proteinase K e DNase I tiveram DNA e proteínas extraídos usando o método fenol/clorofórmio (Bitto *et al.*, 2017). Em cada 200 μ L de suspensão de VEs foi adicionado o mesmo volume de fenol:clorofórmio seguido de agitação e centrifugação por 15 minutos a 12.000 RPM. A interface e a fase orgânica foram coletadas acrescidas etanol para concentração final de 90% para precipitação das proteínas usando centrifugação por 30 minutos a 12.000 RPM. A fase aquosa foi limpa duas vezes com clorofórmio por 15 minutos a 12.000 RPM. O DNA foi então precipitado com $\frac{1}{4}$ de volume de acetato de amônio 10M e 1 volume de isopropanol; e incubado *overnight*. Após esse período o DNA foi precipitado por centrifugação por 15 minutos a 14.000 RPM e suspenso em água deionizada. O DNA cargo foi quantificado usando *Qubit Fluorometric Quantification* (Thermo Fisher Scientific) e as proteínas cargo foram quantificadas usando o reagente Bradford seguindo as recomendações do fabricante (Merck) (Mordukhovich & Bahar, 2017; Bitto *et al.*, 2017).

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, e os resultados foram analisados no programa R (R Core Team, 2021) usando teste t, considerando estaticamente significativos os resultados com $P < 0,05$.

RESULTADOS

VEs de RpsGMI, RpsGMI-TI e RsUB

A RpsGMI produz uma abundante VEs com formato mais homogêneas (Figura 1A), sendo que a RpsGMI-TI apresenta uma redução drástica na quantidade de VEs produzidas (Figura 1B). A baixa produção de VEs também é observado na RsUB (Figura 1C). Além disso, nas microscopias das VEs produzidas pelas bactérias infectadas pelo tubulavirus é possível observar a interação entre vesículas e as partículas virais (Figura 1B e D). Essa interação resulta em agregados eletrodensos devido à união de partículas e vesículas (Figura 1C).

As VEs produzidas pelas RsUB, RpsGMI e RpsGMI-TI foram quantificadas por citometria de fluxo. A RpsGMI apresentou uma média de 4.551 (\pm 1.883) VEs/ μ L, já as RpsGMI-TI e RsUB apresentaram, 2.155 (\pm 513,6) e 831,3 (\pm 631,4) VEs/ μ L respectivamente, apresentando uma diminuição no número de vesículas produzidas. As vesículas das RpsGMI e RpsGMI-TI não possuem tamanhos estatisticamente diferentes, VEs da RpsGMI com diâmetro em média de 27,67 (\pm 5,86) nm e VEs da RpsGMI-TI com um diâmetro médio de 31,41 (\pm 10,84) nm. Já as VEs produzidas pela RsUB apresentaram um tamanho em média 34,47 (\pm 9,65) nm sendo essa diferença estatisticamente diferente das demais (Figura 2B).

Esses resultados, indicam uma redução de cerca de 50% das vesículas produzidas por *R. pseudosolanacearum* quando infectada pelo tubulavirus RSIBR1 (RpsGMI-TI).

Após a infecção, as VEs produzidas pela RpsGMI apresentam um aumento de DNA e proteína carregadas pelas vesículas

As VEs apresentam várias funcionalidades no processo de interação bactéria-hospedeiro, podendo transportar para células dos hospedeiros componentes celulares como proteínas e DNA. A entrega destes componentes tem como objetivo principal alterar a dinâmica celular no hospedeiro, favorecendo a infecção (Katsir & Bahar, 2017). Nesse sentido, buscamos avaliar a quantidade de DNA e proteína carregadas pelas VEs das RpsGMI, RpsGMI-TI e RsUB, de modo a determinar se a infecção pelo tubulavirus induz alguma alteração na quantidade dos componentes.

Inicialmente foi avaliada a quantidade de DNA presente nos grupos de VEs. O grupo de VEs da RpsGMI apresentou em média 129,2 (\pm 0,9815) pg/ μ L de DNA, a

população de VEs da RpsGMI-TI mostrou uma média de 217 (\pm 35,55) pg/ μ L de DNA, um aumento de cerca de 67% ($P < 0,05$) em relação a RpsGMI. O grupo VEs da RsUB apresentou uma maior quantidade de DNA, 2.140 (\pm 681,3) pg/VE (Figura 3A). Em seguida, avaliaremos a razão DNA/VE, ou seja, a quantidade de DNA transportado por cada vesícula. Foi observado um resultado semelhante para os grupos de VEs. Cada VE da RpsGMI apresentou 0,0283 (\pm 0,0002) pg/VE de DNA. Por outro lado, as VEs de RpsGMI-TI apresentou 3 vezes a quantidade de DNA/VE em relação as VE de RpsGMI ($P < 0,01$), evidenciando 0,1007 (\pm 0,0164) pg/VE de DNA. O isolado RsUB apresentou uma maior quantidade de DNA por VE, 2,53 (\pm 0,7736) pg/VE (Figura 3B). Dado que foi observado um aumento na quantidade de DNA transportado pelas vesículas nas bactérias RpsGMI-TI (Artificialmente infectada) e RsUB (Naturalmente infectada) permite concluir que o tubulavirus RSIBR1 induz um aumento do DNA transportado pelas VEs de bactérias do CERS.

Em seguida foi avaliada a quantidade de proteínas transportadas pelas VEs. Para o grupo de VEs das RpsGMI e RpsGMI-TI foi possível determinar em média 232,8 (\pm 39,73) e 293,2 (\pm 144,8) ng/ μ L de proteínas, respectivamente, sem apresentaram diferença estatísticas ($P > 0,05$) (Figure 3C). Contudo, não foi possível determinar a quantidade de proteínas transportadas pelas VEs da RsUB pelo método de Bradford. Ao avaliar a quantidade de proteínas transportadas por cada VE foi observado que a RpsGMI apresentou uma média de 0,0511 (\pm 0,0077) ng/EV de proteína. A RpsGMI-TI apresentou em média 0,1392 (\pm 0,05) ng/EV de proteína transportada por cada EV, um aumento em relação a RpsGMI ($P < 0,01$) (Figura 3D).

DISCUSSÃO

Já foi demonstrado que as VEs produzidas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induzem a resposta imune em *Arabidopsis* (Bahar *et al.*, 2016). Nesse sentido, a redução da quantidade de VEs produzidas pelas bactérias infectadas com o RSIBR1 pode indicar um mecanismo do tubulavírus em atenuar a resposta da planta contra as bactérias RpsGMI e RsUB. Em outras palavras, com redução da produção das VEs, a planta se torna permissível a colonização bacteriana. Contudo, novos estudos devem ser realizados para melhor elucidar esse possível mecanismo.

As VEs são utilizadas pelas bactérias para atenuar a infecção viral na população. Partículas virais que poderiam infectar células infectam vesículas que conseqüentemente não darão origem a novas partículas virais. (Schwechheimer & Kuehn, 2015). Nas microscopias eletrônicas de transmissão foi possível observar a interação entre as partículas virais do RSIBR1 as VEs. Portanto, a redução do número de VEs também pode estar relacionada diretamente com a infecção do tubulavírus. A redução de VEs geradas pelo RSIBR1 permitirá que partículas virais tenham maior sucesso em infectar células aumentando assim a eficiência da infecção do tubulavírus.

Estudos de caracterização têm indicado que as VEs apresentam um tamanho variando de 20 a 300 nm (Schwechheimer & Kuehn, 2015; Jan, 2017). Aqui, foi observado que RpsGMI produz VEs com tamanho médio de 27 nm, variando de 15 a no máximo até 50 nm. As bactérias infectadas, RpsGMI-TI e RsUB, apresentam uma distribuição maior dos tamanhos das VEs variando de 15 até 70 nm. Alterações na membrana externa, como, modificações do LPS, afetam diretamente o tamanho das VEs (Murphy *et al.*, 2014). Nesse sentido, a infecção pelo tubulavírus podem gerar perturbações na membrana afetando assim o tamanho das VEs. Essa perturbação pode ser oriunda do complexo morfogênese dos tubulavírus formado na membrana plasmática e externa usado para montar e liberar as partículas virais para fora da célula (Hay & Lithgow, 2019).

CONCLUSÃO

Os resultados aqui encontrados iniciam a caracterização de VEs de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* evidenciando o perfil de quantidade produzida e tamanho. Além disso, foi evidenciando que a infecção pelo tubulavirus RSIBR1 reduz a produção das VEs, bem como aumenta a quantidade de DNA e proteínas transportadas pelas VEs. Nessa perspectiva, essas alterações podem estar diretamente ligadas com a capacidade do RSIBR1 em converter bactérias fitopatogênicas RSSC em bactérias endofíticas.

AGRADECIMENTOS

À equipe do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa pelo apoio da execução das microscopias eletrônicas de transmissão.

A FAPEMIG, CAPES, CNPq e Suzano Papel e Celulose pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Almeida JCF, da Silva Xavier A, Cascardo R de S *et al.*, 2021. Genomic and Biological Characterization of *Ralstonia solanacearum* Inovirus Brazil 1, an Inovirus that Alters the Pathogenicity of the Phytopathogen *Ralstonia pseudosolanacearum*. *Microbial Ecology*.
- Álvarez B, Biosca EG, López MM, 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 267–279.
- Askora A, Yamada T, 2015. Two different evolutionary lines of filamentous phages in *Ralstonia solanacearum*: their effects on bacterial virulence. *Frontiers in Genetics* **6**, 1–6.
- Bahar O, Mordukhovich G, Luu DD *et al.*, 2016. Bacterial outer membrane vesicles induce plant immune responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **29**, 374–384.
- Genin S, Denny TP, 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 67–89.
- Hay ID, Lithgow T, 2019. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO reports* **20**.
- Jan AT, 2017. Outer Membrane Vesicles (VEs) of gram-negative bacteria: A perspective update. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1–11.
- Lopes CA, Rossato M, 2018. History and status of selected hosts of the *Ralstonia solanacearum* species complex causing bacterial wilt in Brazil. *Frontiers in Microbiology* **9**, 1–6.
- Lowe-Power TM, Khokhani D, Allen C, 2018. How *Ralstonia solanacearum* Exploits and Thrives in the Flowing Plant Xylem Environment. *Trends in Microbiology* **26**, 929–942.
- Mai-Prochnow A, Hui JGK, Kjelleberg S, Rakonjac J, McDougald D, Rice SA, 2015a. 'Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host' (M Smith, Ed.). *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 465–487.

- Mai-Prochnow A, Hui JGK, Kjelleberg S, Rakonjac J, McDougald D, Rice SA, 2015b. 'Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host' (M Smith, Ed.). *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 465–487.
- Marvin DAA, Symmons MFF, Straus SKK, 2014. Structure and assembly of filamentous bacteriophages. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **114**, 80–122.
- Murphy K, Park AJ, Hao Y, Brewer D, Lam JS, Khursigaraa CM, 2014. Influence of O Polysaccharides on Biofilm Development and Outer Membrane Vesicle Biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* **196**, 1306.
- O'Donoghue EJ, Krachler AM, 2016. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cellular Microbiology* **18**, 1508–1517.
- R Core Team, 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Roux S, Krupovic M, Daly RA *et al.*, 2019. Cryptic inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes. *Nature Microbiology* **4**, 1895–1906.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW, 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **2012 9:7 9**, 671–675.
- Schwechheimer C, Kuehn MJ, 2015. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 605–619.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figure 1. Microscopia eletrônica de transmissão das VEs. Imagem das VEs da RpsGMI (A), RpsGMI-TI (B) e RsUB (C). Em D, detalhes da associação entre as VEs e a partícula viral do RSIBR1. As setas laranjas indicam VEs, as setas vermelhas indicam VEs associadas a partículas virais do RSIBR1 e as setas amarelas indicam regiões eletro densas composta por aglomerados formados por partículas e vesículas associadas.

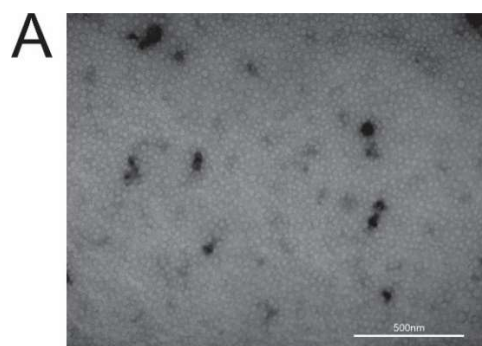
Figure 2. Quantificação do número e tamanho das VEs. (A) Quantificação das VEs por citometria de fluxo. As barras na vertical representam o desvio padrão das médias, os asteriscos indicam diferença estatística e “ns” indicam resultados sem diferença estatística. (B) Avaliação dos tamanhos das VEs. A linha em cada *violin plot* indica a média do tamanho das VEs e os asteriscos indicam diferença estatística.

Figure 3. Avaliação da quantidade DNA e proteínas cargo das VEs. (A) Quantidade média de DNA cargo da população de VEs. (B) Quantidade média de DNA cargo por EV. (C) Quantidade média de proteína cargo da população de VEs. (D) Quantidade média de DNA cargo por EV. Barras verticais representam o desvio padrão das médias, os asteriscos indicam diferença estatística e “ns” indicam resultados sem diferença estatística.

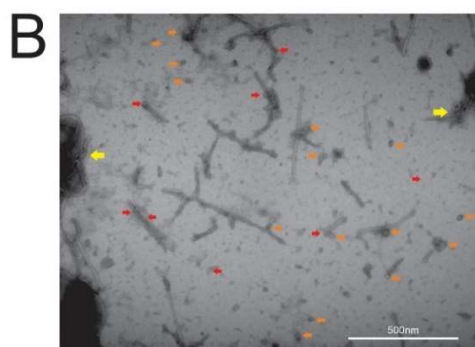
Figura suplementar 1. Curva de crescimento dos isolados RpsGMI, RpsGMI-TI e RsUB. O crescimento foi analisado durante 30 horas, sendo determinado o tempo 20 horas como final da fase *log* de crescimento, ou seja, ponto ideal para coleta das VEs.

FIGURAS

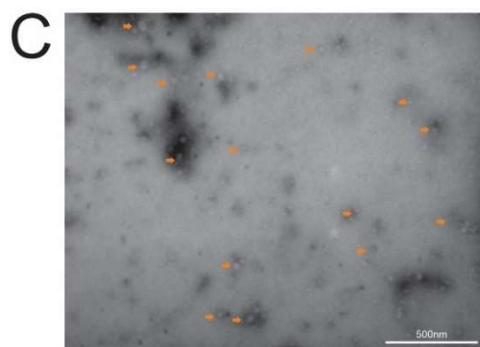
FIGURA 1



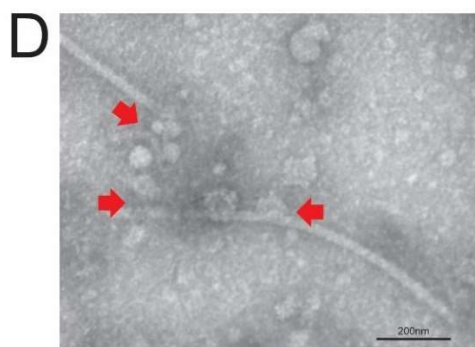
RpsGMI



RpsGMI-TI



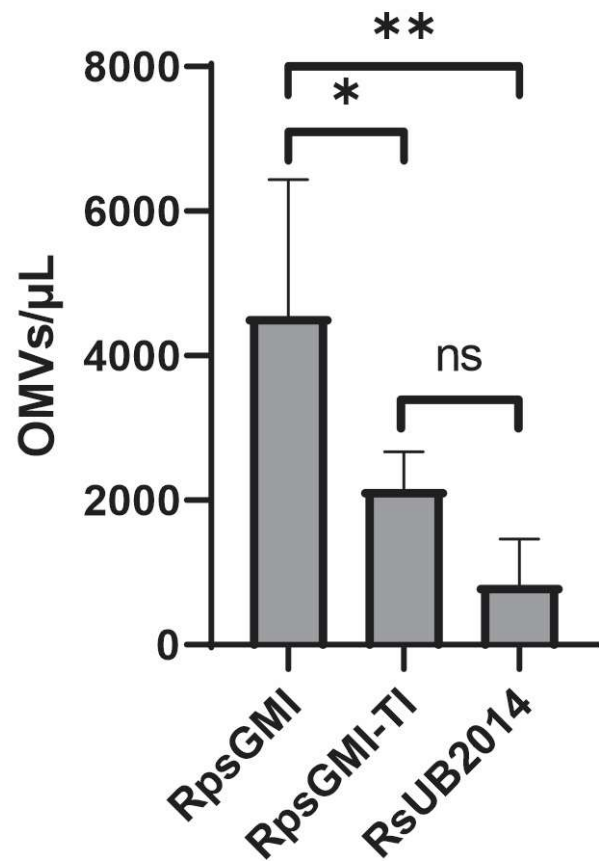
RsUB



OMVs associated with virions

FIGURA 2

A



B

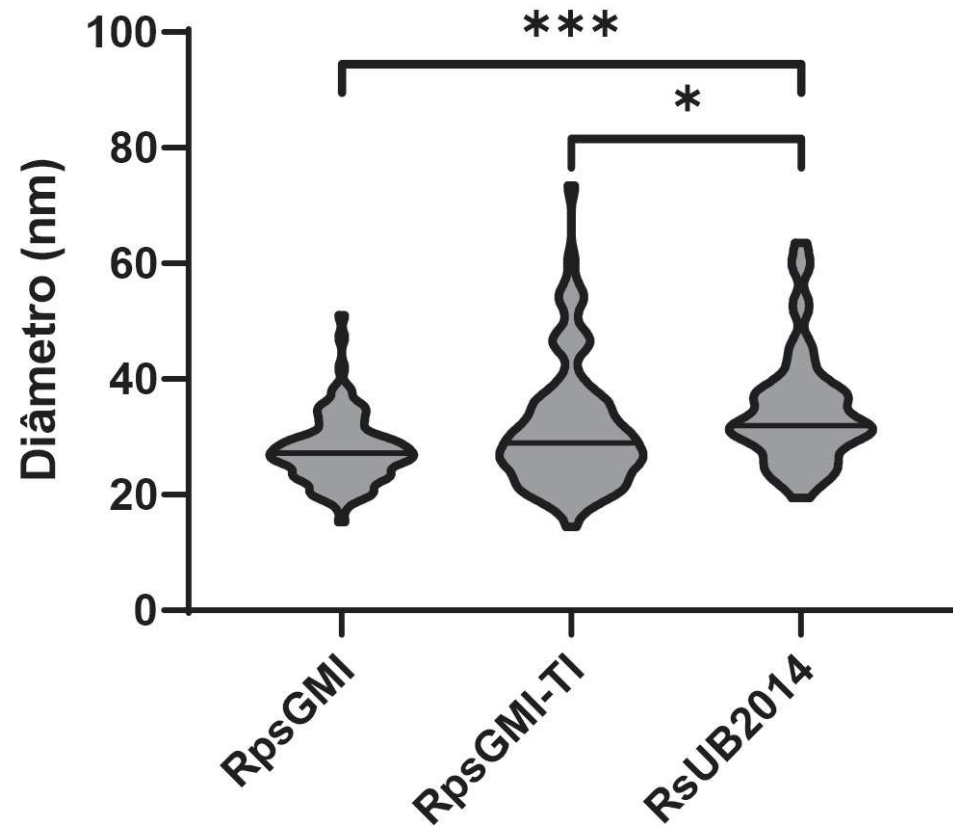


FIGURA 3

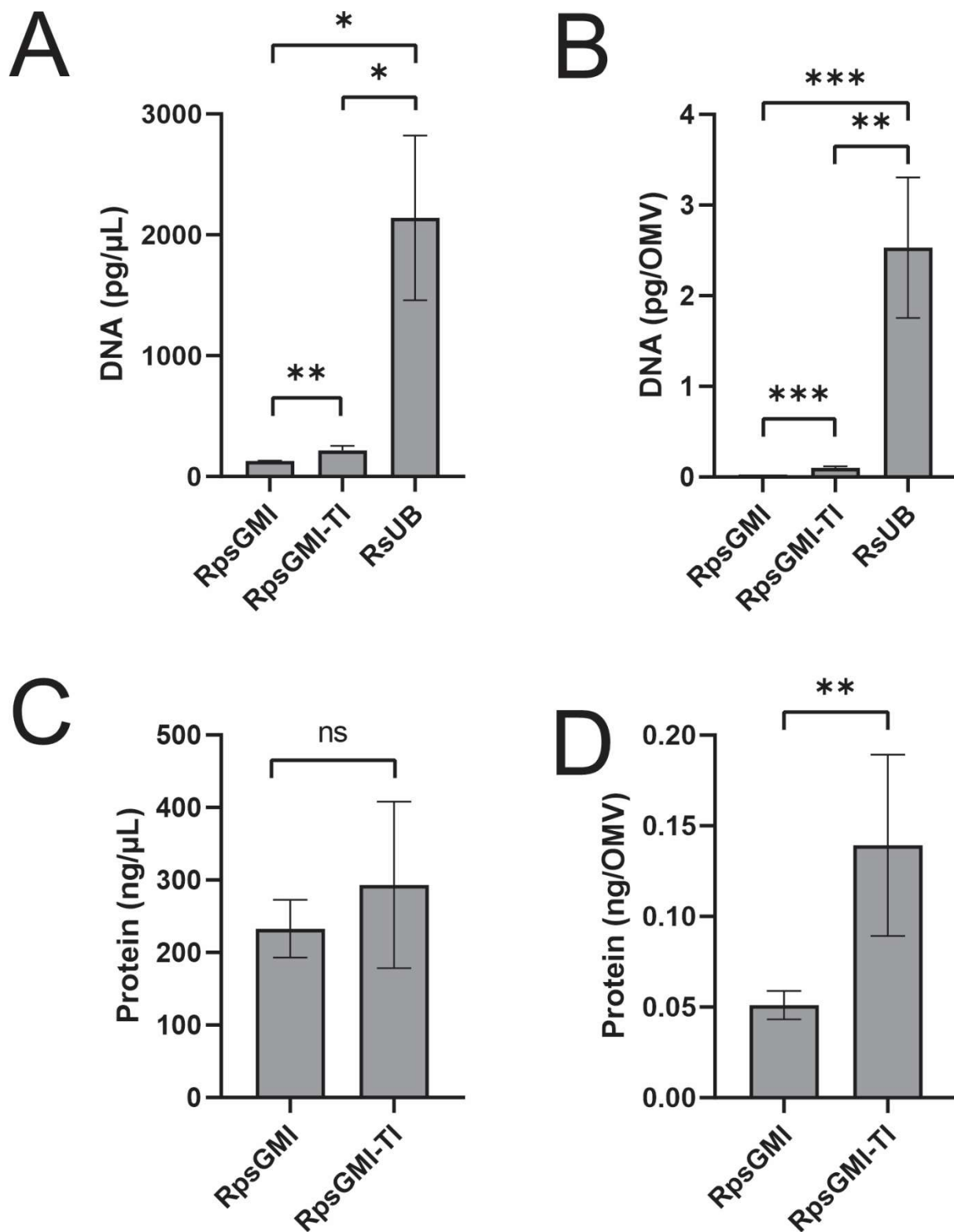
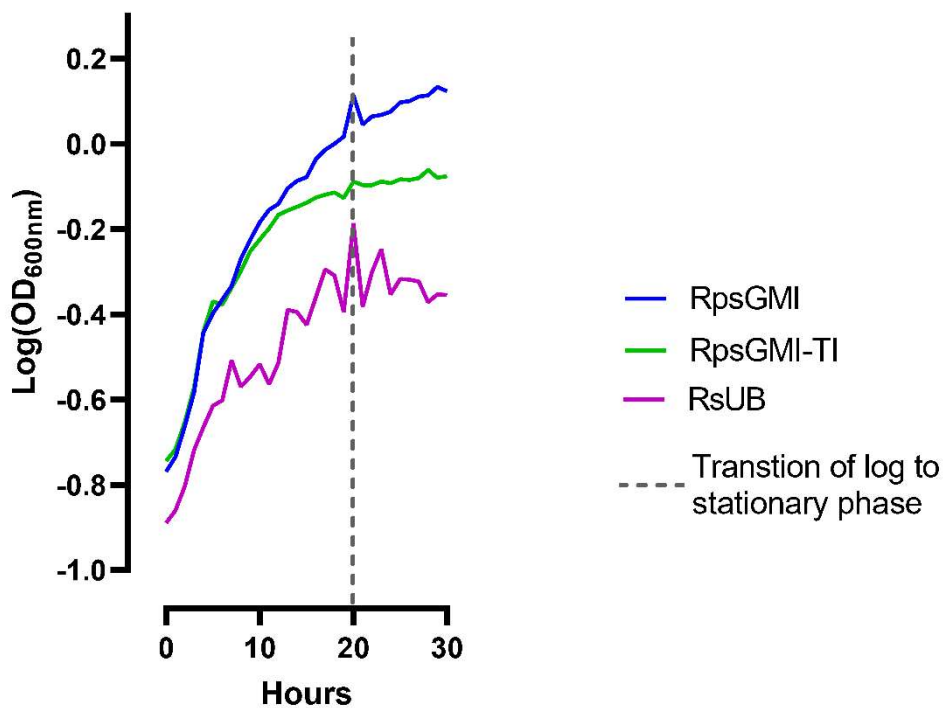


FIGURA SUPLEMENTAR 1



CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEQUENOS RNAs EXPRESSOS POR UM TUBULAVIRUS INFECTANDO *RALSTONIA SOLANACEARUM*.

Rezende R. R., Bruckner F. P., Morgan T. e Alfenas-Zerbini, P. Identificação e caracterização de pequenos RNAs expressos por um tubulavirus infectando *Ralstonia solanacearum*. A ser submetido.

Identificação e caracterização de pequenos RNAs de um tubulavirus infectando *Ralstonia solanacearum*.

Rafael Reis de Rezende^a, Fernanda Prieto Bruckner^{ab}, Túlio Morgan^a e Poliane Alfenas-Zerbini^{a#}

^aDepartamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

^bDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Ibirité. Ibirité, MG 32412-190, Brazil

#Autor para correspondência: Poliane Alfenas-Zerbini; e-mail: palfenas@ufv.br

Palavras-chaves: Tubulaviruses, small RNAs, *Ralstonia*.

RESUMO

O complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS) é formado por bactérias gram-negativas capazes de infectar mais de 200 espécies de plantas de diferentes famílias botânicas, sendo muitas de importância agrícola. As bactérias *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia pseudosolanacearum* e *Ralstonia syzygii* são espécies heterogêneas e geneticamente distintas que compõem o CERS. Pequenos RNAs não-codificantes (*small RNA* — sRNA) desempenham papel na regulação da expressão gênica em bactérias formando complexas redes de regulação. Vírus que infectam bactérias são capazes de produzir sRNAs reguladores que atuam na regulação da expressão gênica de seus hospedeiros. Contudo, o estudo sobre sRNAs virais produzidos por bacteriófagos é pouco explorado. Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de pequenos RNAs pelo tubulavírus *Ralstonia solanacearum* inovírus *Brazil 1* (RSIBR1), capaz de reduzir a patogenicidade das bactérias fitopatogênicas *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*. Análises *in silico*, mostraram que o RSIBR1 tem potencial de expressar seis pequenos RNAs reguladores. Dos seis sRNA identificados *in silico*, dois tiveram sua expressão confirmada por RT-PCR. Além disso, identificamos *in silico* os genes-alvo desses sRNA e os possíveis efeitos de atuação na redução da patogenicidade das bactérias do CERS pelo tubulavírus RSIBR1.

INTRODUÇÃO

As bactérias do complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS; *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia pseudosolanacearum* e *Ralstonia syzygii*) são bactérias gram-negativas habitantes naturais do solo pertencentes à classe *Betaproteobacteria*. O CERS é capaz de infectar diversas espécies de plantas, sendo muitas de importância agrícola (Meng 2013; Peeters et al. 2013; Morais et al. 2015). Essas bactérias invadem o tecido vegetal pelas raízes da planta, migram para o xilema onde crescem formando um biofilme (Genin and Denny 2012; Meng 2013). Como consequência, o fluxo de água e nutrientes no xilema é interrompido, levando à morte da planta. Por essa característica, a doença causada por essas bactérias é denominada murcha bacteriana (MB) (Lowe-Power et al. 2018).

Os tubulavírus são vírus filamentosos com genomas de ssDNA circular que infectam procariotos de forma crônica (Mai-Prochnow et al. 2015; Hay and Lithgow 2019). Diversos tubulavirus que infectam CERS já foram caracterizados e frequentemente associados com o aumento ou redução da patogenicidade da bactéria hospedeira (Askora and Yamada 2015; Mai-Prochnow et al. 2015).

O tubulavírus *Ralstonia solanacearum* inovirus Brazil 1 (RSIBR1) foi encontrado infectando a bactéria *R. solanacearum* isolado UB2014, a qual não é capaz causar a MB. Quando isolados de CERS agressivos são infectados por RSIBR1, também perdem a capacidade causar a MB, porém conseguem colonizar as plantas. Os mecanismos utilizados pelo RSIBR1 na modulação da patogenicidade das bactérias são desconhecidos (Almeida et al. 2021).

Pequenos RNAs reguladores (small RNA — sRNAs) (50 a 400 nt) desempenham papel importante na regulação genica dos procariotos. O mecanismo mais comum de regulação via sRNA ocorre através da ligação ao mRNA, impedindo a ligação do ribossomo 30S e/ou a sinalização para degradação (Pichon and Felden 2008; Repoila and Darfeuille 2009; Dutta and Srivastava 2018). Além disso, sRNAs bacterianos podem ser transportados para outras células bacterianas ou eucarióticas modulando a expressão dessas células com objetivo de favorecer a sua bactéria progenitora (Weiberg et al. 2014; Islam et al. 2017). É conhecido que alguns bacteriófagos conseguem produzir pequenos sRNAs que atuam na regulação da expressão gênica da sua bactéria hospedeira. Contudo, o estudo sobre sRNAs

produzidos por bacteriófagos é pouco explorado quando comparado aos sRNAs produzidos por bactérias (Altuvia et al. 2018).

Neste trabalho identificamos *in silico* e detectamos *in vitro* que o tubulavirus RSIBR1 é capaz de produzir sRNAs.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e condições de crescimento

A bactéria *Ralstonia solanacearum* isolado UB2014 (RsUB), naturalmente infectada pelo RSIBR1 foi crescida e mantida em meio CPG (1% casoaminoácido, 10% peptona, 5% glicose e 1% extrato de levedura) a 28 °C.

Identificação e classificação de sRNAs *in silico*

Os sRNAs reguladores foram identificados no genoma do RSIBRI (MF716957.1) usando a plataforma RNASpace (Cros et al. 2011) aplicando os parâmetros padrão; por fim os sRNA identificados foram denominados sRNAINO seguido de numeração para diferenciá-los. Em seguida os alvos destes sRNAs foram determinados usando a plataforma TargetRNA2 (Kery et al. 2014). Os alvos foram preditos usando o genoma (cromossomo e megaplasmídeo) da bactéria *Ralstonia pseudosolanacearum* isolado GMI1000, a qual é geneticamente mais próxima a *R. solanacearum* isolado UB2014 disponível nos parâmetros do programa. A estrutura secundária dos sRNAINOs foi obtida usando a plataforma mFold (Zuker 2003). Por fim as famílias dos sRNAINO foram identificadas usando Blastn e os sRNAs do RFAM como *database* (Griffiths-Jones et al. 2003).

Detecção *in vitro* dos sRNAs

Seis putativos sRNAINOs foram identificados *in silico*, destes, três sRNA não apresentam sobreposição com nenhuma ORF viral predita. São eles os sRNAINO1, sRNAINO2 e sRNAINO4. Por tanto, é possível detectar sua expressão usando RT-PCR. Para esse objetivo, o RNA total da bactéria RsUB foi extraído com o reagente TRIzol™ (Invitrogen) seguindo-se as recomendações do fabricante. O RNA total foi então tratado com RQ1 RNase-Free DNase (Promega) seguindo-se as recomendações do fabricante. Em seguida, a síntese de cDNA foi realizada usando a enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) usando primers reversos específicos (Tabela suplementar 1) seguindo-se as recomendações do fabricante. Por fim, PCR para confirmação da transcrição dos sRNAs a partir do cDNA foi realizado usando a enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) usando primers específicos que se anelam na região final da 3' dos sRNAINOs preditos (Tabela

suplementar 1) para o sRNAs. Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese (100V / 1 hora) em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Predição *in silico* e detecção *in vitro* dos sRNAs expressos pelo RSIBR1

Seis sRNAs foram preditos no genoma do RSIBR1, denominados sRNAINO1, sRNAINO2, sRNAINO3, sRNAINO4, sRNAINO5 e sRNAINO6 (Figura 1). Os sRNAs identificados apresentam tamanhos variando de 60 a 300 nt. Os sRNAINOs se encontram distribuídos pelo genoma viral (Figura 1). Três estão se sobrepõem a mesma ORF que expressa duas proteínas envolvidas na montagem da partícula viral, as proteínas pl e pXI, denominadas como proteínas de montagem de partícula. O sRNAINO3 está sobreposto à ORF da pl e os sRNAINO6 e sRNAINO5 estão sobrepostos à ORF da pXI. Os outros três sRNAs estão localizados em regiões intergênicas do genoma (Figura 1). Os sRNAINO1 e sRNAINO4 estão localizados na região intergênica *upstream* à ORF que codifica a proteína de extrusão e *downstream* à ORF de iniciação de replicação por círculo rolante (Figura 1). O sRNAINO4 apresenta uma pequena sobreposição com a região final da ORF da proteína de extrusão, já o sRNAINO1 se localiza na região intergênica sem sobreposições (Figura 1). Por fim, o sRNAINO2 se encontra na região intergênica *upstream* à ORF da proteína repressora transcricional e *downstream* à ORF da proteína de ligação a ssDNA, onde se encontra a origem de replicação do genoma viral (Figura 1). A ORF da proteína repressora transcricional se encontra em sentido contrário das demais ORFs sendo que o sRNAINO2 apresenta, neste caso, uma sobreposição com a região iniciadora da ORF, porém é supostamente transcrito no sentido contrário da ORF (Figura 1). Os sRNAINO1, sRNAINO2 e sRNAINO4 que não apresentam sobreposição com nenhuma ORF, tiveram a detecção avaliada usando RT-PCR. Deste modo, o sRNAINO1 e o sRNAINO4 foram detectados, entretanto, não foi possível detectar a expressão do sRNAINO2 (Figura 4).

Caracterização dos sRNAINOs

Os sRNAINO1, sRNAINO3 e sRNAINO5 mostraram identidade de sequência com sRNAs de *Streptomyces*. O sRNAINO6 mostrou identidade com um sRNA de *Xanthomonas oryzae*, caracterizados e presente do Rfam (Tabela 1). Contudo, essas bactérias não são relacionadas a *Ralstonia* spp. Bactérias do gênero *Streptomyces* pertencem ao filo *Actinobacteria*, já *Ralstonia* é um gênero do filo *Proteobacteria*. A bactéria *X. oryzae* pertence ao mesmo filo das bactérias *Ralstonia*, contudo pertencem

a classes distintas. Bactérias do gênero *Xanthomonas* pertencem à classe *Gammaproteobacteria* e as bactérias do gênero *Ralstonia* pertencem à classe *Betaproteobacteria*. Já o sRNAINO2 e o sRNAINO4 não mostram nenhuma identidade com sRNAs descritos (Tabela 1). A falta de identidade dos sRNAINOs com outros sRNAs é esperada dado que até o momento não há nenhum sRNA de tubulavirus caracterizado. Os sRNAs possuem uma região, denominada sítio de ligação preferencial, que irá anelar com a região de ligação ao ribossomo presente no mRNA bloqueado a tradução. Um fato notável entre os sRNAINO é que os sítios de ligação preferencial de ligação compartilham identidade entre eles (Figura Suplementar 1). Pequenos RNAs apresentam regiões com *stem-loop* formados por regiões palindrômicas utilizadas para bloquear ou desestabilizar a ligação do ribossomo com mRNA alvo (Carrier et al. 2018). Nesse sentido, nós realizamos a predição *in silico* da estrutura dos sRNAINOs e observamos a formação de diversos *stem-loops* (Figura 3). A conservação de identidade entre os sítios de ligação preferencial associado à detecção dos *stem-loops* reforça o pressuposto da ocorrência dos sRNAINOs.

Com exceção dos sRNAINO5 e sRNAINO6 para os quais não conseguimos identificar seus possíveis alvos, os demais apresentam possíveis alvos presentes no cromossomo e no megaplasmídeo de *R. pseudosolanacearum* GMI1000. Os alvos foram agrupados em 10 categorias de acordo com suas funções (Figura 4). O maior grupo inclui genes alvos cujos produtos são não caracterizados, portanto foram classificados como proteínas hipotéticas. O segundo maior grupo é composto por genes cujos produtos são relacionados com o transporte através da membrana e o terceiro maior grupo de corresponde a genes que codificam reguladores transcricionais. Os demais grupos apresentam funções distintas, como proteínas envolvidas no dobramento de outras proteínas e proteínas envolvidas no metabolismo energético. Dado que os possíveis alvos estão relacionados com reguladores transcricionais, pode-se supor que os sRNAINOs usando a regulação dos reguladores transcricionais produza alterações globais na expressão da bactéria hospedeira, o que pode estar relacionado na conversão das bactérias do CERS em bactérias endofíticas.

REFERÊNCIAS

- Almeida JCF, da Silva Xavier A, Cascardo R de S, et al (2021) Genomic and Biological Characterization of *Ralstonia solanacearum* Inovirus Brazil 1, an Inovirus that Alters the Pathogenicity of the Phytopathogen *Ralstonia pseudosolanacearum*. *Microb Ecol*. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01874-w>
- Altuvia S, Storz G, Papenfort K (2018) Cross-Regulation between Bacteria and Phages at a Posttranscriptional Level. *Regul with RNA Bact Archaea* 6:499–514. <https://doi.org/10.1128/9781683670247.ch29>
- Askora A, Yamada T (2015) Two different evolutionary lines of filamentous phages in *Ralstonia solanacearum*: their effects on bacterial virulence. *Front Genet* 6:1–6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00217>
- Carrier MC, Lalaouna D, Massé E (2018) Broadening the Definition of Bacterial Small RNAs: Characteristics and Mechanisms of Action. *Annu Rev Microbiol* 72:141–161. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062607>
- Cros M-J, de Monte A, Mariette J, et al (2011) RNAspace.org: An integrated environment for the prediction, annotation, and analysis of ncRNA. *RNA* 17:1947–1956. <https://doi.org/10.1261/rna.2844911>
- Dutta T, Srivastava S (2018) Small RNA-mediated regulation in bacteria: A growing palette of diverse mechanisms. *Gene* 656:60–72. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.02.068>
- Genin S, Denny TP (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Annu Rev Phytopathol* 50:67–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173000>
- Griffiths-Jones S, Bateman A, Marshall M, et al (2003) Rfam: an RNA family database. *Nucleic Acids Res* 31:439. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG006>
- Hay ID, Lithgow T (2019) Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO Rep* 20:. <https://doi.org/10.15252/embr.201847427>
- Islam W, Islam S ul, Qasim M, Wang L (2017) Host-Pathogen interactions modulated by small RNAs. *RNA Biol* 14:891–904. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1318009>

- Kery MB, Feldman M, Livny J, Tjaden B (2014) TargetRNA2: identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Res* 42:W124–W129. <https://doi.org/10.1093/nar/gku317>
- Lowe-Power TM, Khokhani D, Allen C (2018) How *Ralstonia solanacearum* Exploits and Thrives in the Flowing Plant Xylem Environment. *Trends Microbiol* 26:929–942. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.002>
- Mai-Prochnow A, Hui JGK, Kjelleberg S, et al (2015) 'Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host.' *FEMS Microbiol Rev* 39:465–487. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu007>
- Meng F (2013) *Ralstonia Solanacearum* Species Complex and Bacterial Wilt Disease. *J Bacteriol Parasitol* 04:2–5. <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000e119>
- Morais TP, Lopes CA, Tebaldi ND, Luz JMQ (2015) Occurrence and diversity of *Ralstonia solanacearum* populations in Brazil. *Biosci J* 31:1722–1737. <https://doi.org/10.14393/BJ-v31n6a2015-28431>
- Peeters N, Guidot A, Vailleau F, Valls M (2013) *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol Plant Pathol* 14:651–662. <https://doi.org/10.1111/mpp.12038>
- Pichon C, Felden B (2008) Small RNA gene identification and mRNA target predictions in bacteria. *Bioinformatics* 24:2807–2813. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn560>
- Repoila F, Darfeuille F (2009) Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biol Cell* 101:117–131. <https://doi.org/10.1042/bc20070137>
- Weiberg A, Wang M, Bellinger M, Jin H (2014) Small RNAs: A new paradigm in plant-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol* 52:495–516. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045933>
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31:3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Localização dos sRNAINOs no genoma do RSIBR1. Mapa da organização genômica do RSIBR1. As setas em cinza indicam as ORFs e os genes com seus produtos indicados. Já as setas em vermelho indicam o *locu* de origem dos sRNAINOs.

Figure 2. Detecção por RT-PCR dos sRNAINO 1, 2 e 4. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da RT-PCR usando primers específicos para a detecção da expressão dos sRNAINOs 1, 2 e 4 (Tabela suplementar 1). Os triângulos em laranja indicam os fragmentos amplificados, e os triângulos em roxo indicam os tamanhos dos fragmentos do marcador 1 Kb plus lader (Thermo Fisher).

Figura 3. Estrutura secundária preditas dos sRNAINOs. Estruturas secundárias típicas em sRNAs foram determinadas *in silico*. Cada estrutura foi predita usando a sequência completa dos sRNAINOs. Os números indicam a posição dos nucleotídeos a partir da 5'.

Figura 4. Possíveis alvos dos sRNAINOs. Número de genes alvos dos sRNAINOs determinado em *in silico* e agrupados de acordo com suas funcionalidades.

Figura Suplementar 1. Sítios de ligação preferencial dos sRNAINO aos mRNAs alvos. Na parte superior da imagem, *sequence logo* mostrando a conservação entre as sequências dos sítios de ligação preferencial dos sRNAINOs. Na parte mediana da figura, o gráfico mostra a porcentagem de conservação de cada nucleotídeo. Por fim na parte inferior, o alinhamento da região de ligação preferencial dos sRNAINOs.

FIGURAS

FIGURA 1

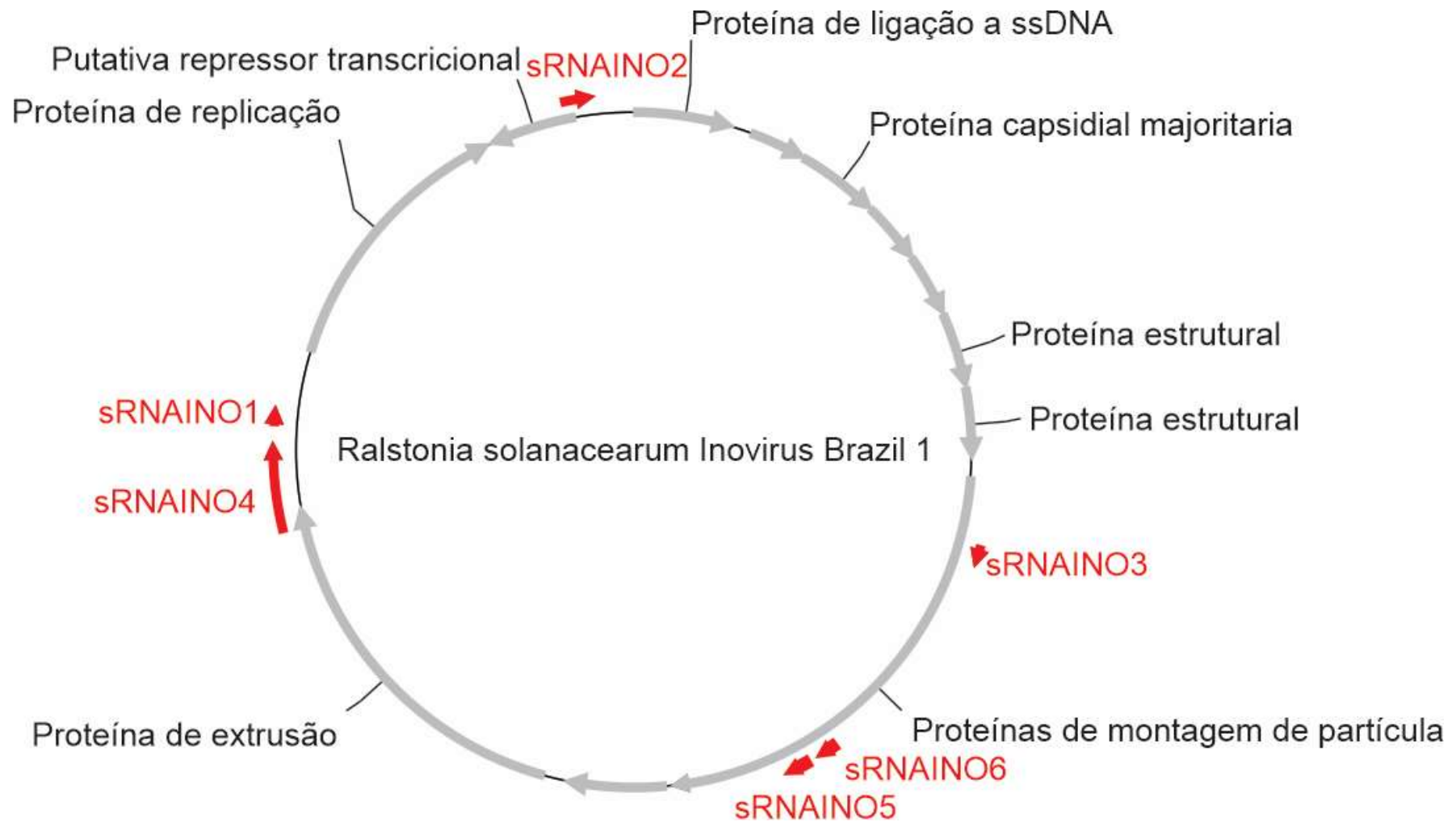


FIGURA 2

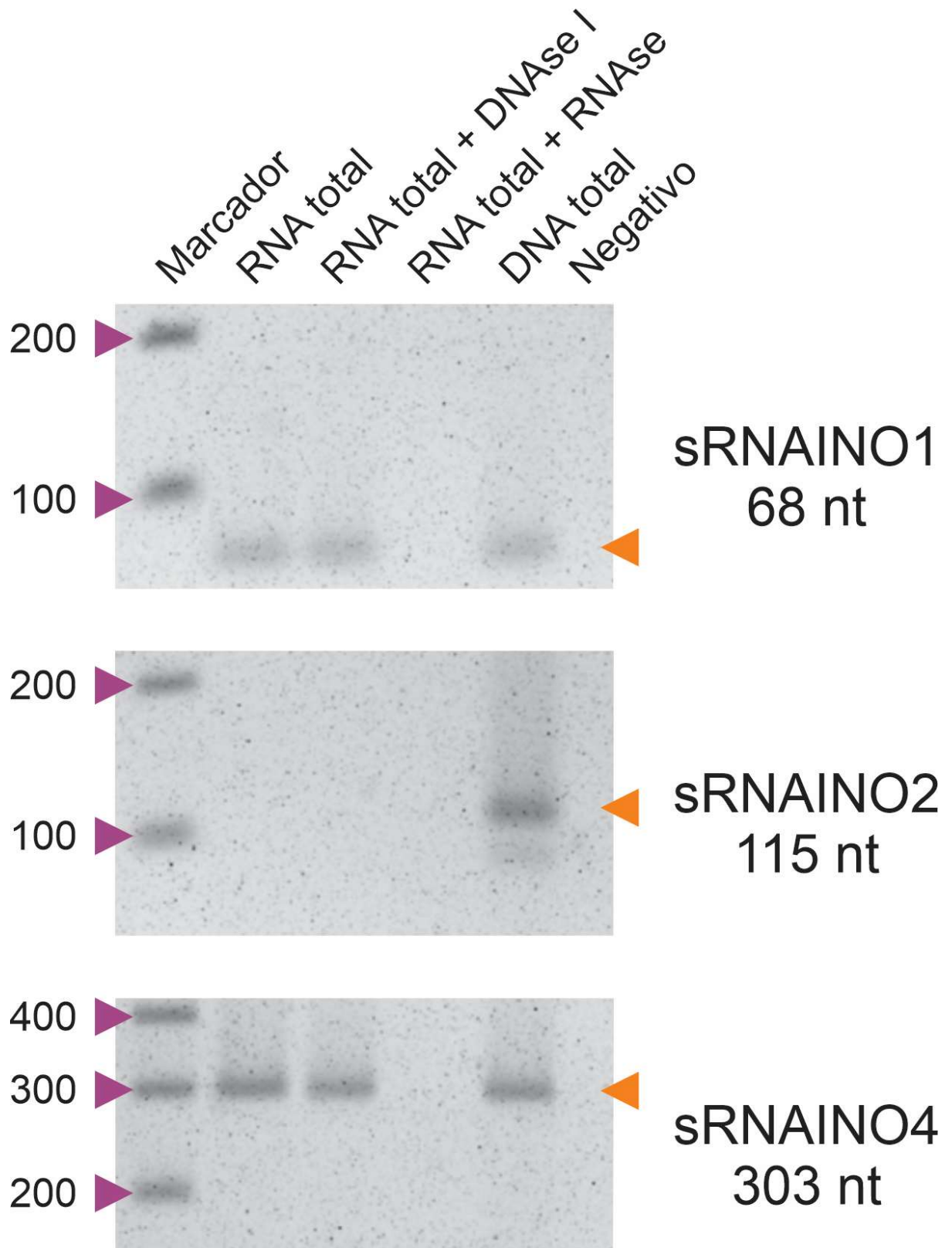
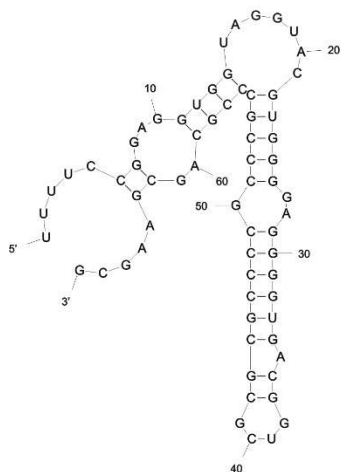
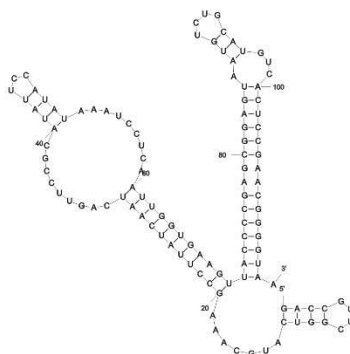


FIGURA 3

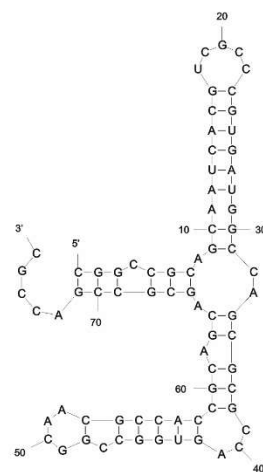
sRNAINO1



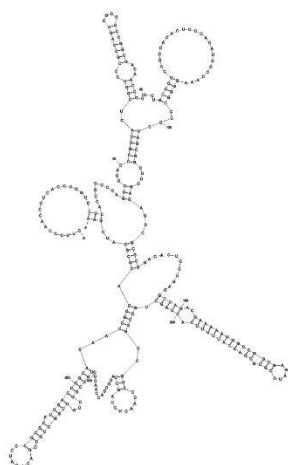
sRNAINO2



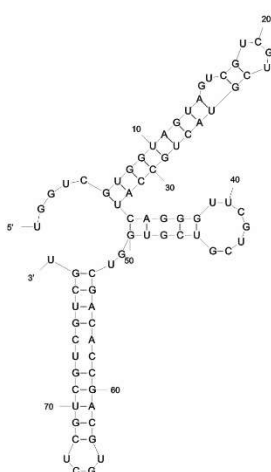
sRNAINO3



sRNAINO4



sRNAINO5



sRNAINO6

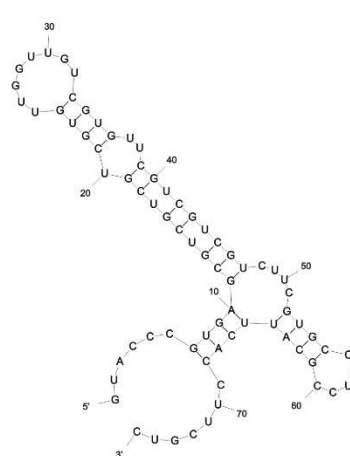


FIGURA 4

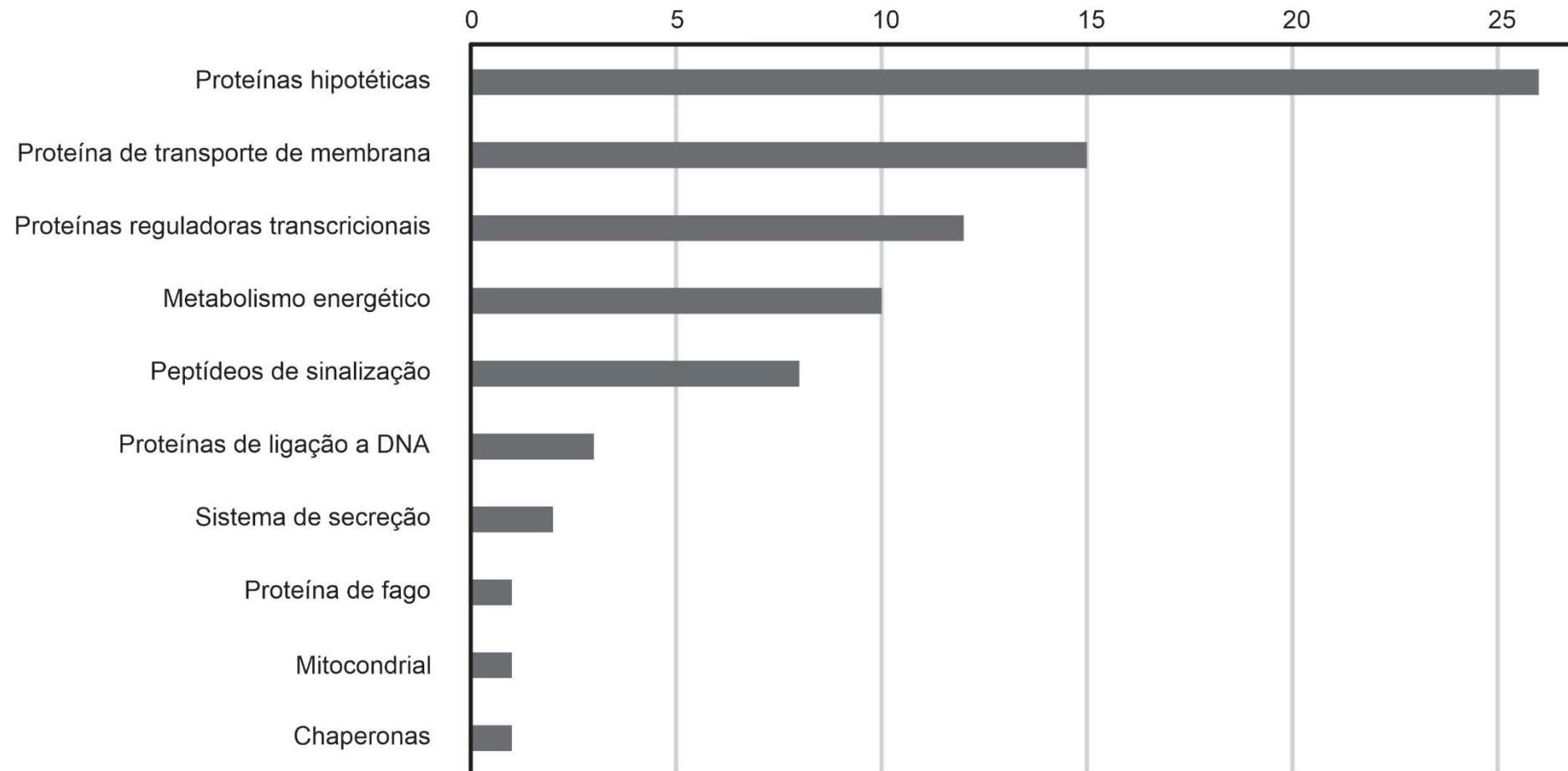
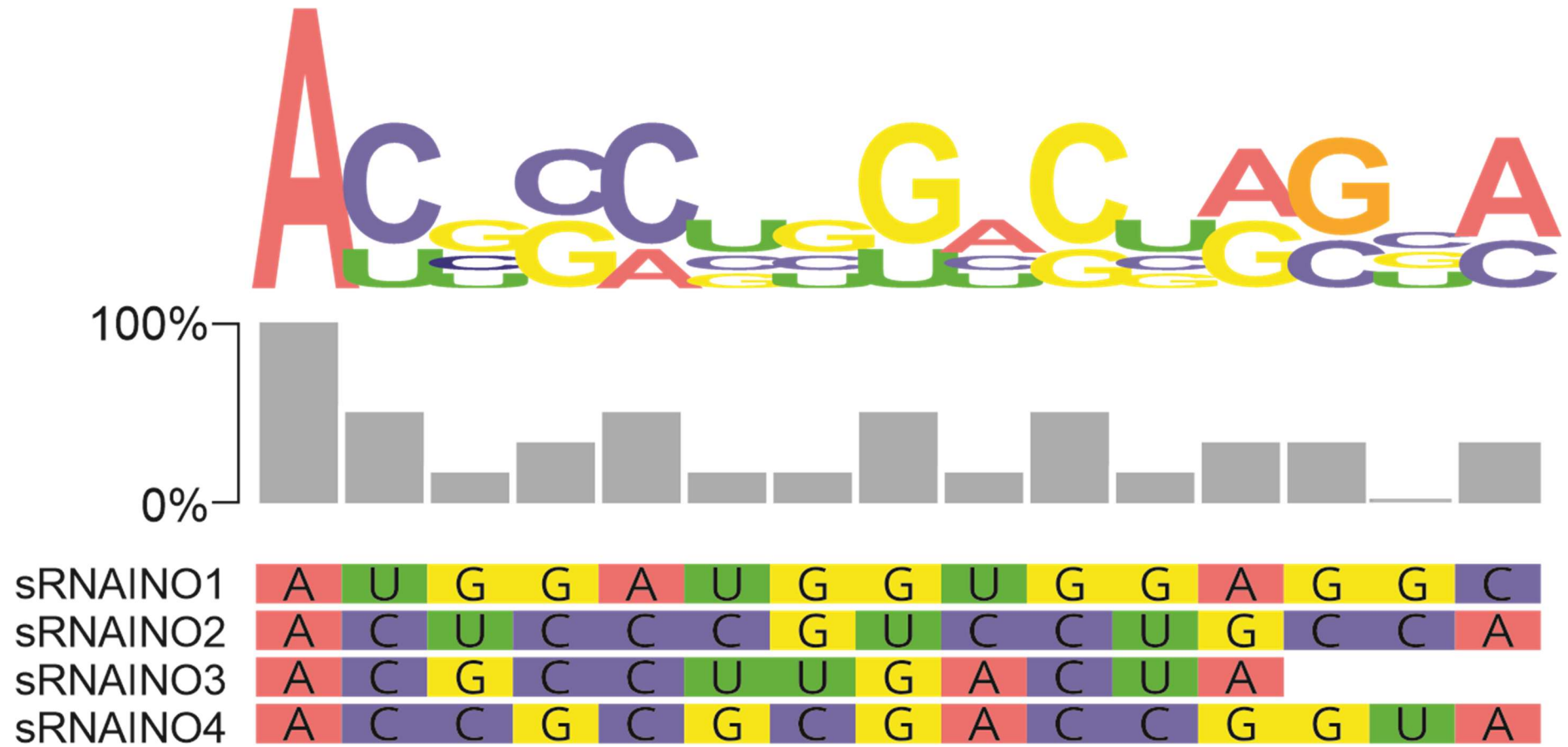


FIGURA SUPLEMENTAR 1



TABELAS

Tabela 1. Pequenos RNAs preditos *in silico* a partir do genoma do RSIBR1

ID	Tamanho (nucleotídeos)	Famílias no Rfam	Strand	Sítios de ligação preferencial [#]	Alvos no cromossomo	Alvos no megaplasmídeo
sRNAINO1	68	Streptomyces-metKH RNA motif	+	3' AUGGAUGGUGGAGGC 5'	P	P
sRNAINO2	115	-	+	3' ACGCCUUGACUA 5'	P	P
sRNAINO3	76	Streptomyces longwoodensis 5' ureB small RNA	+	3' ACCGCGCGACCGGUA 5'	P	P
sRNAINO4	303	-	+	3' ACUCCCGUCCUGCCA 5'	P	P
sRNAINO5	79	Streptomyces sp. F-1 5' ureB small RNA	+	-	A	A
sRNAINO6	75	Xanthomonas oryzae sX9	+	-	A	A

- Determinado pelo TargetRNA2

P - Presente e A - Ausente

Tabela Suplementar 1. Informação dos primers usados para detecção dos sRNAINOs não associados a ORFs por RT-PCR

sRNA	Sequência dos primers	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do produto (pb)
SRNAINO1	5' TTTCCGGAGGTGGTAGGTACGTGG 3' CGCTTCGCTGCGGGCGGG	69	68
SRNAINO2	5' GACCGTTCGGTCATGCAA 3' TTACCCCGTTCGGAGTGA	55	115
SRNAINO4	5' TTCGATGCGCGTGCCGGT 3' CTCCCAACCCTCACCTGTC TTC	67	303

CAPÍTULO 4

OS HOSPEDEIROS SÃO OS PRINCIPAIS IMPULSIONADORES DA EVOLUÇÃO DOS TUBULAVÍRUS.

Rezende R. R., Morgan T., Mendes S. F., Oliveira P. H. A., Quadros A. F. F., Zerbini F. M. e Alfenas-Zerbini, P. Os hospedeiros são os principais impulsionadores da evolução dos tubulavírus. Será submetido.

Os hospedeiros são os principais impulsionadores da evolução dos tubulavírus.

Rafael Reis de Rezende^a, Túlio Morgan^a, Sávio Ferreira Mendes^a, Pedro Henrique Antunes de Oliveira^b, Ayane Fernanda Ferreira Quadros^c, Francisco Murilo Zerbini^c e Poliane Alfenas-Zerbini^{a#}

^aDepartamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

^bDepartamento de Matemática, Universidade Federal do Paraná, Cx. Postal 19.081, Curitiba, Paraná, Brazil

^cDepartamento de Fitopatologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

#Autor para correspondência: Poliane Alfenas-Zerbini; e-mail: palfenas@ufv.br

Palavras-chave: Tubulavirus, evolução dos tubulavírus e hospedeiros dos tubulaviruses.

RESUMO

Tubulavírus são vírus filamentosos com genomas de DNA fita simples circular que infectam procariotos. A biologia e a aplicação biotecnológica dos tubulavírus têm sido amplamente exploradas, contudo, estudos sobre a evolução desse grupo são escassos. Em estudos evolutivos, o uso de reconstrução filogenética utilizando sequências genômicas completas é um método ideal para descrever a evolução dos organismos. Neste trabalho foi obtida uma reconstrução filogenética com 159 genomas completos de tubulavírus a qual evidenciou a formação de seis clados que se relacionam com os seus hospedeiros. Os clados mostraram especificidades quanto ao conteúdo GC, tamanho do genoma e ocorrência de genes ortólogos. Não foram observados eventos de recombinação homóloga entre os tubulavírus de diferentes clados, reforçando assim que esses grupos são evolutivamente distintos. Além disso, não foi detectado a ocorrência de genes ortólogos entre todos os tubulavírus. Ao contrário, foi observado uma maior ocorrência de genes ortólogos compartilhados por sequências pertencentes ao mesmo clado, reforçando a divergência evolutiva entre os grupos. Até mesmo a sequência codificadora da proteína pl — encontrada em todos os genomas dos tubulavírus — a análise de ortologia revelou que esse gene é composto por cinco grupos ortólogos distintos. A reconstrução filogenética usando sequências da proteína pl resultou na formação de clados discordantes com os clados formados na reconstrução filogenéticas utilizando genomas completos. Além disso, os clado formados na reconstrução filogenética utilizando a sequência de aminoácido da pl também não mostram relação com conteúdo GC, tamanho do genoma e hospedeiros. Após enriquecimento da filogenia com sequências de profagos de tubulavírus integrados em genomas de *Ralstonia* spp. e *Xanthomonas* spp., a associação dos clados com hospedeiros ficou mais nítida. Coletivamente, os resultados deste trabalho mostraram que a evolução dos tubulavírus é impulsionada principalmente pelos hospedeiros. Dessa forma, este trabalho pode ajudar a inferir sobre biologia e os possíveis hospedeiros das sequências de tubulavírus identificados a partir de estudos de metagenômica. A associação entre os conteúdos GC, os tamanhos de genomas e os hospedeiros com a história evolutivas destes vírus, evidenciada neste trabalho, indicam que a filogenia obtida a partir dos genomas completos apresenta um potencial método para classificação taxonômica da ordem *Tubulavirales*.

INTRODUÇÃO

Tubulavírus possuem partícula viral filamentosa flexível que infectam procariotos presentes em diferentes nichos ecológicos (Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Roux *et al.*, 2019). Até recentemente os tubulavírus eram classificados dentro uma única família denominada *Inoviridae*, porém atualmente os tubulavírus estão classificados em três famílias (*Inoviridae*, *Plectroviridae* e *Paulinoviridae*) (Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Koonin *et al.*, 2020; Krupovic *et al.*, 2021). Durante a infecção, os tubulavírus podem integrar seu genoma no cromossomo do hospedeiro ou permanecerem na forma episomal. No último caso, o genoma é replicado por círculo rolante, e novas partículas virais são produzidas (Rakonjac *et al.*, 2011, 2017; Hay & Lithgow, 2019). As partículas são transportadas através da membrana e da parede celular para fora da célula sem gerar lise resultando assim em uma infecção crônica. (Hay & Lithgow, 2019). Além disso, uma característica comum dos tubulavírus é a indução de alterações fenotípicas da célula hospedeira (Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Hay & Lithgow, 2019). Um exemplo muito estudado é o *Vibrio* phage CTX que infecta a bactéria *Vibrio cholerae*, o qual carrega os genes *ctxA* e *ctxB* importantes para o *V. cholerae* causar a doença cólera (Choi *et al.*, 2010a; Lee *et al.*, 2010). Esses eventos são comuns resultando em distintas alterações fenotípicas, como, por exemplo, aumento ou redução de virulência em bactérias fitopatogênicas (Addy *et al.*, 2012a,b; Ilyina, 2015; Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Shapiro & Turner, 2018).

A biologia e aplicação biotecnológica dos tubulavírus tem sido bastante estudadas, entretanto a evolução desse grupo de vírus tem permanecido pouco explorada (Hay & Lithgow, 2019). Estudos de tubulavírus que infectam bactérias do gênero *Ralstonia* mostraram que esses tubulavírus se separam em duas linhagens evolutivas denominadas RSM e RSS, as quais afetam a fisiologia do hospedeiro de forma distinta (Askora & Yamada, 2015; Almeida *et al.*, 2021). Reconstruções filogenéticas usando os genes *pVIII* (*major coat protein*) e *pl* (*Zot protein*) de tubulavírus que infectam *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp., *Ralstonia* spp., *Stenotrophomonas* spp., enterobactérias e *Propionibacterium freudenreichii*, sugerem a existência de uma conexão entre os hospedeiros e os clados formados (Mai-Prochnow *et al.*, 2015). De modo semelhante, uma análise de agrupamento baseada em conteúdo genético com base em mais de 10.000 sequências de tubulavírus obtidas a partir de metagenomas e genomas de procariotos

revelou a formação de grupos também relacionados aos hospedeiros (Roux *et al.*, 2019).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo explorar a história evolutiva e suas possíveis relações com a biologia dos tubulavírus utilizando sequências de genomas completos. A reconstrução filogenética revelou a formação de seis clados. Os clados formados também possuem diferenças em relação ao conteúdo CG, tamanho do genoma e presença de genes ortólogos. Em especial, a análise de ortologia mostrou ausência de genes ortólogos entre todas as sequências de tubulavírus. Por fim, foi observado que a formação dos clados está relacionada aos hospedeiros destes vírus. Essa relação fica mais evidente quando a filogenia é enriquecida com sequências de tubulavírus que estão em estado de profagos obtidas a partir de sequências de genomas completos das bactérias hospedeiras. Em conjunto, esses resultados evidenciam que a evolução dos tubulavírus é direcionada primariamente por seus hospedeiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Conjunto de Dados

Todas as sequências de genomas completos de tubulavírus foram obtidas do GenBank em setembro de 2020, com os seguintes parâmetros: nucleotídeo: *tubulavirales*, *paulinovirus*, *plectovirus* e *inovirus*; espécie: vírus; tipos de moléculas: genomic RNA/DNA. Em seguida, o conjunto de dados foi inspecionado manualmente para remover possíveis sequências genômicas incompletas. Todas as sequências foram ajustadas para terem o nucleotídeo 1 no códon de iniciação (ATG) da proteína de morfogênese pl. Para isso, sequências da proteína pl foram identificadas usando HMMsearch (Johnson *et al.*, 2010) usando HMMs construídos por Roux *et al.*, (2019), selecionando a ORF com maior valor de score. Para eliminar redundâncias, as sequências ajustadas foram submetidas ao CD-HIT v.4.8.1 (Li & Godzik, 2006) (parâmetros: -c 1 -G 1 -d 1000 -l 500). As sequências de tubulavírus utilizadas nas análises estão listadas na Tabela Suplementar 1. Sequências completas do rRNA 16s dos hospedeiros de tubulavírus foram obtidas do GenBank em março de 2021, com os parâmetros de busca: nucleotídeo: "nome do hospedeiro de tubulavírus"; sequência completa do rRNA 16s; espécie: bactérias, tipos de moléculas: rRNA (Tabela Suplementar 2).

Análise evolutiva

A reconstrução filogenética foi realizada utilizando o programa RAxML v.8.2.12 (Stamatakis, 2014). As sequências foram alinhadas com MAFFT v.7.471 (Nakamura *et al.*, 2018) e o melhor modelo de substituição foi determinado por ModelTest-NG v.0.1.7 (Darriba *et al.*, 2020). A árvore filogenética foi reconstruída usando o melhor modelo de substituição (indicado na legenda de cada figura) incluindo teste de bootstrap com 10.000 repetições. Comparações par-a-par foram realizadas usando o mesmo conjunto de dados usados na filogenia através do programa SDT com alinhador MAFFT (Muhire *et al.*, 2014).

O conjunto de dados de ORFs dos genomas de tubulavírus foi determinado usando GeneMarkS v.4.30 (Besemer *et al.*, 2001), e os genes ortólogos foram inferidos usando Orthofinder v.2.3.3 (Emms & Kelly, 2019).

Os eventos de recombinação foram determinados usando o programa RDP4 (Martin *et al.*, 2015), sendo considerados os eventos de recombinação identificados por pelo menos quatro algoritmos com valores $p < 1,0 \times 10^{-6}$.

Análise estatística

Todos os testes estatísticos, escalonamento multidimensional não Métrico (*non-metric Multidimensional Scaling* - nMDS) e a análise de correlação (Akoglu, 2018) foram executados no ambiente R v.3.6.3 (R Core Team, 2021), e as figuras foram geradas usando o pacote ggplot2 (Wickham, 2009).

RESULTADOS

A filogenia do genoma completo dos tubulavírus revela a formação de seis clados correlacionados às características biológicas distintas

Inicialmente, foi avaliado quão diversos são os tubulavírus aqui estudados. Para este objetivo, foi realizada análise de comparação de sequências dos genomas baseada em valores de identidade obtidos por comparações par-a-par clusterizados usando nMDS (Figura 1A). A formação de dois clusters foi observada, sendo que em ambos os clusters é notável uma ampla distribuição das sequências revelando heterogeneidade em relação aos valores de identidade compartilhados. Em seguida, analisamos a distribuição dos valores de identidade par-a-par das sequências (Figura 1B). A maior parte dos valores de identidade par-a-par dos tubulavírus ocorrem entre 40 – 50% de identidade. Já os valores de identidade acima de 80% apresentam uma menor proporção. Desta forma, fica evidente que as sequências apresentam uma alta diversidade.

Para inferir sobre a história evolutiva dos tubulavírus, foi realizada uma análise filogenética usando sequências de genoma completo dos tubulavírus disponíveis no GenBank (Tabela suplementar 1). Foi possível observar a formação de seis clados bem suportados estatisticamente (Figura 2). Os clados 1 e 2 apresentaram uma maior divergência evolutiva em relação aos outros clados. Ao contrário, os clados 3, 4, 5 e 6 apresentaram uma menor divergência entre se. Além disso, nos clados 3, 4, 5 e 6 foram agrupadas as maiorias das sequências de metagenomas. Apenas duas sequências, ambas de origem de metagenomas, não agruparam em nenhum dos clados formados.

O clado 1 é composto por tubulavírus que infectam bactérias de diferentes filos (*Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Deinococcus-Thermus*) e gêneros (*Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Propionibacterium* e *Thermus*), sendo este o clado mais diversos em relação aos hospedeiros. Entretanto, é possível observar que a maioria dos hospedeiros (66%) são *Proteobacterias* fitopatogênicas dos gêneros *Ralstonia* e *Xanthomonas*. Quatro tubulavírus infectam a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, uma bactéria cosmopolita encontrada em diversos ambientes, mas principalmente em associação com plantas, sendo promotoras de crescimento (Liu *et al.*, 2012; Petrova *et al.*, 2014; An & Berg, 2018). Observação detalhada da estrutura deste clado revelou a existência de quatro linhagens evolutivas (Figura suplementar

1). Uma linhagem é formada pelos tubulavírus que infectam bactérias dos gêneros *Xanthomonas* e *Stenotrophomonas*. Já a outra linhagem é formada por tubulavírus que infectam bactérias do gênero *Ralstonia*. Por fim, há duas linhagens de tubulavírus que possuem biologia distinta dos outros membros deste clado, os vírus *Thermus* phage phiOH3, *Thermus* phage phiOH16 e o *Propionibacterium* phage phiB5. Os tubulavírus *Thermus* phage phiOH3 e *Thermus* phage phiOH16 infectam a bactéria extremófila *Thermus thermophilus* (Oshima & Imahori, 1974; Chopin *et al.*, 2002). O *Propionibacterium* phage phiB5 — que infecta a bactéria *Propionibacterium freudenreichii* comumente utilizada na produção de queijo e como probiótico — que é o único tubulavírus descrito até o presente infectando uma bactéria gram-positiva (Chopin *et al.*, 2002; de Rezende Rodovalho *et al.*, 2021).

O clado 2 é formado exclusivamente por tubulavírus que infectam *Vibrio cholerae*, bactéria pertencente ao filo *Proteobacteria*. No clado 3 estão agrupados tubulavírus que infectam diferentes espécies de bactérias do gênero *Vibrio*, incluindo bactérias da espécie *V. cholerae*. Foi observado que todos os tubulavírus do clado 2 possuem os genes *ctxA* e *ctxB*, responsáveis por conferir patogenicidade para *V. cholerae*, porém esses genes estão ausentes em todos os tubulavírus agrupados no clado 3, incluindo aqueles que infectam *Vibrio cholerae*.

Dois tubulavírus do clado 4 infectam bactérias do gênero *Pseudomonas*, família *Pseudomonadaceae* que são bactérias patogênicas oportunistas, cosmopolitas de vida livre, capazes de infectar e colonizar animais e plantas (Silby *et al.*, 2011). O restante das sequências pertencentes ao clado 4 são tubulavírus não caracterizados cujas sequências são de origem de metagenomas, portanto, sem hospedeiro identificado.

Tubulavírus pertencentes ao clado 5 infectam bactérias do gênero *Spiroplasma* (filo *Tenericutes*; classe *Mollicutes*), as quais não possuem parede celular e tem célula em formato helicoidal. Além disso, nesse clado também está presente o tubulavírus *Acholeplasma* phage MV-L1 que infecta a bactéria *Acholeplasma laidlawii* (classe *Mollicutes*), a qual difere dos *Spiroplasma* pelo formato de bastão pleomórfico. Neste clado também se agrupam sequências provenientes de metagenoma, com hospedeiros não caracterizados. Tanto *Acholeplasma* sp. como *Spiroplasma* spp. usam um código genético alternativo, diferentes da maioria dos demais procariotos, conseqüentemente os tubulavírus que infectam essas bactérias usam o mesmo código genético, diferente dos demais tubulavírus (Harne *et al.*, 2020).

Similar ao clado 1, o clado 6 é composto por tubulavírus que infectam bactérias de diferentes gêneros, porém todas pertencentes ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*. A maioria dos tubulavírus pertencentes ao clado 6 infectam bactérias dos gêneros *Escherichia* e *Salmonella*, ambos pertencentes à família de bactérias entéricas, *Enterobacteriaceae* (Morales-López *et al.*, 2019).

As sequências de tubulavírus obtidas a partir de estudos de metagenomas foram distribuídas em todos os clados com exceção do clado 2. Sendo que apenas duas sequências obtidas de metagenomas não agruparam em nenhum dos clados (Figura 1A).

Em seguida, foi analisado se os tubulavírus agrupados em cada clado apresentam diferenças em relação a conteúdo CG e tamanho do genoma (Figura 2). Em relação ao conteúdo CG, os vírus agrupados nos clados 2 ($44,86 \pm 0,94$ % CG), 3 ($44,34 \pm 1,8$ % CG), 4 ($44,16 \pm 2,53$ % CG) e 6 ($42,81 \pm 5,86$) não diferem em relação ao conteúdo GC, com exceção dos clados 2 e 6 que diferem entre si. Já os vírus agrupados no clado 1 ($60,52 \pm 1,71$ % CG) apresentaram um valor de conteúdo GC maior que os demais tubulavírus, e o vírus presentes no clado 5 ($33,23 \pm 6,38$ % CG) mostraram um valor de conteúdo GC menor em comparação com outros tubulavírus (Figura 3A). Além disso, observamos que os genomas de tubulavírus apresentam conteúdo GC semelhante ao dos seus hospedeiros. O tubulavírus os pertencentes aos clados 2, 3, 4 e 6 apresentam o conteúdo GC estatisticamente iguais e semelhante ao dos seus hospedeiros. As diferenças do conteúdo GC dos tubulavírus agrupados nos clados 1 e 5 em relação aos demais tubulavírus, tornam o conteúdo GC semelhantes aos valores de conteúdo GC de seus hospedeiros.

Em relação ao tamanho do genoma foram observadas dentre os tubulavírus agrupados em cada clado os seguintes valores, clado 1 ($7.124 \pm 982,9$ nt), clado 2 (5.970 ± 3.328 nt), clado 3 ($7.383 \pm 708,6$ nt), 4 ($5.452 \pm 490,1$ nt), 5 (6.359 ± 1225 nt) e 6 ($6.381 \pm 832,1$ nt) (Figura 3B). Na determinação do valor médio do tamanho dos genomas dos tubulavírus foram excluídas algumas sequências dos clados 2 e 3 que correspondem a profagos com várias cópias do genoma em tandem (Choi *et al.*, 2010b; Lee *et al.*, 2010). Os tubulavírus presentes em cada clados exibiram valores médios do tamanho genoma específicos para cada clado, sendo que alguns clados apresentaram diferença estatísticas entre si e outros não.

Eventos de recombinação detectados apenas entre tubulavírus de um mesmo clado evidenciam distanciamento evolutivo

A recombinação homóloga é um evento que contribui para a diversidade genética e evolução dos organismos. Foi possível detectar a ocorrência de 74 eventos de recombinação entre os genomas de tubulavírus analisados (Figura 4 e Tabela suplementar 2). Foram detectados 28 eventos de recombinação entre tubulavírus presentes no clado 1, 20 eventos entre tubulavírus presentes no clado 3 e 19 eventos no clado 2. Nos outros clados, foram detectados um menor número de eventos. No clado 6 foram detectados quatro eventos, no clado 4 foram detectados três eventos, e por fim no clado 5 foram detectados apenas um evento apenas. Não foram detectados eventos de recombinação entre sequências virais agrupadas em diferentes clados. Deste modo, a ocorrência de eventos de recombinação entre tubulavírus de um mesmo clado revela um distanciamento evolutivo entre esses grupos.

Os clados de tubulavirus mostram diferenças na composição de genes ortólogos

Genes ortólogos (OG) estão presentes em indivíduos diferentes e são oriundos de um ancestral comum. Duplicação gênica, mutações, transferência horizontal de genes e recombinação são eventos geradores de variabilidade genética e direcionam alterações em genes ortólogos, levando à diversificação de sequência e de função (Koonin, 2005; Tekaiia, 2016). Dessa forma, procuramos avaliar a ocorrência de genes ortólogos nos genomas de tubulavírus e sua possível correlação com a formação de clados.

Os tubulavirus agrupados nos clados 1, 3 e 5 mostraram um maior número de ocorrências únicas de genes ortólogos, 46, 24 e 22 OG respectivamente. Nos clados 2, 4, e 6, os tubulavirus apresentaram respectivamente 15, 10 e 11 genes ortólogos (Figura 5A). Em todos os clados, os tubulavirus compartilham de um a três genes ortólogos com tubulavirus agrupados em outros clados. O número de genes ortólogos compartilhados por tubulavirus de diferentes clados diminui conforme aumenta-se o número de clados comparados (Figura 5B). Não foi observado o compartilhamento de nenhum gene ortólogos entre todos os tubulavirus.

A análise de genes ortólogos mostrou que nem mesmo a proteína pl, ubíqua nos genomas de todos os tubulavírus (Roux *et al.*, 2019), apresenta um único ortólogo,

o que indicaria um única linhagem evolutiva. Ao contrário, a proteína pl apresenta cinco grupos de ortólogos que foram denominados pl.1, pl.2, pl.3, pl.4 e pl.5 (Figura 5B). Todos os tubulavírus de cada clado apresentam um ortólogo de pl predominante, com exceção dos tubulavírus do clado 1 que apresentam um número de ocorrências aproximados entre os ortólogos pl.4 e pl.5. Os tubulavírus presentes no clado 6 apresentam a ocorrência dos ortólogos pl.5 (predominante) e pl.3. Já os tubulavírus do clado 2 apresentam predominantemente a ocorrência do ortólogo pl.5, com a ocorrência também do ortólogo da pl.2. Por fim, os tubulavírus do clado 5 apresentam uma predominância do ortólogo pl.4 e algumas ocorrências dos ortólogos pl.2 e pl.5 (Figura 5B). As divergências evolutivas dos ortólogos da proteína pl ficam evidentes quando realizamos reconstrução filogenética usando sequências de aminoácidos da proteína pl. Na árvore filogenética da pl os cladogramas formados são compostos por tubulavírus com características biológicas distintas, diferente do que foi observado na filogenia usando genoma completo (Figura suplementar 2).

Em conjunto, os resultados da análise de ortologia que se baseiam em similaridade de sequencias reforçam que a existências de considerável divergência evolutiva entre os tubulavírus de cladogramas diferentes, a ponto de não ser detectado uma conexão evolutiva nítidas entre eles.

Os hospedeiros são o principal fator que direciona a evolução dos tubulavírus

Vários componentes podem atuar no direcionamento da evolução de uma determinada população. Por exemplo, a divergência evolutiva pode estar associada ao isolamento geográfico, resultando em especiação (Schluter, 2001). Um outro fator que atua direcionando a evolução dos vírus é a relação hospedeiro-vírus. Para avaliar qual desses dois fatores é o principal componente que direciona a evolução dos tubulavírus, determinamos a correlação entre a identidade de dois genomas de tubulavírus com às distâncias geográficas desses vírus; e com a identidade das sequências de 16S do RNA ribossomal dos hospedeiros desses vírus. Foi possível observar uma correlação fraca entre as identidades obtidas pela comparação dos genomas dos tubulavírus com a localização geográfica. Em contraste, observamos uma correlação positiva entre comparação dos genomas dos tubulavírus com a comparação das sequências de 16s dos hospedeiros (Tabela 1). Essa diferença fica mais clara quando analisamos o valor do coeficiente de correlação de Spearman, observando uma correlação positiva (+ 0,6497274) entre pares de tubulavírus e seus

respectivos hospedeiros. Ao contrário, observamos uma correlação negativa (-0,210 3514) entre comparação das sequências com distância geográfica (Tabela 1). Esse resultado, sugere que a evolução dos tubulavírus é modulada predominantemente pelos hospedeiros do que pelo isolamento geográfico.

Analisando cada um dos clados, fica evidente uma predominância da ocorrência de tubulavírus que infectam grupos específicos de hospedeiros (Tabela 2). Desta forma, para avaliar com mais detalhe se o hospedeiro é o principal fator direcionando a evolução dos tubulavírus, realizamos uma análise filogenética usando as sequências de 16S do RNA ribossomal dos hospedeiros dos tubulavírus. A reconstrução filogenética dos hospedeiros revelou a formação de sete clados (Figura suplementar 3). Dois clados abrigam as bactérias do gênero *Vibrio*. Um clado abrigou os gêneros *Escherichia* e *Salmonella*. O gênero *Ralstonia* formou um clado específico, enquanto os gêneros *Xanthomonas* e *Stenotrophomonas* formaram um clado, e as bactérias pertencentes ao gênero *Spiroplasma* formaram um clado. Desta forma, foi evidenciado que os hospedeiros foram agrupados em clados à semelhança dos clados formados na filogenia dos tubulavírus (Figura suplementar 3 e Figura 2). Houve apenas um caso em que a formação dos clados dos hospedeiros não correspondeu com a formação dos clados dos tubulavírus. A bactéria *Propionibacterium* se agrupou com as bactérias do gênero *Spiroplasma*, contudo o tubulavírus *Propionibacterium* phage phiB5 pertence ao clado 1 na filogenia dos tubulavírus. Evidenciou-se assim uma similaridade entre a filogenia dos hospedeiros e a filogenia dos tubulavírus.

Uma nova reconstrução filogenética foi realizada com um conjunto de dados enriquecido com sequências de tubulavírus na forma de profagos presentes em genomas de *Ralstonia* spp. e *Xanthomonas* spp. (Gonçalves *et al.*, 2021) (Ferreira *et al.*, 2021 em preparo). Após enriquecimento com as sequências de profagos foi possível observar uma única mudança topológica na árvore filogenética, referente ao fago *Enterobacteria* phage If1 (If1) anteriormente agrupado no clado 6, que nessa árvore se tornou uma sequência órfã de clado (Figura 6).

Foi possível observar que houve uma maior divergência entre os tubulavírus deste clado, de forma que os tubulavírus que infectam *Ralstonia* spp., *Xanthomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Thermus thermophilus* e *Propionibacterium freudenreichii* divergiram formando quatro novos clados identificados como 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4 (Figura 6A). O clado 1.1 foi composto por tubulavírus do tipo RSM de *Ralstonia* spp., enquanto o clado 1.3 contém tubulavírus do tipo RSS que infectam

Ralstonia (Askora & Yamada, 2015). Já o clado 1.2 foi formado majoritariamente por tubulavírus que infectam *Ralstonia* spp. na forma de profago (Figura 6B). Os tubulavírus que infectam *Xanthomonas* spp. e *Stenotrophomonas* spp. ficaram agrupados em um único clado (1.4), revelando que compartilham maior proximidade evolutiva. Por sua vez, os tubulavírus que infectam *Thermus thermophilus* e *Propionibacterium freudenreichii* são claramente divergentes, já que não agruparam em nenhum clado. Apesar de poucas sequências terem sido utilizadas, esse resultado indicou que os tubulavírus podem formar novos clados à medida que novas sequências estejam disponíveis

Dessa forma, após o enriquecimento com novas sequências de tubulavírus que infectam *Xanthomonas* spp. e *Ralstonia* spp., as divergências entre as sequências do clado 1 ficaram mais evidentes, sendo observada a formação de novos clados bem definidos e estatisticamente suportados com clara correlação com os hospedeiros destes tubulavírus, consistente com a hipótese de que a evolução desse grupo de vírus é direcionada principalmente por seus hospedeiros.

DISCUSSÃO

A formação dos clados filogenéticos de tubulavírus relacionados aos seus hospedeiros evidencia que a evolução desses vírus é majoritariamente direcionada por estes. Em uma análise de clusterização baseada em composição gênica de sequências de mais de 10.000 tubulavírus, também foi possível observar a formação de clusters associados aos hospedeiros (Roux *et al.*, 2019).

Eventos de recombinação homóloga se mostram presentes em tubulavírus, porém ocorrendo apenas entre os vírus de um mesmo clado. Esse fato é um indicativo de um isolamento dos tubulavírus associado aos hospedeiros os quais apresentam características biológicas e nichos ecológicos distintos. Isso fica mais claro quando observamos no clado 1 eventos de recombinação entre os tubulavírus que infectam as bactérias do gênero *Xanthomonas* e *Stenotrophomonas*, as quais são de uma mesma família (*Xanthomonadaceae*), e ocupam um mesmo nicho ecológicos, neste caso plantas (Tabela Suplementar 3).

A ocorrência e distribuição de genes ortólogos nos genomas de tubulavírus foi bem correlacionada com os clados observados no modelo filogenético, relativamente baixo o compartilhamento de ortólogos entre tubulavírus de clados distintos, reforçando a hipótese de que a evolução dos tubulavírus é direcionada pelos hospedeiros. Stassen *et al.*, (1992), realizaram comparação da composição gênica das sequências dos tubulavírus I2-2, IKe, and Ff, todos tubulavírus que infectam *Escherichia coli*. Os autores demonstraram que esses vírus são evolutivamente próximos. No entanto, ao analisar com mais detalhes os genes envolvidos na replicação e as origens de replicação desses vírus constataram ausência de homologia entre eles, fato semelhante ao observado na análise de ortologia deste trabalho (Figura 5). Dois eventos que podem explicar como os clados abrigam tubulavírus evolucionariamente próximos, porém com proteínas homologas distintas são eventos de *spillover* e transferência horizontal de genes. No caso de *spillover*, os clados foram formados a partir de diferentes tubulavírus que infectavam hospedeiros não relacionados. A outra explicação é que os clados foram formados a partir de tubulavírus relacionados, no entanto, ao longo do tempo esses vírus adquiriam sequências não homólogas por meio de eventos de transferência horizontal de genes. Teoricamente, eventos de recombinação também poderiam também explicar esse fenômeno, contudo não fomos capazes de detectar eventos de recombinação entre

tubulavirus de clados diferentes. Associado com os resultados aqui apresentados, hipotetizamos que vírus distintos têm convergidos pela força evolutiva dos hospedeiros evidenciada neste trabalho, em especial quando analisamos como mais detalhes, por exemplo, a proteína pl.

A maioria dos grupos de genes ortólogos são compartilhados por tubulavírus de um mesmo clado, ou seja, por tubulavírus que infectam o mesmo hospedeiro ou hospedeiros relacionados, que sugere que a evolução dos genes ortólogos pode ser direcionada pela associação com hospedeiro. A hipótese de que a evolução dos genes ortólogos direcionado pelos hospedeiros fica mais evidente quando observamos que existe um número muito pequeno de genes ortólogos compartilhado entre sequências agrupadas nos clados distintos, indicando assim uma possível especialização dos genes direcionada para infectar hospedeiros específicos. Por exemplo, a ocorrência dos genes *ctxA* e *ctxB* apenas nos tubulavírus do clado 2, os quais infectam as bactérias *Vibrio cholerae* capazes de causar cólera, suportam fortemente esta hipótese.

A análise de genes ortólogos revelou que a proteína pl pode ser agrupada em cinco grupos de ortólogos diferentes, ou seja, cinco linhas evolutivas distintas. A proteína pl é um componente fundamental do sistema de morfogênese responsável pela montagem e transporte do vírus através da membrana plasmática e parede celular da célula (Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Hay & Lithgow, 2019). Para um vírus conseguir infectar um hospedeiro com sucesso é necessária uma integração entre o sistema viral e o sistema celular do hospedeiro. Desta forma, a interação vírus-hospedeiro é uma poderosa força modulando a evolução dos vírus em processos de infecção de novos hospedeiros. Sendo a proteína pl a única ocorrendo em todos os tubulavírus e apresenta linhagens evolutivas diferentes, seria interessante investigar se os tubulavírus de clados diferentes, mas que compartilham o mesmo grupo de ortólogos de pl são capazes de infectar os mesmos hospedeiros. Isso permitiria determinar o quão forte é essa relação na interação com hospedeiros e a formação dos clados associado aos hospedeiros que os tubulavirus infectam, como evidenciado neste trabalho.

Plectrovírus (*Acholeplasma fago* MV-L1 e tubulavírus que infectam *Spiroplasma* spp.), têm sido considerados distintos dos demais tubulavírus, neste caso distintos dos vírus da família *Inoviridae*, devido a possuírem partículas no formato de bastonetes rígidos; por usarem um código genético alternativo; e por infectarem

bactérias distintas dos hospedeiros dos outros tubulavirus. Contudo, neste trabalho observamos maior divergência evolutiva nos clados 1 e 2, compostos por inovírus clássicos. Já os plectrovírus, agrupados no clado 5, apresentaram uma menor divergência evolutiva com os clados 3, 4 e 6, que também são compostos por inovírus clássicos. Desta forma, as características biológicas diferenciadas dos plectrovírus não justificam que esses vírus sejam distintos dos demais tubulavirus.

Dado que conhecemos muito pouco sobre a diversidade dos tubulavirus (Figura 1), a adição de novas sequências na análise filogenética provavelmente gerará mudanças, como aqui observado para o fago If1 (Figura 6). Ao realizarmos uma comparação par-a-par com genomas completos dos membros do clado 6 incluindo o If1, fica evidente que esses vírus compartilham baixa identidade, no máximo 57%, em relação aos outros tubulavirus do clado 6 (Figura suplementar 4).

Askora & Yamada (2015) demonstraram que os tubulavirus que infectam bactérias do gênero *Ralstonia* forma duas linhagens evolutivas denominadas como RSM e RSS. Os tubulavirus que infectam *Ralstonia* spp. são divididos nas duas linhagens, RSS e RSM, conforme o arranjo genético e com o mecanismo de integração no genoma do hospedeiro, os quais diferem entre as linhagens. Notavelmente, a reconstrução filogenética usando genomas completos revelou que os tubulavirus RSM e RSS foram agrupados em dois clado separados (Figura 6B — Clado 1.1 e Clado 1.3). Este fato é um indicativo que a reconstrução filogenética usando genoma completo consegue evidenciar associações entre a evolução e as características biológicas dos tubulavirus.

Coletivamente, os resultados deste trabalho mostram que a evolução dos tubulavirus é impulsionada principalmente pelo hospedeiro. Essa relação fica mais clara quando consideramos a ocorrência de genes ortólogos e a filogenia dos hospedeiros. Os resultados mostram que a reconstrução da filogenia a partir de genomas completos de tubulavirus pode ser uma ferramenta apropriada para a classificação taxonômica, pois permite associar a história evolutiva com as características biológicas desses vírus. Além disso, pode ser utilizada para inferir sobre hospedeiros de tubulavirus identificados em metagenomas.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, CAPES, CNPq e a Suzano Papel e Celulose pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa pela disponibilização do cluster Júpiter possibilitando assim a realização das análises de bioinformática deste trabalho.

À Doutora Flávia de Oliveira Souza pela leitura e sugestões para este trabalho.

Ao Laboratório de Vírus do departamento de Microbiologia por disponibilizar recursos para executar este trabalho.

REFERÊNCIAS

- Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T, 2012a. The Filamentous Phage ϕ RSS1 Enhances Virulence of Phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on Tomato. *Phytopathology* **102**, 244–251.
- Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T, 2012b. Loss of Virulence of the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* Through Infection by ϕ RSM Filamentous Phages. *Phytopathology* **102**, 469–477.
- Akoglu H, 2018. User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine* **18**, 91–93.
- Almeida JCF, da Silva Xavier A, Cascardo R de S *et al.*, 2021. Genomic and Biological Characterization of *Ralstonia solanacearum* Inovirus Brazil 1, an Inovirus that Alters the Pathogenicity of the Phytopathogen *Ralstonia pseudosolanacearum*. *Microbial Ecology*.
- An S-Q, Berg G, 2018. *Stenotrophomonas maltophilia* . *Trends in Microbiology* **26**, 637–638.
- Askora A, Yamada T, 2015. Two different evolutionary lines of filamentous phages in *Ralstonia solanacearum*: their effects on bacterial virulence. *Frontiers in Genetics* **6**, 1–6.
- Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M, 2001. GeneMarkS: A self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Research* **29**, 2607–2618.
- Choi S, Dunams D, Jiang SC, 2010a. Transfer of cholera toxin genes from O1 to non-O1/O139 strains by vibriophages from California coastal waters. *Journal of Applied Microbiology* **108**, 1015–1022.
- Choi SY, Lee JH, Kim EJ *et al.*, 2010b. Classical RS1 and environmental RS1 elements in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains harbouring a tandem repeat of CTX prophage: revisiting Mozambique in 2005. *Journal of Medical Microbiology* **59**, 302–308.
- Chopin M-C, Rouault A, Ehrlich SD, Gautier M, 2002. Filamentous Phage Active on the Gram-Positive Bacterium *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Bacteriology* **184**, 2030–2033.

- Darriba D, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B, Flouri T, 2020. ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models (K Crandall, Ed.). *Molecular Biology and Evolution* **37**, 291–294.
- Emms DM, Kelly S, 2019. OrthoFinder: Phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biology* **20**, 238.
- Gonçalves OS, Souza F de O, Bruckner FP, Santana MF, Alfenas-Zerbini P, 2021. Widespread distribution of prophages signaling the potential for adaptability and pathogenicity evolution of *Ralstonia solanacearum* species complex. *Genomics* **113**, 992–1000.
- Harne S, Gayathri P, Béven L, 2020. Exploring Spiroplasma Biology: Opportunities and Challenges. *Frontiers in Microbiology* **11**, 2601.
- Hay ID, Lithgow T, 2019. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO reports* **20**.
- Ilyina TS, 2015. Filamentous bacteriophages and their role in the virulence and evolution of pathogenic bacteria. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* **30**, 1–9.
- Johnson LS, Eddy SR, Portugaly E, 2010. Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure. *BMC Bioinformatics* **11**, 1–8.
- Koonin E V., 2005. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics. *Annual Review of Genetics* **39**, 309–338.
- Koonin E V., Dolja V V., Krupovic M *et al.*, 2020. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **84**.
- Krupovic M, Turner D, Morozova V *et al.*, 2021. Bacterial Viruses Subcommittee and Archaeal Viruses Subcommittee of the ICTV: update of taxonomy changes in 2021. *Archives of Virology* **166**, 3239–3244.
- Lee JH, Choi SY, Jeon Y-SS *et al.*, 2010. Classification of hybrid and altered *Vibrio cholerae* strains by CTX prophage and RS1 element structure. *Journal of Microbiology* **47**, 783–788.
- Li W, Godzik A, 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **22**, 1658–1659.

- Liu J, Liu Q, Shen P, Huang YP, 2012. Isolation and characterization of a novel filamentous phage from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Archives of Virology* **157**, 1643–1650.
- Mai-Prochnow A, Hui JGK, Kjelleberg S, Rakonjac J, McDougald D, Rice SA, 2015. 'Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host' (M Smith, Ed.). *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 465–487.
- Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B, 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* **1**.
- Morales-López S, Yepes JA, Prada-Herrera JC, Torres-Jiménez A, 2019. Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. *The Journal of Infection in Developing Countries* **13**, 265–273.
- Muhire BM, Varsani A, Martin DP, 2014. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation (JH Kuhn, Ed.). *PLoS ONE* **9**, e108277.
- Nakamura T, Yamada KD, Tomii K, Katoh K, 2018. Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments (J Hancock, Ed.). *Bioinformatics* **34**, 2490–2492.
- Oshima T, Imahori K, 1974. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *International Journal of Systematic Bacteriology* **24**, 102–112.
- Petrova M, Shcherbatova N, Kurakov A, Mindlin S, 2014. Genomic characterization and integrative properties of phiSMA6 and phiSMA7, two novel filamentous bacteriophages of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Archives of Virology* **159**, 1293–1303.
- R Core Team, 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M, 2011. Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. *Current Issues in Molecular Biology* **13**, 51–76.
- Rakonjac J, Russel M, Khanum S, Brooke SJ, Raji M, 2017. *Filamentous Phage: Structure and Biology*.

- de Rezende Rodovalho V, Lucas Neres Rodrigues D, Jan G, Le Loir Y, Ariston de Carvalho Azevedo V, Guédon E, 2021. *Propionibacterium freudenreichii*: General Characteristics and Probiotic Traits. In: *Prebiotics and Probiotics - From Food to Health [Working Title]*. IntechOpen,.
- Roux S, Krupovic M, Daly RA *et al.*, 2019. Cryptic inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes. *Nature Microbiology* **4**, 1895–1906.
- Schluter D, 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 372–380.
- Shapiro JW, Turner PE, 2018. Evolution of mutualism from parasitism in experimental virus populations. *Evolution* **72**, 707–712.
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW, 2011. Pseudomonas genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews* **35**, 652–680.
- Stamatakis A, 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312.
- Stassen AMPM, Schoenmakers EPMFPM, Yu M, Schoenmakers JGGG, Konings RHNH, 1992. Nucleotide sequence of the genome of the filamentous bacteriophage I2-2: Module evolution of the filamentous phage genome. *Journal of Molecular Evolution* **34**, 141–152.
- Tekaia F, 2016. Inferring Orthologs: Open Questions and Perspectives. *Genomics Insights* **9**, GEI.S37925.
- Wickham H, 2009. *ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. **Análise da diversidade das sequências de tubulavírus.** Os tubulavírus foram clusterizadas usando nMDS com valores de porcentagem de identidade entre as sequências dos tubulavírus (A) mostrando a formação de dois. Comparações par-a-par foram realizadas utilizando o programa SDT com alinhamento pelo MAFFT, em seguida os valores de identidade par-a-par foram utilizados para clusterizar as sequências utilizando nMDS. (B) Distribuição dos valores de identidade entre as sequências dos tubulavírus.

Figura 2. **Árvore filogenética a partir de sequência de genomas completos dos tubulavírus.** Filogenia usando sequências de genomas completos revelou a formação de seis clados bem suportados estatisticamente. As sequências foram alinhadas usando MAFFT; o modelo de substituição GTR foi determinado usando o programa ModelTest-NG. A árvore filogenética foi reconstruída usando o método Maximum likelihood e os pontos indicam valores de *bootstrap* $\geq 75\%$ a partir de 1000 reamostragens. Os tubulavírus obtidos a partir de metagenomas estão indicados com ramos em vermelho e os tubulavírus caracterizados estão indicados com ramos pretos.

Figura 3. **Comparação dos valores de conteúdo GC e tamanho dos tubulavírus agrupados em cada clado.** Comparação estatística das médias de conteúdo GC (A) e tamanhos dos genomas (B) foram realizadas usando ANOVA seguido do Teste de Tukey com $p < 0,0001$.

Figura 4. **Número de eventos de recombinação identificados entre os tubulavírus.** Cada coluna representa o número de eventos identificados em cada clado, sendo que não foi identificado nenhum evento ocorrendo entre os clados.

Figura 5. **Identificação e ocorrência de genes ortólogos em tubulavírus.** (A) A partir dos genomas de tubulavírus, sequências de proteínas foram preditas e grupos de ortólogos foram identificados. Cada linha indica um clado e os valores indicam o número de grupos de genes ortólogos. Na primeira coluna está indicado o número de ortólogos únicos de cada clado. As próximas colunas indicam os números de clados

com a ocorrência de grupos de genes ortólogos em comum com os clados indicados nas linhas. A escala de cor do vermelho para cinza indica maior e menor ocorrência desses grupos respectivamente. (B) Proteína pl apresenta cinco grupos diferentes de genes ortólogos ocorrendo entre os clados. Essa destruição está indicada em B, onde os valores são os números de genes proteínas pl ocorrendo em cada clado e em cada grupo de gene ortólogo.

Figura 6. **Reconstrução filogenética com enriquecimento com sequências de profagos.** Árvore filogenética reconstruída usando o modelo de substituição GTR determinado pelo programa ModelTest-NG e usando o método Maximum likelihood. Os pontos indicam valores de *bootstrap* (1000 repetições) $\geq 75\%$. Em A podemos observar que a topologia global da filogenia não foi afetada com a adição das sequências de profagos, com exceção do clado 2 e um evento de divergência de uma sequência do clado 6 (ramo indicado em vermelho). Em B, observamos que clado 1 após enriquecimento com sequências de profagos (ramos marcados em laranja) formou 4 novos clados. Alguns ramos foram colapsados devido ao grande número de sequências.

Figura suplementar 1. **Clado 1 em detalhes.**

Figura suplementar 2. **Reconstrução filogenética a partir de sequências de aminoácidos das proteínas pl.** Árvore filogenética foi obtida usando o método Maximum likelihood, sendo que sequências foram alinhadas usando o MAFFT e melhor modelo substituição, WAG com Gamma Distributed With Invariant Sites, foi determinado pelo ModelTest-NG. Os pontos indicam valores $\geq 75\%$ do teste de *bootstrap* com 1000 repetições.

Figura suplementar 3. **Filogenia dos hospedeiros dos tubulavírus.** A reconstrução filogenética dos hospedeiros foi realizada utilizando sequência completa do gene 16S dos hospedeiros. As sequências foram alinhadas usando o alinhador MAFFT e melhor modelos de substituição determinado (ModelTest-NG) em seguida reconstrução foi obtida usando o método Maximum likelihood. Os pontos nos ramos indicam valores do teste de *bootstrap* (1000 repetições) $\geq 75\%$. Ramos com muitas sequências foram

colapsados. Cada quadro indica bactérias que compõem o ramo e a qual clado está associado na reconstrução filogenética dos tubulavírus.

Figura suplementar 4. **Comparação par-a-par dos tubulavirus do clado 6.** *Heatmap* dos valores de identidade compartilhados pelos tubulavírus agrupados no clado 6, em destaque o Enterobacteria phage if1 apresentando baixa identidade. A escala a direita da figura contém a relação da porcentagem de identidade compartilhada pelos vírus.

FIGURAS

FIGURA 1

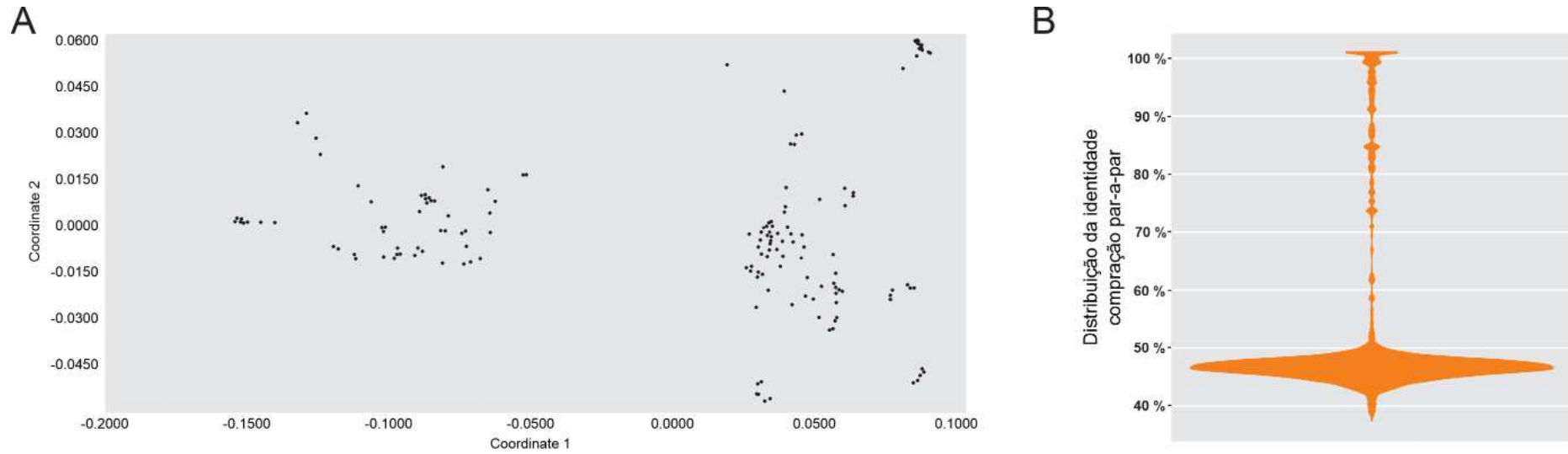


FIGURA 2

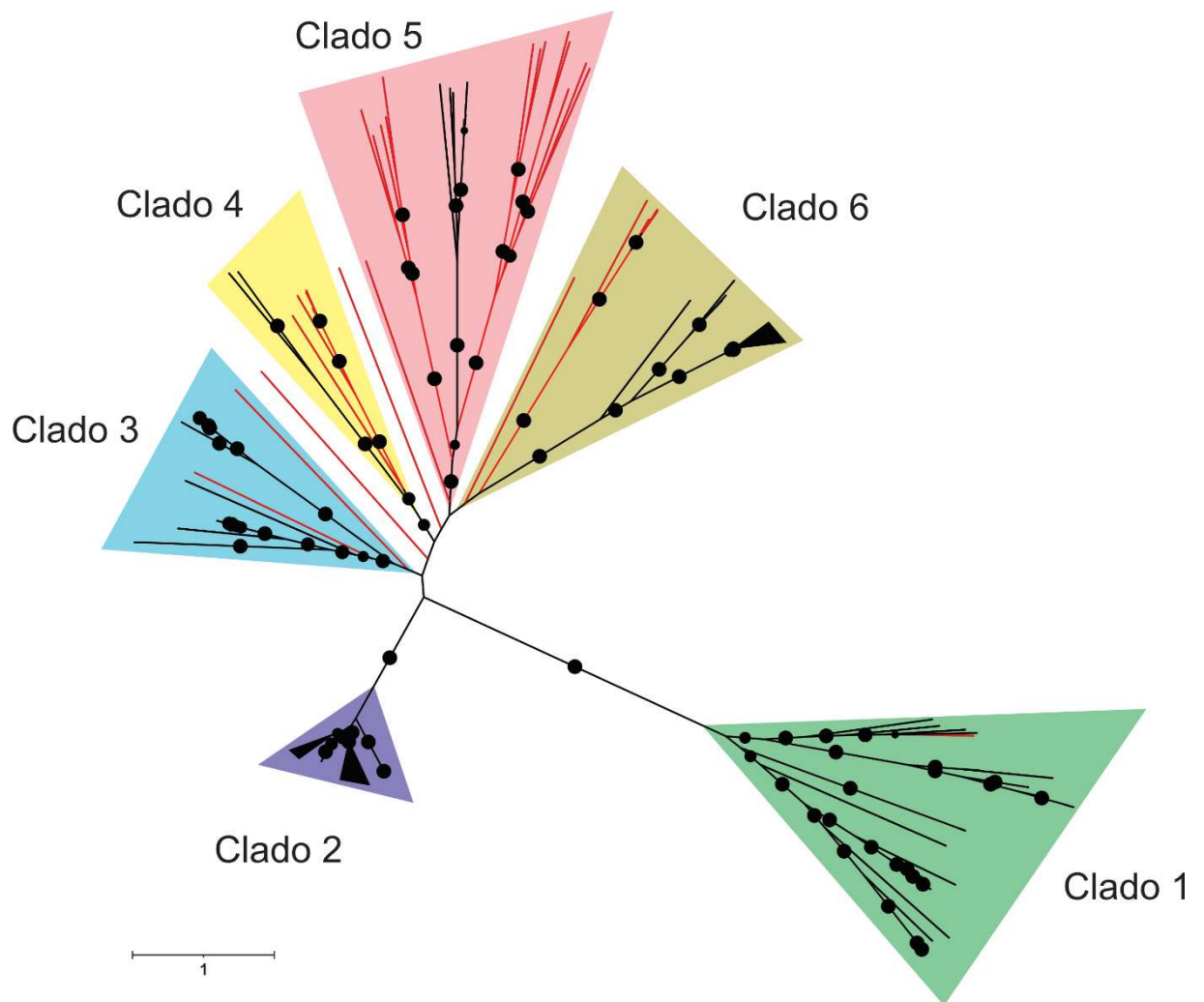


FIGURA 3

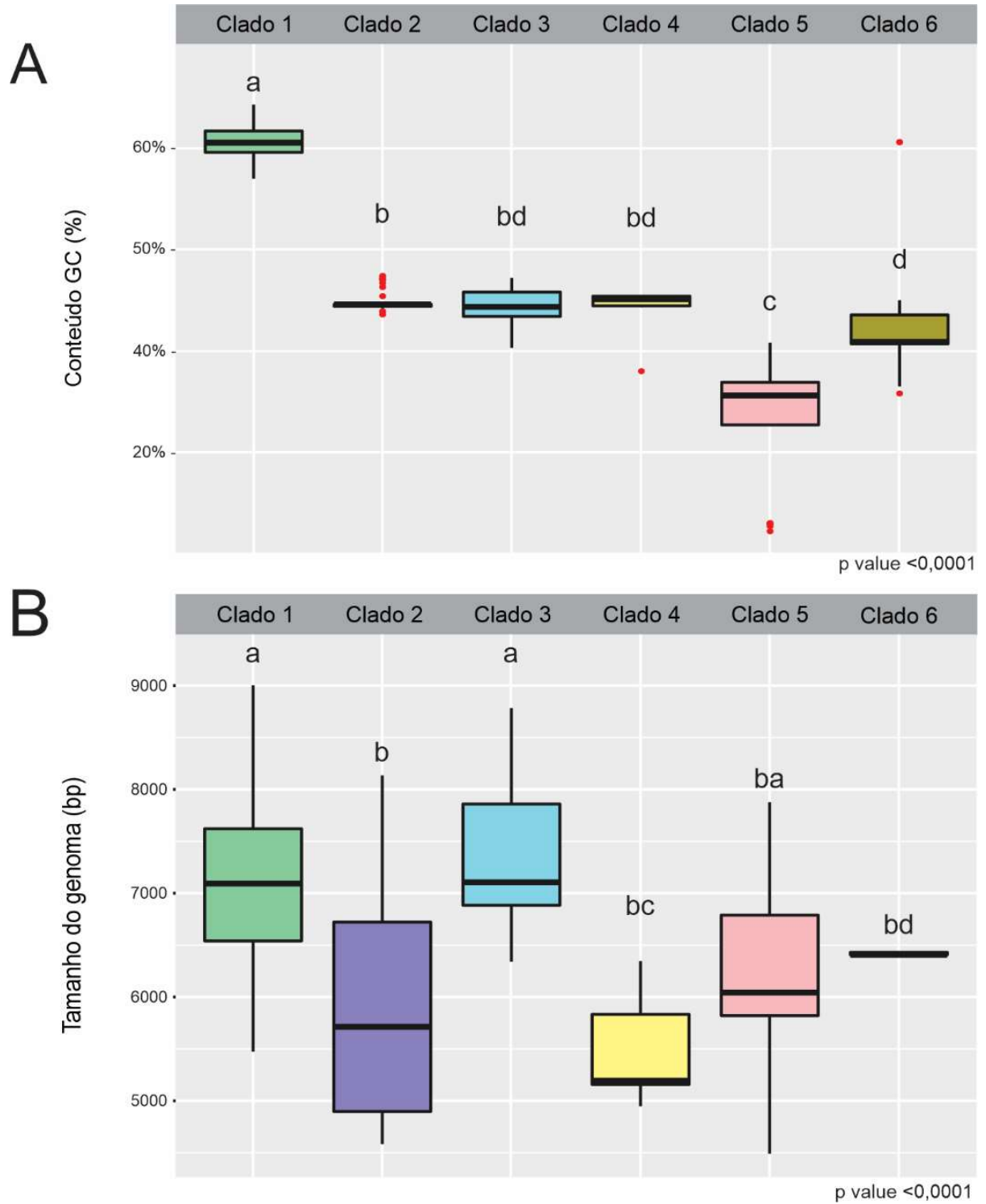


FIGURA 4

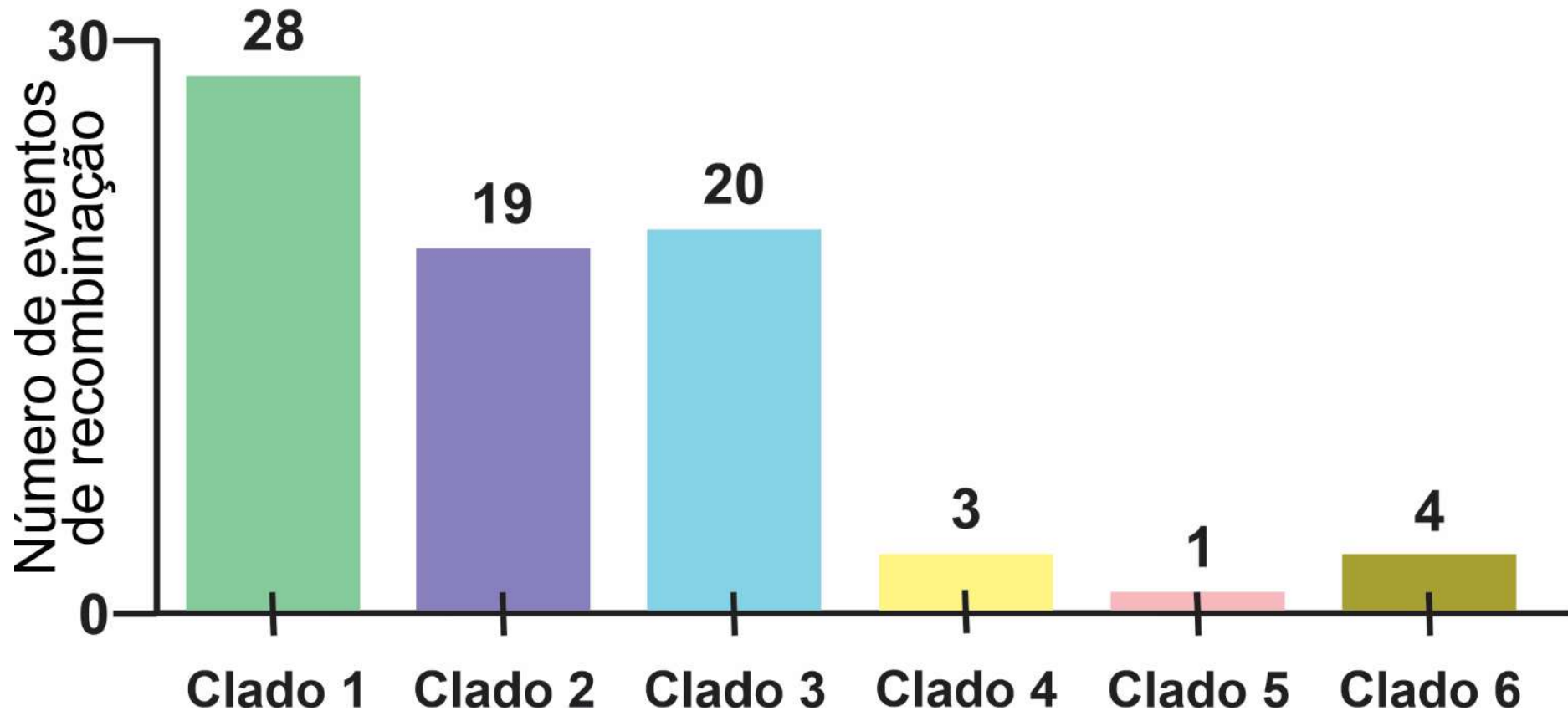
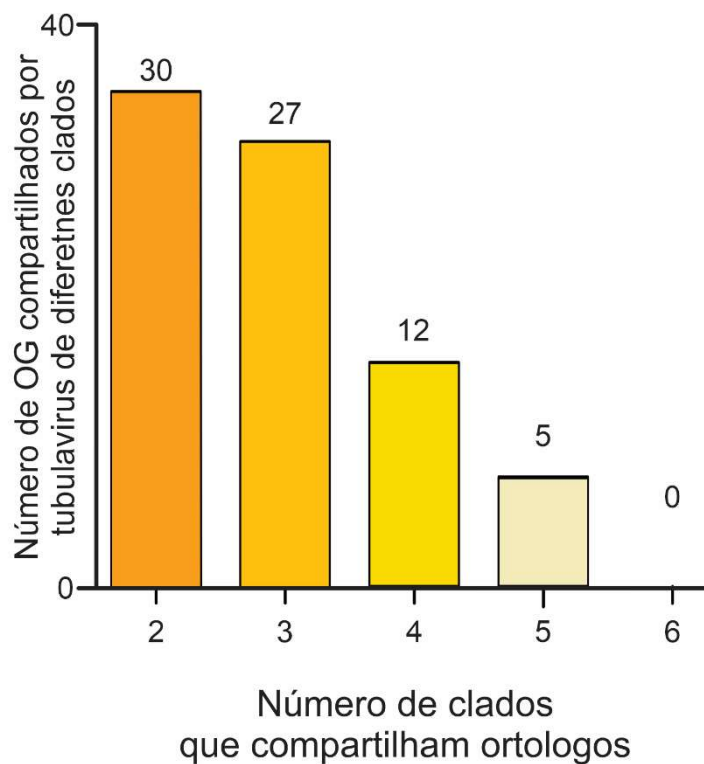


FIGURA 5

A

	Ortologos únicos
Clado 1	46
Clado 2	15
Clado 3	24
Clado 4	10
Clado 5	22
Clado 6	11
Sem clado	0

B



B

Distribuição dos grupos ortologos de pl		Grupos ortologos de gene pl				
		pl.1	pl.2	pl.3	pl.4	pl.5
Clados	1	1			12	13
	2		1			50
	3	3	1			17
	4				7	1
	5		2		10	1
	6			3		18

FIGURA 6

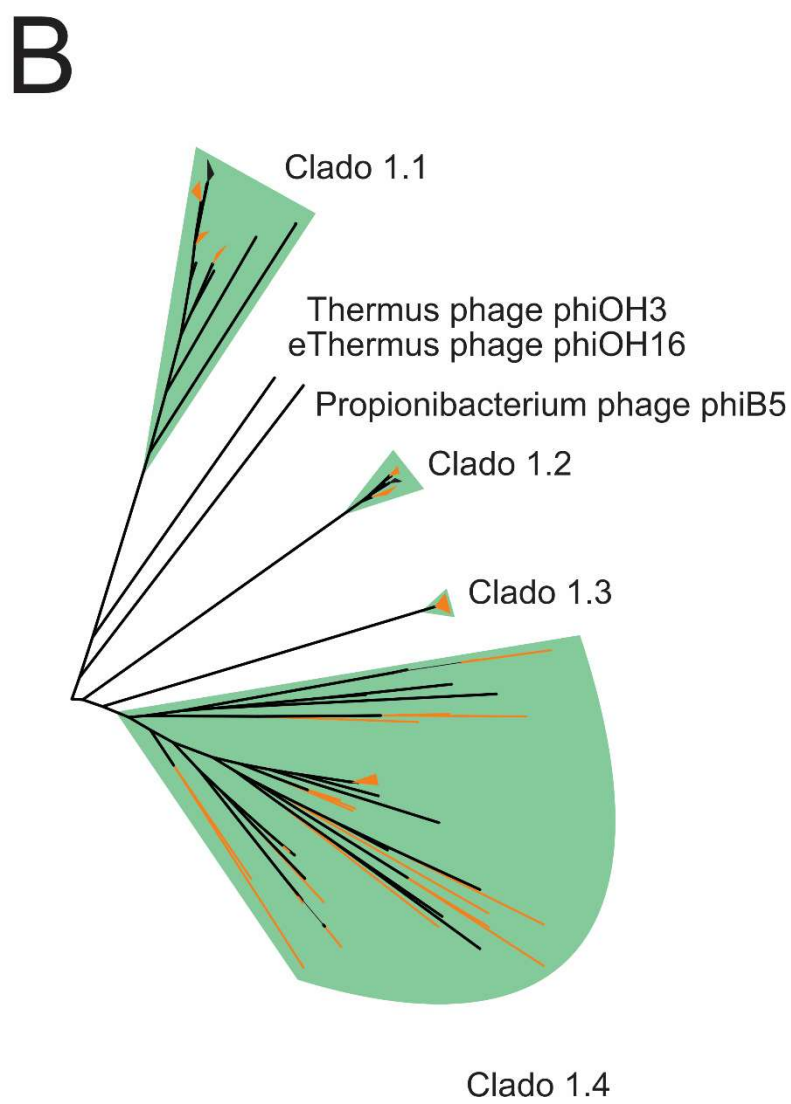
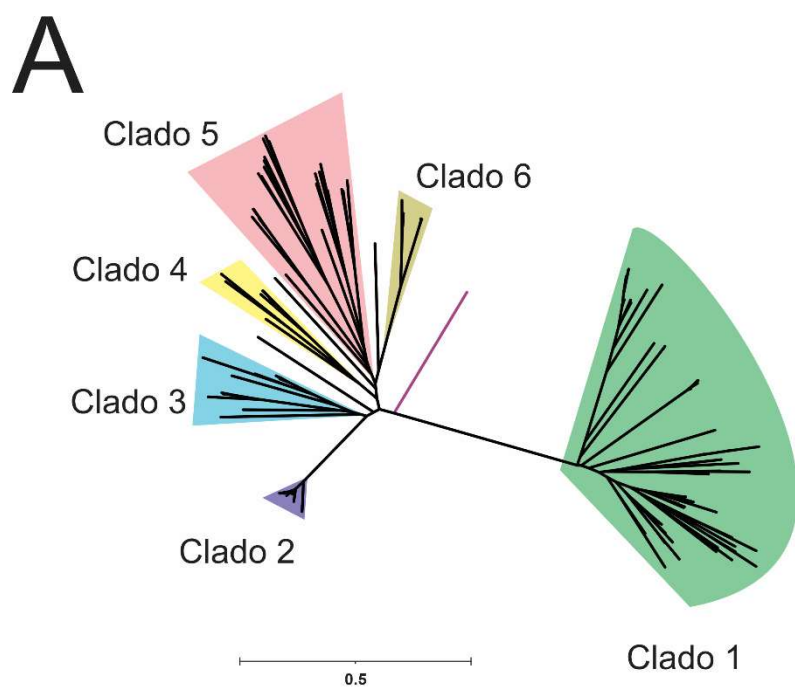


FIGURA 7

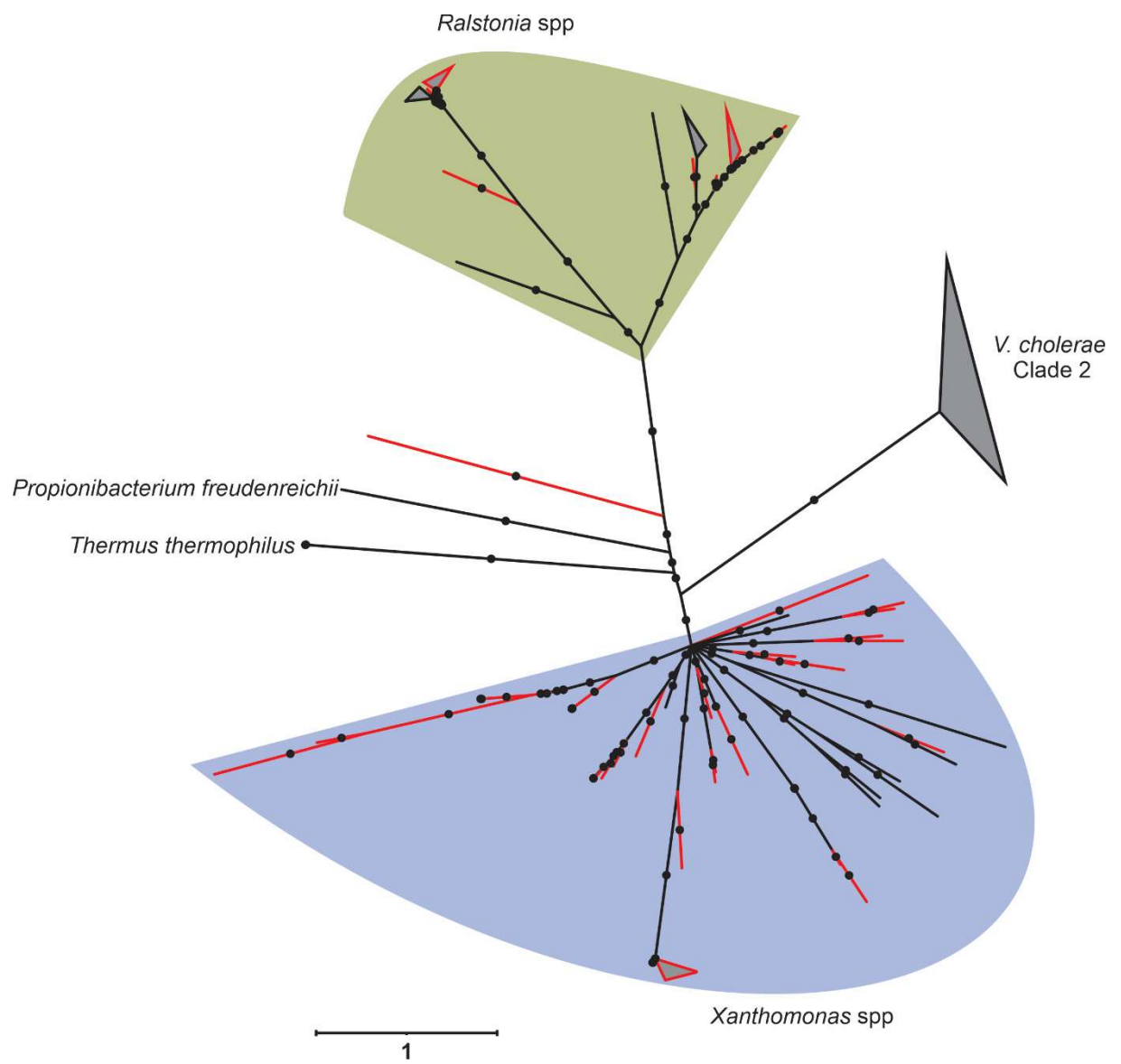


FIGURA SUPLEMENTAR 1

Clado 1

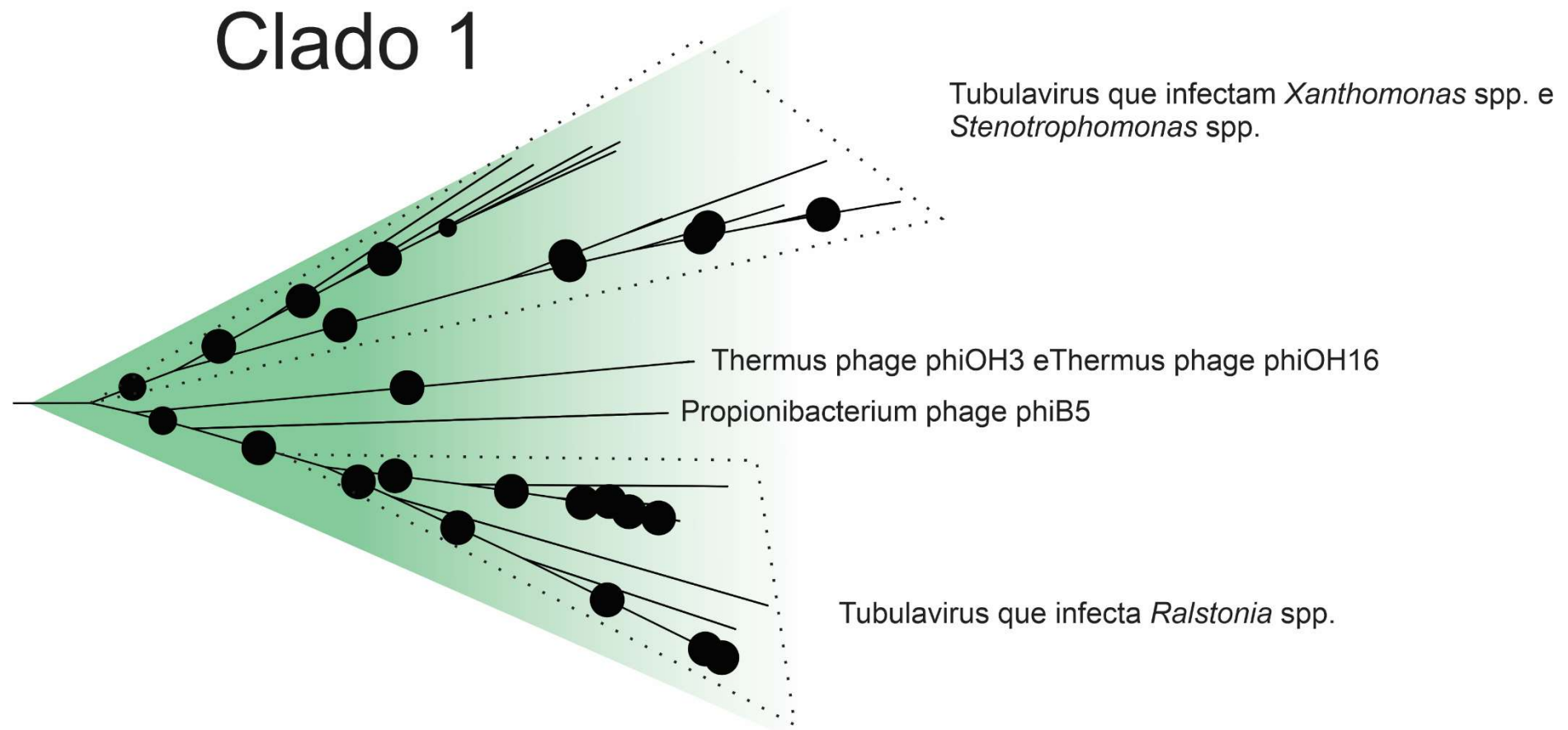


FIGURA SUPLEMENTAR 2

Sequências de pl dos tubulavírus dos clados 2 e 3

Sequências de pl dos tubulavírus dos clados 1, 2, 3, e 6

Sequências de pl dos tubulavírus dos clados 2, 4, 5 e 6

Sequências de pl dos tubulavírus dos clados 1, 2, 3, e 6

10

FIGURA SUPLEMENTAR 3

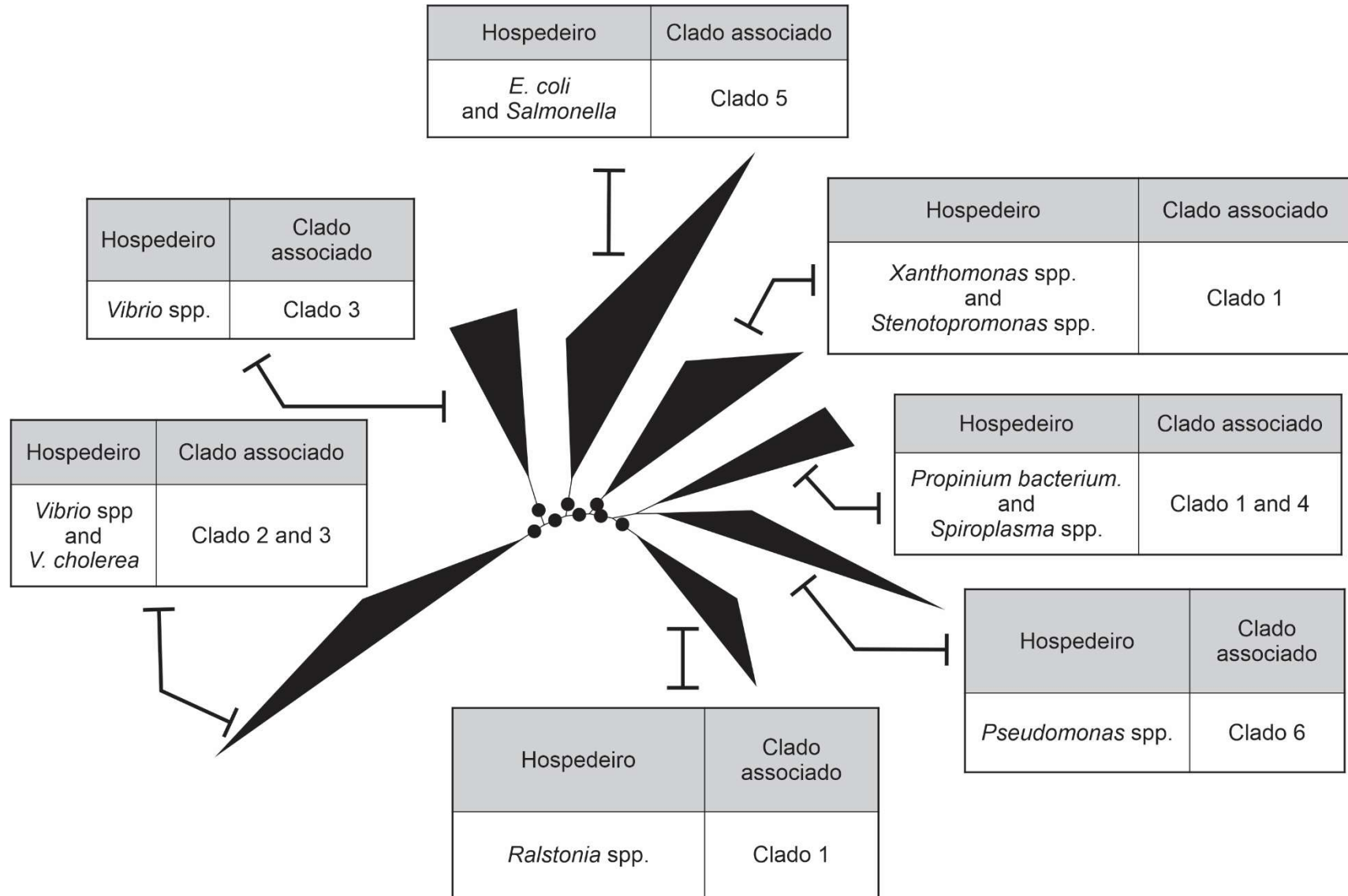
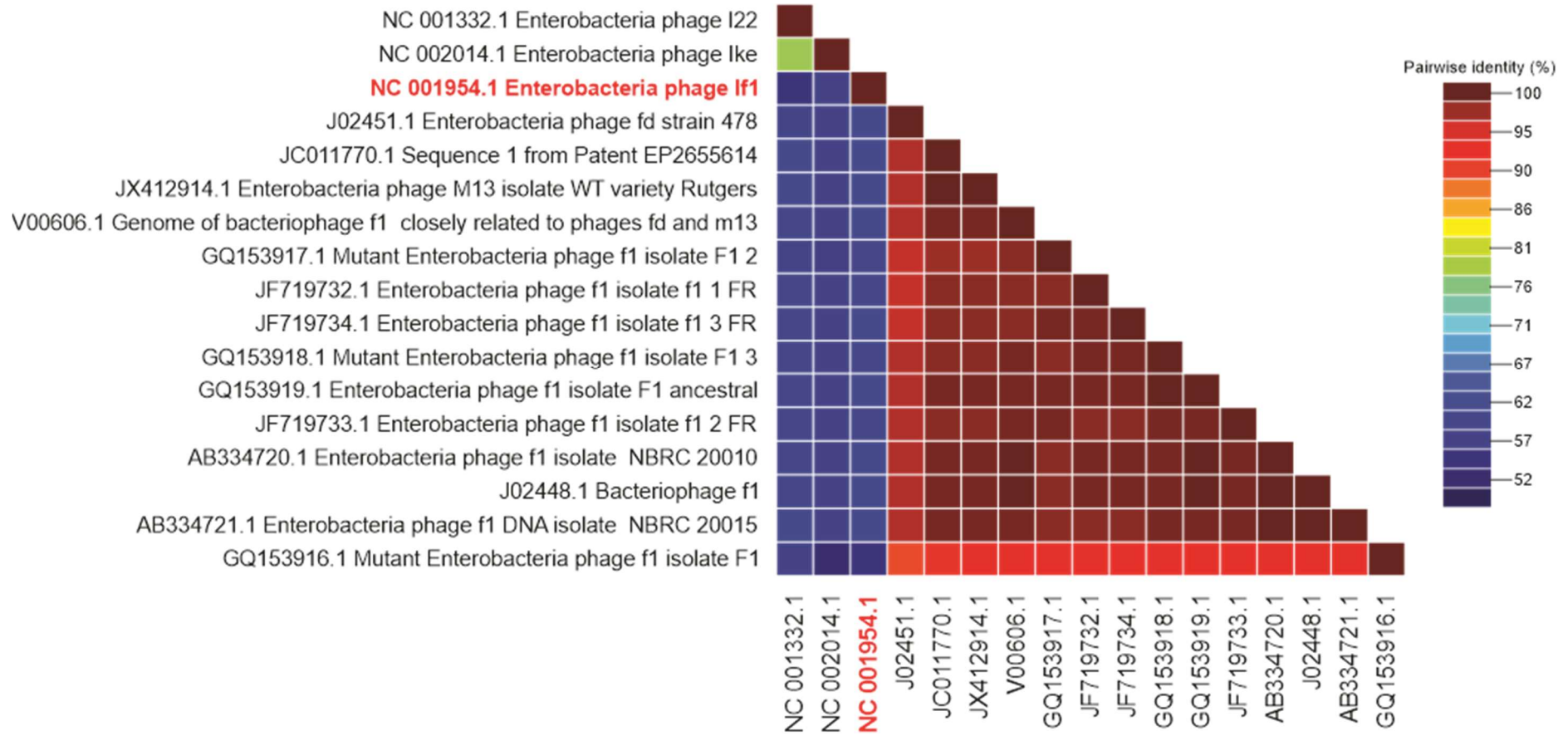


FIGURA SUPLEMENTAR 4



TABELAS

Tabela 1. Coeficiente de correlação de Spearman da distância e identidade da região geográfica da comparação dos pares do hospedeiro tubulavírus 16s

Distância da região geográfica x Comparação par-a-par dos tubulavírus	- 0.2103514
Comparação par-a-par dos tubulavírus x Comparação par-a-par dos 16s	+ 0.6497274

$p < 0,05$;

Força da correlação: Baixa (0,1 a 0,3), média (0,3 a 0,5), grande (0,5 a 1,0) e sem correlação (0,0);

(-) indica uma correlação negativa e (+) uma correlação positiva.

Tabela 2. Relação entre os clados de tubulavirus e os hospedeiros.

Clado	Classificação dos hospedeiros				
	Gênero	Família	Ordem	Classe	Filo
1	<i>Ralstonia</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
	<i>Xanthomonas</i> <i>Stenotrophomonas</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	
	<i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
	<i>Thermus</i>	<i>Thermaceae</i>	<i>Thermales</i>	<i>Deinococci</i>	<i>Deinococcus-Thermus</i>
2 3	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
4	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
5	<i>Spiroplasma</i>	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Mollicutes</i>	<i>Tenericutes</i>
	<i>Acholeplasma</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasmatales</i>		
6	<i>Escherichia</i> <i>Salmonella</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonadales</i>		

Tabela suplementar 1. Números de acesso do Genbank das sequências dos tubulavirus e métricas genômicas usadas neste estudo

Número de acesso	Nome da sequência	Tamanho	%CG	Origem da sequência
NC_001341.1	Acholeplasma phage MV-L1	4491	33,3	não-metagenoma
J02448.1	Bacteriophage f1	6407	40,9	não-metagenoma
M11912.1	Bacteriophage Pf3	5833	45,4	não-metagenoma
M19377.1	Bacteriophage Pf3	5833	45,4	não-metagenoma
AF452449.2	Bacteriophage VSKK	6834	43,5	não-metagenoma
AB334720.1	Enterobacteria phage f1	6407	40,9	não-metagenoma
GQ153919.1	Enterobacteria phage f1	6407	40,9	não-metagenoma
AB334721.1	Enterobacteria phage f1	6407	40,8	não-metagenoma
JF719732.1	Enterobacteria phage f1 isolate f1_1_FR	6407	60,6	não-metagenoma
JF719733.1	Enterobacteria phage f1 isolate f1_2_FR	6407	60,6	não-metagenoma
JF719734.1	Enterobacteria phage f1 isolate f1_3_FR	6407	40,8	não-metagenoma
J02451.1	Enterobacteria phage fd strain 478	6408	40,9	não-metagenoma
NC_001332.1	Enterobacteria phage I2-2	6744	42,7	não-metagenoma
NC_001954.1	Enterobacteria phage If1	8454	43,7	não-metagenoma
NC_002014.1	Enterobacteria phage Ike	6883	40,5	não-metagenoma

Continuação da tabela suplementar 1

JX412914.1	Enterobacteria phage M13 isolate WT	6407	40,8	não-metagenoma
V00606.1	Genome of bacteriophage f1	8454	43,7	não-metagenoma
MN855892.1	Inoviridae sp. isolate 381	6503	41,9	metagenomica
MN855893.1	Inoviridae sp. isolate 382	6496	36,5	metagenomica
MH616818.1	Inoviridae sp. isolate ctba29	5419	36,2	metagenomica
MH617280.1	Inoviridae sp. isolate ctba8	6551	36,9	metagenomica
MH617622.1	Inoviridae sp. isolate ctbd37	5821	37,5	metagenomica
MH617675.1	Inoviridae sp. isolate ctbf24	5913	35,6	metagenomica
MH617298.1	Inoviridae sp. isolate ctbi36	5178	44,3	metagenomica
MH616719.1	Inoviridae sp. isolate ctbi9	5901	41	metagenomica
MH617362.1	Inoviridae sp. isolate ctbj588	5295	35,8	metagenomica
MH617673.1	Inoviridae sp. isolate ctca11	6136	33,8	metagenomica
MH649151.1	Inoviridae sp. isolate ctcb147	5999	36,7	metagenomica
MH552527.1	Inoviridae sp. isolate ctcb17	5922	40	metagenomica
MH617717.1	Inoviridae sp. isolate ctcc37	5180	44,8	metagenomica

Continuação da tabela suplementar 1

MH617507.1	Inoviridae sp. isolate ctce6	6275	35,2	metagenomica
MH617539.1	Inoviridae sp. isolate ctcf31	5853	33,7	metagenomica
MH617060.1	Inoviridae sp. isolate ctcg21	5991	36,9	metagenomica
MH617262.1	Inoviridae sp. isolate ctcg5	6789	35,6	metagenomica
MH617618.1	Inoviridae sp. isolate ctch32	5205	45,4	metagenomica
MH617072.1	Inoviridae sp. isolate ctci24	5723	40	metagenomica
MH617768.1	Inoviridae sp. isolate ctcj40	5095	44,5	metagenomica
MH617343.1	Inoviridae sp. isolate ctda12	6346	38	metagenomica
MH617090.1	Inoviridae sp. isolate ctda39	5705	40,8	metagenomica
MH617492.1	Inoviridae sp. isolate ctda43	4948	45,5	metagenomica
MH552488.1	Inoviridae sp. isolate ctda6	6561	61,5	metagenomica
MH617224.1	Inoviridae sp. isolate ctfi19	6043	32,7	metagenomica
MH616730.1	Inoviridae sp. isolate ctgd30	5705	40,8	metagenomica
MH649021.1	Inoviridae sp. isolate ctii000	7006	40,3	metagenomica
MH617190.1	Inoviridae sp. isolate ctjd25	6506	38,4	metagenomica

Continuação da tabela suplementar 1

GQ153916.1	Mutant Enterobacteria phage f1	6407	40,4	não-metagenoma
GQ153917.1	Mutant Enterobacteria phage f2	6407	40,7	não-metagenoma
GQ153918.1	Mutant Enterobacteria phage f3	6407	40,8	não-metagenoma
AF428260.1	Propionibacterium phage phiB5	5804	64,3	não-metagenoma
KF887906.1	Ralstonia phage 1 NP-2014	8460	58,5	não-metagenoma
AY374414.2	Ralstonia phage p12J	7118	57	não-metagenoma
HM064452.1	Ralstonia phage PE226	5475	61,7	não-metagenoma
KX179905.1	Ralstonia phage Rs551	7929	60,8	não-metagenoma
AB937974.1	Ralstonia phage RS603	7679	59,4	não-metagenoma
AB931172.1	Ralstonia phage RS611	6386	62,1	não-metagenoma
MT495635.1	Ralstonia phage RSBg	7540	61,7	não-metagenoma
AB259123.2	Ralstonia phage RSM1	9004	60	não-metagenoma
AB434711.1	Ralstonia phage RSM3	8929	59,6	não-metagenoma
AB981170.1	Ralstonia phage RSMSuper	8956	59,7	não-metagenoma
JQ408219.1	Ralstonia phage RSS0	7288	62,1	não-metagenoma

Continuação da tabela suplementar 1

AB259124.1	Ralstonia phage RSS1	6662	62,6	não-metagenoma
AB828698.1	Ralstonia phage RSS30	8576	61,7	não-metagenoma
LC066596.1	Ralstonia phage RSS-TH1	7273	62,1	não-metagenoma
MF716957.1	Ralstonia virus RSIBR1	6945	61,3	não-metagenoma
JC011770.1	Sequence 1 from Patent EP2655614	6407	40,7	não-metagenoma
NC_009987.1	Spiroplasma kunkelii virus SkV1_CR2-3x	7870	22,2	não-metagenoma
NC_003793.1	Spiroplasma phage 1-C74	7768	23	não-metagenoma
NC_001365.1	Spiroplasma phage 1-R8A2B	8273	22,9	não-metagenoma
AJ969242.1	Spiroplasma phage SVGI3	7878	23	não-metagenoma
NC_001270.2	Spiroplasma phage SVTS2	6825	22,7	não-metagenoma
HM150760.1	Stenotrophomonas phage phiSHP2	5819	61,5	não-metagenoma
NC_043029.1	Stenotrophomonas phage phiSMA6 proviral	7648	62,6	não-metagenoma
HG007973.1	Stenotrophomonas phage phiSMA7 proviral	7069	62,3	não-metagenoma
EF489910.1	Stenotrophomonas phage PSH1	6867	61,1	não-metagenoma
LC210520.1	Thermus phage phiOH16 genomic	6533	58,4	não-metagenoma

Continuação da tabela suplementar 1

LC035386.1	Thermus phage phiOH3 genomic	5688	58	não-metagenoma
JN402401.1	Uncultured phage WW-nAnB	4817	44,4	não-metagenoma
KJ003981.1	Uncultured phage WW-nAnB strain 2	5077	45	metagenomica
KJ003982.1	Uncultured phage WW-nAnB strain 3	5210	43,5	metagenomica
MN263053.1	UNVERIFIED: Xanthomonas phage phiLF	6009	59,9	não-metagenoma
AY714348.1	Vibrio cholerae phage KSF-1phi	7107	44,4	não-metagenoma
AY242528.1	Vibrio cholerae phage VGJphi	7542	43,4	não-metagenoma
KY454839.1	Vibrio cholerae strain C1 CTX	26796	44,6	não-metagenoma
KY474414.1	Vibrio cholerae strain C2	23664	44,4	não-metagenoma
KY474410.1	Vibrio cholerae strain C7	28102	44,7	não-metagenoma
KJ540261.1	Vibrio cholerae strain IB4247 phage CTX	10613	44,6	não-metagenoma
KJ540262.1	Vibrio cholerae strain IB4405 phage CTX	10620	44,6	não-metagenoma
KJ540263.1	Vibrio cholerae strain IB4540 phage CTX	10620	44,6	não-metagenoma
KJ540260.1	Vibrio cholerae strain IB4563 phage CTX	10620	44,6	não-metagenoma
KJ540258.1	Vibrio cholerae strain IB4712 phage CTX	10628	44,6	não-metagenoma

Continuação da tabela suplementar 1

KJ540264.1	Vibrio cholerae strain IB5230 phage CTX	10627	44,6	não-metagenoma
KJ540259.1	Vibrio cholerae strain IB5419 phage CTX	10635	44,6	não-metagenoma
KY474413.1	Vibrio cholerae strain J6	17090	44,6	não-metagenoma
KY474419.1	Vibrio cholerae strain M25	12885	44,4	não-metagenoma
KY474411.1	Vibrio cholerae strain No341	16719	44,2	não-metagenoma
KY474417.1	Vibrio cholerae strain P16	21076	44,3	não-metagenoma
KY474416	Vibrio cholerae strain P2	14490	44,7	não-metagenoma
KJ540266.1	Vibrio cholerae strain PM11 phage CTX	10621	44,6	não-metagenoma
KJ540267.1	Vibrio cholerae strain PM12 phage CTX	10618	44,6	não-metagenoma
KJ540268.1	Vibrio cholerae strain PM13 phage CTX	10618	44,6	não-metagenoma
HQ224500.1	Vibrio phage CTX	10638	44,6	não-metagenoma
KJ619459.1	Vibrio phage CTX	6446	44,3	não-metagenoma
GU942563.1	Vibrio phage CTX chromosome I prophage	17070	46,3	não-metagenoma
AF416590.1	Vibrio phage CTX core region Cep	5728	47,4	não-metagenoma
KF664568.1	Vibrio phage CTX isolate recombinant CTX-RS1	10621	44,6	não-metagenoma

Continuação da tabela suplementar 1

KF664567.1	Vibrio phage CTX plasmid pCTX-2 RstR	14849	44,6	não-metagenoma
AF414369.2	Vibrio phage CTX RstA2	4883	44,4	não-metagenoma
AF542088.2	Vibrio phage CTX RstA2 (rstA2)	4878	44,4	não-metagenoma
AF542089.2	Vibrio phage CTX RstA2 (rstA2)	4878	44,4	não-metagenoma
KF664566.1	Vibrio phage CTX RstR	13322	44,6	não-metagenoma
KF664572.1	Vibrio phage CTX RstR	7756	44,2	não-metagenoma
GQ499847.1	Vibrio phage CTX RstR (rstR)	7830	44,2	não-metagenoma
GQ485652.1	Vibrio phage CTX strain 01.07vp RstR	10628	44,6	não-metagenoma
KM352500.1	Vibrio phage CTX strain 81	8000	44,7	não-metagenoma
GQ485644.1	Vibrio phage CTX strain B33 RstR	15285	44,3	não-metagenoma
GQ485649.1	Vibrio phage CTX strain E1781 RstR	14860	44,5	não-metagenoma
GQ466609	Vibrio phage CTX strain IB1346 RstR	14898	44,5	não-metagenoma
GQ466608.1	Vibrio phage CTX strain IB1346 RstR	13607	44,7	não-metagenoma
GQ466612.1	Vibrio phage CTX strain IB1482	14905	44,5	não-metagenoma
GQ466611.1	Vibrio phage CTX strain IB1617 RstR	8135	45,4	não-metagenoma

Continuação da tabela suplementar 1

GQ466610.1	Vibrio phage CTX strain IB1627 RstR	10766	44,4	não-metagenoma
GQ485650.1	Vibrio phage CTX strain IB4322	10628	44,6	não-metagenoma
GQ485651.1	Vibrio phage CTX strain IB4642 RstR	10628	44,6	não-metagenoma
GQ485646.1	Vibrio phage CTX strain MG116926 RstR	14874	44,5	não-metagenoma
GQ485645.1	Vibrio phage CTX strain MJ1236	15285	44,4	não-metagenoma
D89074.1	Vibrio phage fs1	6340	43,4	não-metagenoma
AB002632.1	Vibrio phage fs2	8651	44,5	não-metagenoma
CP017895.1	Vibrio phage K04M1_VK04M1	7079	46,1	não-metagenoma
CP017905.1	Vibrio phage K05K4_VK05K4_1	21012	46,4	não-metagenoma
CP017906.1	Vibrio phage K05K4_VK05K4_2	13327	46,3	não-metagenoma
NC 002363	Vibrio phage ND1-fs1	6856	43,4	não-metagenoma
KP972568.1	Vibrio phage pre-CTX	6722	47,1	não-metagenoma
KP972569.1	Vibrio phage pre-CTX	6722	47,1	não-metagenoma
KR063267.1	Vibrio phage pre-CTX	5714	47,3	não-metagenoma
KT728931.1	Vibrio phage pre-CTX	5712	47,1	não-metagenoma

Continuação da tabela suplementar 1

KT728930.1	Vibrio phage pre-CTX	5215	46,7	não-metagenoma
KR063268.1	Vibrio phage pre-CTX	5087	47	não-metagenoma
KT779274.1	Vibrio phage pre-CTX	4919	43,9	não-metagenoma
KT779273.1	Vibrio phage pre-CTX	4901	43,9	não-metagenoma
KT779272.1	Vibrio phage pre-CTX	4594	44,6	não-metagenoma
KT779270.1	Vibrio phage pre-CTX	4583	44,6	não-metagenoma
MN690600.1	Vibrio phage VALG_phi8	7311	46,3	não-metagenoma
JN848801.1	Vibrio phage VCY-phi	7103	41,4	não-metagenoma
FJ904927.1	Vibrio phage VEJphi	6842	43	não-metagenoma
AB012574.1	Vibrio phage Vf12	7965	45,7	não-metagenoma
AB012573.1	Vibrio phage Vf33	7965	45,7	não-metagenoma
KC357596.1	Vibrio phage VFJ	8555	44,3	não-metagenoma
AB043678.1	Vibrio phage VfO3K6	8784	45,2	não-metagenoma
AB043679.1	Vibrio phage VfO4K68	6891	47,2	não-metagenoma
MN536023.1	Vibrio phage VP24-2_Ke	7180	42,5	não-metagenoma
AF453500.3	Vibrio phage VSK	6882	43,7	não-metagenoma

Final da tabela suplementar 1

MF155889.1	Vibrio virus CTXphi	6698	43,6	não-metagenoma
M57538.1	Xanthomonas phage Cf1c	7308	58,1	não-metagenoma
MH206184.1	Xanthomonas phage phiLf UK variant	6062	59,9	não-metagenoma
MH206183.1	Xanthomonas phage phiXv2	6564	59,6	não-metagenoma
AB910602.1	Xanthomonas phage XacF1	7325	58,2	não-metagenoma
MN335248.1	Xanthomonas phage XaF13	7045	60,3	não-metagenoma
KX181651.1	Xanthomonas phage Xf109	7190	59,6	não-metagenoma

Tabela Suplementar 2. Detecção de eventos de recombinação entre sequências dos tubulavirus

Eventos	Recobinantes	Minor parent(s)	Major parent(s)	Métodos
1	KY474410.1 Vibrio cholerae strain C7	KY474417.1 Vibrio cholerae strain P16 KY474414.1 Vibrio cholerae strain C2 KY474411.1 Vibrio cholerae strain No341	KJ540268.1 Vibrio cholerae strain PM13 phage CTX KF664566.1 Vibrio phage CTX RstR KY474419.1 Vibrio cholerae strain M25 KF664568.1 Vibrio phage CTX isolate recombinant CT KJ540266.1 Vibrio cholerae strain PM11 phage CTX KJ540267.1 Vibrio cholerae strain PM12 phage CTX	R, G, B, M, C, S, 3S
2	AY714348.1 Vibrio cholerae phage KSF-1phi	MN536023.1 Vibrio phage VP24-2_Ke AF453500.3 Vibrio phage VSK AB572858.1 Vibrio phage ND1-fs1 FJ904927.1 Vibrio phage VEJphi AF452449.2 Bacteriophage VSKK D89074.1 Vibrio phage fs1	AY242528.1 Vibrio cholerae phage VGJphi	B, M, C, S, P, L, 3S
3	GQ466610.1 Vibrio phage CTX strain IB1627 RstR GQ466608.1 Vibrio phage CTX strain IB1346 RstR GQ499847.1 Vibrio phage CTX RstR (rstR)	KY474411.1 Vibrio cholerae strain No341 KY474414.1 Vibrio cholerae strain C2 KY474417.1 Vibrio cholerae strain P16	KF664568.1 Vibrio phage CTX isolate recombinant CT KF664566.1 Vibrio phage CTX RstR KY474419.1 Vibrio cholerae strain M25 KJ540266.1 Vibrio cholerae strain PM11 phage CTX KJ540267.1 Vibrio cholerae strain PM12 phage CTX KJ540268.1 Vibrio cholerae strain PM13 phage CTX	R, G, B, M, C, S, 3S
4	KX181651.1 Xanthomonas phage Xf109	MN335248.1 Xanthomonas phage XaF13	MH206183.1 Xanthomonas phage phiXv2	R, G, B, M, C, S, P, L, 3S
5	AB937974.1 Ralstonia phage RS603	AB981170.1 Ralstonia phage RSMSper	KF887906.1 Ralstonia phage 1 NP-2014 AB259123.2 Ralstonia phage RSM1 AB434711.1 Ralstonia phage RSM3	R, G, B, M, C, S, P, L, 3S
6	AB937974.1 Ralstonia phage RS603	MT495635.1 Ralstonia phage RSBg JQ408219.1 Ralstonia phage RSS0 LC066596.1 Ralstonia phage RSS-TH1 AB259124.1 Ralstonia phage RSS1 AB931172.1 Ralstonia phage RS611	AB828698.1 Ralstonia phage RSS30	R, G, B, M, C, S, P, L, 3S
7	KC357596.1 Vibrio phage VFJ	AF453500.3 Vibrio phage VSK AB572858.1 Vibrio phage ND1-fs1 FJ904927.1 Vibrio phage VEJphi AF452449.2 Bacteriophage VSKK	AY242528.1 Vibrio cholerae phage VGJphi	R, G, B, M, C, P, L, 3S
8	MH206183.1 Xanthomonas phage phiXv2	M57538.1 Xanthomonas phage Cf1c	AB910602.1 Xanthomonas phage XacF1 MN263053.1 UNVERIFIED: Xanthomonas phage phiLF	R, G, B, M, C, P, L, 3S

Continuação da tabela suplementar 2

			KR063268.1 Vibrio phage pre-CTX KY474413.1 Vibrio cholerae strain J6 chromosome 1 KY474411.1 Vibrio cholerae strain No341 chromosome	
9	AF416590.1 Vibrio phage CTX KP972568.1 Vibrio phage pre-CTX KP972569.1 Vibrio phage pre-CTX	GU942563.1 Vibrio phage CTX chromosome I prophage	GQ485644.1 Vibrio phage CTX strain B33 RstR GQ485645.1 Vibrio phage CTX strain MJ1236 GQ466609.1 Vibrio phage CTX strain IB1346 RstR GQ485646.1 Vibrio phage CTX strain MG116926 RstR GQ485649.1 Vibrio phage CTX strain E1781 RstR KF664567.1 Vibrio phage CTX plasmid pCTX-2 RstR KY474416.1 Vibrio cholerae strain P2 KF664566.1 Vibrio phage CTX RstR KY474419.1 Vibrio cholerae strain M25 HQ224500.1 Vibrio phage CTX KJ540259.1 Vibrio cholerae strain IB5419 phage CTX GQ485650.1 Vibrio phage CTX strain IB4322 GQ485651.1 Vibrio phage CTX strain IB4642 RstR GQ485652.1 Vibrio phage CTX strain 01.07vp RstR KJ540258.1 Vibrio cholerae strain IB4712 phage CTX KJ540264.1 Vibrio cholerae strain IB5230 phage CTX KJ540260.1 Vibrio cholerae strain IB4563 phage CTX KJ540262.1 Vibrio cholerae strain IB4405 phage CTX KJ540263.1 Vibrio cholerae strain IB4540 phage CTX KJ540261.1 Vibrio cholerae strain IB4247 phage CTX KM352500.1 Vibrio phage CTX strain 81 KF664572.1 Vibrio phage CTX RstR KR063267.1 Vibrio phage pre-CTX KT728931.1 Vibrio phage pre-CTX KT728930.1 Vibrio phage pre-CTX	R, G, B, M, C, P
10	MN263053.1 Xanthomonas phage phiLF	M57538.1 Xanthomonas phage Cf1c	AB910602.1 Xanthomonas phage XacF1	R, G, B, M, C, S, P, L, 3S
11	HG007973.1 Stenotrophomonas phage phiSMA7 proviral MH552488.1 Inoviridae sp. isolate ctda6 HM150760.1 Stenotrophomonas phage phiSHP2	EF489910.1 Stenotrophomonas phage PSH1	Desconhecido	R, G, B, M, C, S, P
12	MN536023.1 Vibrio phage VP24-2_Ke	CP017906.1 Vibrio phage K05K4_VK05K4_2 MN690600.1 Vibrio phage VALG_phi8 CP017895.1 Vibrio phage K04M1_VK04M1	CP017905.1 Vibrio phage K05K4_VK05K4_1 AF452449.2 Bacteriophage VSKK	R, G, B, M, C, P, L, 3S

Continuação da tabela suplementar 2

13	NC_001365.1 Spiroplasma phage 1-R8A2B	NC_003793.1 Spiroplasma phage 1-C74	NC_009987.1 Spiroplasma kunkelii virus SkV1_CR2-3x)	R, G, B, M, C, S, P, L
14	NC_001332.1 Enterobacteria phage l2-2	Desconhecido	NC_002014.1 Enterobacteria phage lke	R, G, B, M, C, S, P, L, 3S
15	AB828698.1 Ralstonia phage RSS30	MT495635. Ralstonia phage RSBg	LC066596.1 Ralstonia phage RSS-TH1	R, G, B, M, C, P, L, 3S
16	AY242528.1 Vibrio cholerae phage VGJphi	AF452449 Bacteriophage VSKK	FJ904927.1 Vibrio phage VEJphi AF453500.3 Vibrio phage VSK AB572858.1 Vibrio phage ND1-fs1	R, G, B, M, C, S, P, L, 3S
17	GU942563.1 Vibrio phage CTX chromosome I prophage KR063268.1 Vibrio phage pre-CTX	KY474417.1 Vibrio cholerae strain P16 KY474413.1 Vibrio cholerae strain J6 KY474411.1 Vibrio cholerae strain No341 KY474416.1 Vibrio cholerae strain P2 KF664566.1 Vibrio phage CTX RstR KY474419.1 Vibrio cholerae strain M25 HQ224500.1 Vibrio phage CTX KJ540259.1 Vibrio cholerae strain IB5419 GQ485650.1 Vibrio phage CTX strain IB4322 GQ485651.1 Vibrio phage CTX strain IB4642 RstR GQ485652.1 Vibrio phage CTX strain 01.07vp RstR KJ540258.1 Vibrio cholerae strain IB4712 phage KF664568.1 Vibrio phage CTX isolate recombinant KJ540266.1 Vibrio cholerae strain PM11 KJ540260.1 Vibrio cholerae strain IB4563 KJ540262.1 Vibrio cholerae strain IB4405 KJ540263.1 Vibrio cholerae strain IB4540 KJ540267.1 Vibrio cholerae strain PM12 KJ540268.1 Vibrio cholerae strain PM13 KJ540261.1 Vibrio cholerae strain IB4247 KM352500.1 Vibrio phage CTX strain 81	KJ540264.1 Vibrio cholerae strain IB5230 phage CTX KY474414.1 Vibrio cholerae strain C2	R, G, B, M, C, S, P

Continuação da tabela suplementar 2

18	<p>KF664572.1 Vibrio phage CTX RstR</p> <p>KY474410.1 Vibrio cholerae strain C7 chromosome 1 [T]</p> <p>GQ485644.1 Vibrio phage CTX strain B33 RstR [ajust</p> <p>GQ485645.1 Vibrio phage CTX strain MJ1236 [ajustad</p> <p>GQ466612.1 Vibrio phage CTX strain IB1482 [ajustad</p> <p>GQ466609.1 Vibrio phage CTX strain IB1346 RstR [aj</p> <p>GQ485646.1 Vibrio phage CTX strain MG116926 RstR [</p> <p>GQ485649.1 Vibrio phage CTX strain E1781 RstR [aju</p> <p>KF664567.1 Vibrio phage CTX plasmid pCTX-2 RstR [a</p> <p>KY474416.1 Vibrio cholerae strain P2 chromosome 1</p> <p>GQ466608.1 Vibrio phage CTX strain IB1346 RstR [aj][T]</p> <p>KF664566.1 Vibrio phage CTX RstR [ajustado_pl]</p> <p>KY474419.1 Vibrio cholerae strain M25 chromosome 1[T]</p> <p>GQ466610.1 Vibrio phage CTX strain IB1627 RstR [aj][T]</p> <p>HQ224500.1 Vibrio phage CTX</p> <p>KJ540259.1 Vibrio cholerae strain IB5419 phage CTX</p> <p>GQ485650.1 Vibrio phage CTX strain IB4322 [ajustad</p> <p>GQ485651.1 Vibrio phage CTX strain IB4642 RstR [aj</p> <p>GQ485652.1 Vibrio phage CTX strain 01.07vp RstR [a</p> <p>KJ540258.1 Vibrio cholerae strain IB4712 phage CTX</p> <p>KJ540264.1 Vibrio cholerae strain IB5230 phage CTX</p> <p>KF664568.1 Vibrio phage CTX isolate recombinant CT</p> <p>KJ540266.1 Vibrio cholerae strain PM11 phage CTX g</p> <p>KJ540260.1 Vibrio cholerae strain IB4563 phage CTX</p> <p>KJ540262.1 Vibrio cholerae strain IB4405 phage CTX</p> <p>KJ540263.1 Vibrio cholerae strain IB4540 phage CTX</p> <p>KJ540267.1 Vibrio cholerae strain PM12 phage CTX g</p> <p>KJ540268.1 Vibrio cholerae strain PM13 phage CTX g</p> <p>KJ540261.1 Vibrio cholerae strain IB4247 phage CTX</p> <p>GQ466611.1 Vibrio phage CTX strain IB1617 RstR[aju</p> <p>KM352500.1 Vibrio phage CTX strain 81</p> <p>GQ499847.1 Vibrio phage CTX RstR (rstR) [ajustado_</p> <p>KT728931.1 Vibrio phage pre-CTX</p> <p>KT779274.1 Vibrio phage pre-CTX</p> <p>KT779272.1 Vibrio phage pre-CTX</p> <p>KT779270.1 Vibrio phage pre-CTX</p>	<p>KY474411.1 Vibrio cholerae strain No341</p> <p>KY474414.1 Vibrio cholerae strain C2</p> <p>KY474417.1 Vibrio cholerae strain P16</p> <p>KY474413.1 Vibrio cholerae strain J6</p> <p>KY474416.1 Vibrio cholerae strain P2 1</p> <p>KF664566.1 Vibrio cholerae RstR</p> <p>KY474419.1 Vibrio cholerae strain M25</p> <p>HQ224500.1 Vibrio cholerae</p> <p>KJ540259.1 Vibrio cholerae strain IB5419</p> <p>GQ485650.1 Vibrio cholerae strain IB4322</p> <p>GQ485651.1 Vibrio cholerae strain IB4642</p> <p>GQ485652.1 Vibrio cholerae strain 01.07vp</p> <p>KJ540258.1 Vibrio cholerae strain IB4712</p> <p>KJ540264.1 Vibrio cholerae strain IB5230</p> <p>KJ540266.1 Vibrio cholerae strain PM11</p> <p>KJ540260.1 Vibrio cholerae strain IB4563</p> <p>KJ540262.1 Vibrio cholerae strain IB4405</p> <p>KJ540263.1 Vibrio cholerae strain IB4540</p> <p>KJ540267.1 Vibrio cholerae strain PM12</p> <p>KJ540268.1 Vibrio cholerae strain PM13</p> <p>KJ540261.1 Vibrio cholerae strain IB4247</p> <p>GQ466611.1 Vibrio cholerae strain IB1617</p> <p>KM352500.1 Vibrio cholerae strain</p>	<p>MF155889.1 Vibrio virus CTXphi</p> <p>KF664568.1 Vibrio phage CTX isolate recombinant CT</p>	<p>R, G, B, M, C, S, P</p>
----	--	---	---	----------------------------

Continuação da tabela suplementar 2

19	GQ466611.1 Vibrio phage CTX strain IB1617 RstR	GQ485644.1 Vibrio phage CTX strain B33 RstR GQ485645.1 Vibrio phage CTX strain MJ1236 GQ466612.1 Vibrio phage CTX strain IB1482 GQ466609.1 Vibrio phage CTX strain IB1346 GQ485646.1 Vibrio phage CTX strain MG116926 RGQ485649.1 Vibrio phage CTX strain E1781 KF664567.1 Vibrio phage CTX plasmid pCTX-2 KF664572.1 Vibrio phage CTX RstR KR063267.1 Vibrio phage pre-CTX KT728931.1 Vibrio phage pre-CTX	GU942563.1 Vibrio phage CTX chromosome I prophage	G, B, M, C, S, P
20	LC066596.1 Ralstonia phage RSS-TH1	GQ485651.1 Vibrio phage CTX strain IB4642 RstR	JQ408219.1 Ralstonia phage RSS0	R, G, B, M, C, P, L, 3S
21	KF664566.1 Vibrio phage CTX RstR [ajustado_p] KY474410.1 Vibrio cholerae strain C7 chromosome 1 KY454839.1 Vibrio cholerae strain C1 CTX region ge KY474419.1 Vibrio cholerae strain M25 chromosome 1 KF664568.1 Vibrio phage CTX isolate recombinant CT KJ540266.1 Vibrio cholerae strain PM11 phage CTX g KJ540267.1 Vibrio cholerae strain PM12 phage CTX g KJ540268.1 Vibrio cholerae strain PM13 phage CTX g	AY714348.1 Vibrio cholerae phage KSF-1phi AF453500.3 Vibrio phage VSK AB572858.1 Vibrio phage ND1-fs1	GQ466608.1 Vibrio phage CTX strain IB1346 RstR GQ466610.1 Vibrio phage CTX strain IB1627 RstR	R, G, B, M, C, S, P
22	AB012573.1 Vibrio phage Vf33 AB012574.1 Vibrio phage Vf12	Desconhecido	AB043679.1 Vibrio phage VfO4K68 AB043678.1 Vibrio phage VfO3K6 CP017906.1 Vibrio phage K05K4_VK05K4_2 MN690600.1 Vibrio phage VALG_phi8	R, G, B, M, C, P, L

Continuação da tabela suplementar 2

23	<p>GQ466612.1 Vibrio phage CTX strain IB1482 [ajustad GQ485644.1 Vibrio phage CTX strain B33 RstR [ajust GQ485645.1 Vibrio phage CTX strain MJ1236 [ajustad GQ466609.1 Vibrio phage CTX strain IB1346 RstR [aj GQ485646.1 Vibrio phage CTX strain MG116926 RstR [GQ485649.1 Vibrio phage CTX strain E1781 RstR [aju KF664567.1 Vibrio phage CTX plasmid pCTX-2 RstR [a KF664572.1 Vibrio phage CTX RstR [ajustado_p]</p>	<p>GQ485651.1 Vibrio phage CTX strain IB4642 RstR KY454839.1 Vibrio cholerae strain C1 CTX KY474414.1 Vibrio cholerae strain C2 KY474417.1 Vibrio cholerae strain P16 KY474413.1 Vibrio cholerae strain J6 KY474411.1 Vibrio cholerae strain No341 KY474416.1 Vibrio cholerae strain P2 KF664566.1 Vibrio phage CTX RstR KY474419.1 Vibrio cholerae strain M25 HQ224500.1 Vibrio phage CTX KJ540259.1 Vibrio cholerae strain IB5419 phage CTX GQ485650.1 Vibrio phage CTX strain IB4322 GQ485652.1 Vibrio phage CTX strain 01.07vp RstR KJ540258.1 Vibrio cholerae strain IB4712 phage CTX KJ540264.1 Vibrio cholerae strain IB5230 phage CTX KF664568.1 Vibrio phage CTX isolate recombinant CT KJ540266.1 Vibrio cholerae strain FM11 phage CTX g KJ540260.1 Vibrio cholerae strain IB4563 phage CTX KJ540262.1 Vibrio cholerae strain IB4405 phage CTX KJ540263.1 Vibrio cholerae strain IB4540 phage CTX KJ540267.1 Vibrio cholerae strain FM12 phage CTX g KJ540268.1 Vibrio cholerae strain FM13 phage CTX g KJ540261.1 Vibrio cholerae strain IB4247 phage CTX KM352500.1 Vibrio phage CTX strain 81</p>	<p>KT728931.1 Vibrio phage pre-CTX KR063267.1 Vibrio phage pre-CTX</p>	R, G, B, C, S, P
24	JN848801.1 Vibrio phage VCY-phi	<p>AY242528.1 Vibrio cholerae phage VGJphi AF453500.3 Vibrio phage VSK AB572858.1 Vibrio phage ND1-fs1</p>	FJ904927.1 Vibrio phage VEJphi	R, G, B, M, C, S, P, L, 3S
25	KJ003982.1 Uncultured phage WW-nAnB strain 3	Desconhecido	KJ003981.1 Uncultured phage WW-nAnB strain 2	R, G, B, M, C, 3S

Continuação da tabela suplementar 2

26	MF155889.1 Vibrio virus CTXphi	KT728930.1 Vibrio phage pre-CTX	KR063267.1 Vibrio phage pre-CTX KY474413.1 Vibrio cholerae strain J6 KY474411.1 Vibrio cholerae strain No341	R, G, B,
27	MN536023.1 Vibrio phage VP24-2_Ke	AY242528.1 Vibrio cholerae phage VGJphi AB572858.1 Vibrio phage ND1-fs1 AF452449.2 Bacteriophage VSKK	AF453500.3 Vibrio phage VSK	R, G, B, M, C, P, L, 3S
28	KY474417.1 Vibrio cholerae strain P16 chromosome 1 KY474414.1 Vibrio cholerae strain C2 chromosome 1 [T] GQ466608.1 Vibrio phage CTX strain IB1346 RstR [aj]	KJ540266.1 Vibrio cholerae strain PM11 phage CTX KF664566.1 Vibrio phage CTX RstR KY474419.1 Vibrio cholerae strain M25 KF664568.1 Vibrio phage CTX isolate recombinant CT KJ540267.1 Vibrio cholerae strain PM12 phage CTX KJ540268.1 Vibrio cholerae strain PM13 phage CTX	KY474411.1 Vibrio cholerae strain No341 KY474414.1 Vibrio cholerae strain C2	R, G, M, C, S, 3S
29	AB937974.1 Ralstonia phage RS603	MF716957.1 Ralstonia virus RSIBR1	KX179905.1 Ralstonia phage Rs551 AB434711.1 Ralstonia phage RSM3	R, G, B, M, C, P, L, 3S
30	KY474414.1 Vibrio cholerae strain C2 chromosome 1	KY474417.1 Vibrio cholerae strain P16 chromosome 1	KY474413.1 Vibrio cholerae strain J6 chromosome 1	G, B, M, C, S, 3S
31	KT728931.1 Vibrio phage pre-CTX GQ485644.1 Vibrio phage CTX strain B33 RstR [ajust GQ485645.1 Vibrio phage CTX strain MJ1236 [ajustad GQ466612.1 Vibrio phage CTX strain IB1482 [ajustad GQ466609.1 Vibrio phage CTX strain IB1346 RstR [aj GQ485646.1 Vibrio phage CTX strain MG116926 RstR [a GQ485649.1 Vibrio phage CTX strain E1781 RstR [aju KF664567.1 Vibrio phage CTX plasmid pCTX-2 RstR [a KF664572.1 Vibrio phage CTX RstR [ajustado_p] KR063267.1 Vibrio phage pre-CTX	Desconhecido	KY454839.1 Vibrio cholerae strain C1 CTX KY474413.1 Vibrio cholerae strain J6 KY474411.1 Vibrio cholerae strain No341 KY474416.1 Vibrio cholerae strain P2 KY474419.1 Vibrio cholerae strain M25 HQ224500.1 Vibrio phage CTX KJ540259.1 Vibrio cholerae strain IB5419 phage CTX GQ485650.1 Vibrio phage CTX strain IB4322 GQ485652.1 Vibrio phage CTX strain 01.07vp RstR KJ540258.1 Vibrio cholerae strain IB4712 phage CTX KJ540264.1 Vibrio cholerae strain IB5230 phage CTX KF664568.1 Vibrio phage CTX isolate recombinant CT KJ540266.1 Vibrio cholerae strain PM11 phage CTX KJ540260.1 Vibrio cholerae strain IB4563 phage CTX KJ540262.1 Vibrio cholerae strain IB4405 phage CTX KJ540263.1 Vibrio cholerae strain IB4540 phage CTX KJ540267.1 Vibrio cholerae strain PM12 phage CTX KJ540268.1 Vibrio cholerae strain PM13 phage CTX KJ540261.1 Vibrio cholerae strain IB4247 phage CTX KM352500.1 Vibrio phage CTX strain 81	R, G, B, M, C, S, P, L

Continuação da tabela suplementar 2

32	KX179905.1 Ralstonia phage Rs551 MF716957.1 Ralstonia virus RSIBR1	Desconhecido	KF887906.1 Ralstonia phage 1 NP-2014 AB434711.1 Ralstonia phage RSM3	R, G, B, M, C, P, L, 3S
33	JQ408219.1 Ralstonia phage RSS0 AB259124.1 Ralstonia phage RSS1	Desconhecido	AY374414.2 Ralstonia phage p12J	R, G, B, M, S, P, L
34	AF416590.1 Vibrio phage CTX	AY714348.1 Vibrio cholerae phage KSF-1phi	KY474413.1 Vibrio cholerae strain J6 KY474411.1 Vibrio cholerae strain No341 KT728931.1 Vibrio phage pre-CTX KT728930.1 Vibrio phage pre-CTX	R, G, B, M, S, P
35	MT495635.1 Ralstonia phage RSBg AB828698.1 Ralstonia phage RSS30 JQ408219.1 Ralstonia phage RSS0 LC066596.1 Ralstonia phage RSS-TH1 AB259124.1 Ralstonia phage RSS1 AB931172.1 Ralstonia phage RS611	Desconhecido	AB981170.1 Ralstonia phage RSMSuper AB434711.1 Ralstonia phage RSM3 KX179905.1 Ralstonia phage Rs551 MF716957.1 Ralstonia virus RSIBR1	R, G, B, M, S, 3S
36	KY474413.1 Vibrio cholerae strain J6	KJ540266.1 Vibrio cholerae strain FM11 phage CTX KF664566.1 Vibrio phage CTX RstR KY474419.1 Vibrio cholerae strain M25 KJ540267.1 Vibrio cholerae strain FM12 phage CTX KJ540268.1 Vibrio cholerae strain FM13 phage CTX	KY454839.1 Vibrio cholerae strain C1 CTX region ge)	R, G, B,
37	KX181651.1 Xanthomonas phage Xf109	MH206184.1 Xanthomonas phage phiLf UK variant	MN263053.1 UNVERIFIED: Xanthomonas phage phiLF	R, G, B, M, C, S, 3S
38	AB572858.1 Vibrio phage ND1-fs1 AY242528.1 Vibrio cholerae phage VGJphi AF453500.3 Vibrio phage VSK	Desconhecido	FJ904927.1 Vibrio phage VEJphi	R, G, B, M, C, P, L, 3S
39	AB259123.2 Ralstonia phage RSM1	MF716957.1 Ralstonia virus RSIBR1	KX179905.1 Ralstonia phage Rs551	R, G, B,
40	NC_043029.1 Stenotrophomonas phage phiSMA6 provira	MN335248.1 Xanthomonas phage XaF13 KX181651.1 Xanthomonas phage Xf109		R, G, B, M, C, L
41	MH552488.1 Inoviridae sp. isolate ctada6	M57538.1 Xanthomonas phage Cf1c	AB910602.1 Xanthomonas phage XacF1	R, G, B, M, P, L
42	MN335248.1 Xanthomonas phage XaF13 KX181651.1 Xanthomonas phage Xf109	MH552488.1 Inoviridae sp. isolate ctada6	EF489910.1 Stenotrophomonas phage PSH1 NC_043029.1 Stenotrophomonas phage phiSMA6 proviral	R, G, C, S, 3S

Continuação da tabela suplementar 2

43	JQ408219.1 <i>Ralstonia</i> phage RSS0 AB259124.1 <i>Ralstonia</i> phage RSS1	AB828698.1 <i>Ralstonia</i> phage RSS30	MT495635.1 <i>Ralstonia</i> phage RSBg	R, G, B, M, C, P, L
44	MH206184.1 <i>Xanthomonas</i> phage phiLf UK variant AB910602.1 <i>Xanthomonas</i> phage XacF1 M57538.1 <i>Xanthomonas</i> phage Cf1c MN263053.1 UNVERIFIED: <i>Xanthomonas</i> phage phiLF	MN335248.1 <i>Xanthomonas</i> phage XaF13	HM150760.1 <i>Stenotrophomonas</i> phage phiSHP2 HG007973.1 <i>Stenotrophomonas</i> phage phiSMA7 proviral	R, G, B, M, P, L, 3S
45	NC_043029.1 <i>Stenotrophomonas</i> phage phiSMA6 proviral	MN335248.1 <i>Xanthomonas</i> phage XaF13 KX181651.1 <i>Xanthomonas</i> phage Xf109	Desconhecido	R, G, B, P, L, S
46	AB828698.1 <i>Ralstonia</i> phage RSS30	LC066596.1 <i>Ralstonia</i> phage RSS-TH1 AB259124.1 <i>Ralstonia</i> phage RSS1	JQ408219.1 <i>Ralstonia</i> phage RSS0	R, G, B, M, C, S, P, L
47	AB002632.1 <i>Vibrio</i> phage fs2 KC357596.1 <i>Vibrio</i> phage VFJ	Desconhecido	MH649021.1 <i>Inoviridae</i> sp. isolate cti000	R, G, B, M, P, L
48	KJ003982.1 Uncultured phage WW-nAnB strain 3	Desconhecido	JN402401.1 Uncultured phage WW-nAnB	R, G, B, M, C, 3S
49	AF453500.3 <i>Vibrio</i> phage VSK AF452449.2 Bacteriophage VSKK	MN536023.1 <i>Vibrio</i> phage VP24-2_Ke	D89074.1 <i>Vibrio</i> phage fs1	R, G, B, M, C, S, P, L, 3S
50	AY242528.1 <i>Vibrio cholerae</i> phage VGJphi	AF453500.3 <i>Vibrio</i> phage VSK	D89074.1 <i>Vibrio</i> phage fs1	R, G, B, M, C, S, P, 3S
51	D89074.1 <i>Vibrio</i> phage fs1	AY242528.1 <i>Vibrio cholerae</i> phage VGJphi AF453500.3 <i>Vibrio</i> phage VSK AB572858.1 <i>Vibrio</i> phage ND1-fs1	AF452449.2 Bacteriophage VSKK	R, G, B, M, C, P, L, 3S
52	AB002632.1 <i>Vibrio</i> phage fs2	AY242528.1 <i>Vibrio cholerae</i> phage VGJphi AF453500.3 <i>Vibrio</i> phage VSK AB572858.1 <i>Vibrio</i> phage ND1-fs1 AF452449.2 Bacteriophage VSKK	FJ904927.1 <i>Vibrio</i> phage VEJphi	R, G, B, M, C, S
53	AB937974.1 <i>Ralstonia</i> phage RS603	MF716957.1 <i>Ralstonia</i> virus RSIBR1	KX179905.1 <i>Ralstonia</i> phage Rs551	R, G, B, M, S, P, L
54	MH617717.1 <i>Inoviridae</i> sp. isolate ctcc37	Desconhecido	MH617298.1 <i>Inoviridae</i> sp. isolate ctb36	R, G, B, M, C, P, L

Continuação da tabela suplementar 2

55	AF416590.1 Vibrio phage CTX core region Cep	KY474411.1 Vibrio cholerae strain No341 KR063267.1 Vibrio phage pre-CTX KT728930.1 Vibrio phage pre-CTX	KP972569.1 Vibrio phage pre-CTX	R, G, B, M, C, S, P
56	KR063267.1 Vibrio phage pre-CTX KT728930.1 Vibrio phage pre-CTX	Desconhecido	MF155889.1 Vibrio virus CTXphi	R, G, B, M, C, S, P, L
57	KX181651.1 Xanthomonas phage Xf109	AB910602.1 Xanthomonas phage XacF1	M57538.1 Xanthomonas phage Cf1c	R, G, B, M, C, P, L
58	AB002632.1 Vibrio phage fs2 KC357596.1 Vibrio phage VFJ	Desconhecido	AF452449.2 Bacteriophage VSKK FJ904927.1 Vibrio phage VEJphi	R, G, B, M, C, P, L, 3S
59	AF452449.2 Bacteriophage VSKK	Desconhecido	D89074.1 Vibrio phage fs1	R, G, B, M, C, P, L
61	MN536023.1 Vibrio phage VP24-2_Ke	AY242528.1 Vibrio cholerae phage VGJphi AF453500.3 Vibrio phage VSK	AF452449.2 Bacteriophage VSKK	R, G, B, M, C, P, L, 3S
61	AY242528.1 Vibrio cholerae phage VGJphi	Desconhecido	FJ904927.1 Vibrio phage VEJphi AF453500.3 Vibrio phage VSK	R, G, B, M, C, 3S
62	AY374414.2 Ralstonia phage p12J	Desconhecido	HM064452.1 Ralstonia phage PE226 AB828698.1 Ralstonia phage RSS30 LC066596.1 Ralstonia phage RSS-TH1 AB931172.1 Ralstonia phage RS611	R, G, B, C, S, 3S
63	MH649021.1 Inoviridae sp. isolate cti000	D89074.1 Vibrio phage fs1	JN848801.1 Vibrio phage VCY-phi MN536023.1 Vibrio phage VP24-2_Ke AF452449.2 Bacteriophage VSKK D89074.1 Vibrio phage fs1	R, G, B,
64	MN536023.1 Vibrio phage VP24-2_Ke	AF453500.3 Vibrio phage VSK	AB572858.1 Vibrio phage ND1-fs1	R, G, B, M, C, P, L, 3S
65	AB910602.1 Xanthomonas phage XacF1 M57538.1 Xanthomonas phage Cf1c	Desconhecido	MH206183.1 Xanthomonas phage phiXv2 MH206184.1 Xanthomonas phage phiLf UK variant	R, G, B,
66	AB828698.1 Ralstonia phage RSS30	MT495635. Ralstonia phage RSBg	LC066596.1 Ralstonia phage RSS-TH1	R, G, B, M, C, 3S
67	JN848801.1 Vibrio phage VCY-phi	AB002632.1 Vibrio phage fs2	KC357596.1 Vibrio phage VFJ	R, G, B, M, P, L

Final da tabela suplementar 2

68	KJ003982.1 Uncultured phage WW-nAnB strain 3	Desconhecido	JN402401.1 Uncultured phage WW-nAnB	R, G, B, M, P, L
69	AY374414.2 Ralstonia phage p12J	AB828698.1 Ralstonia phage RSS30 MT495635.1 Ralstonia phage RSBg	LC066596.1 Ralstonia phage RSS-TH1	R, G, B, M, L, 3S
70	AB931172.1 Ralstonia phage RS611	MT495635. Ralstonia phage RSBg	LC066596.1 Ralstonia phage RSS-TH1	R, G, B, M, C, S
71	D89074.1 Vibrio phage fs1	AF452449 Bacteriophage VSKK	MN536023.1 Vibrio phage VP24-2_Ke	R, G, B, M, C, P, L, 3S
72	FJ904927.1 Vibrio phage VEJphi	D89074.1 Vibrio phage fs1	AY242528.1 Vibrio cholerae phage VGJphi	R, G, B, M, C, S
73	MH649021.1 Inoviridae sp. isolate cti000	D89074.1 Vibrio phage fs1	AY242528.1 Vibrio cholerae phage VGJphi	R, G, B, M, P, L, 3S

Tabela suplementar 3. Lista de tubulavirus e 16s do hospedeiro correspondente

Número de acesso das sequências de 16s	Hospedeiro	Tubulavirus
NR_074448	<i>Acholeplasma laidlawii</i> PG-8A	Acholeplasma phage MV-L1
LT899983	<i>Escherichia coli</i> JE2571/N3	Enterobacteria phage Ike
NR_024570	<i>Escherichia coli</i> U 5/41	Escherichia virus M13
NR_024570		Phage M13mp18
NR_024570		Escherichia phage fd
NR_024570		Enterobacteria phage f1
LJ838_01015	<i>Escherichia coli</i> B95. delta A	Enterobacteria phage f1
LT899983	<i>Escherichia coli</i> JE2571/N3	Escherichia coli JE2571/N3
MT337602	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Pseudomonas phage Pf3
NR_044816	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Propionibacterium phage B5
NR_043152	<i>Ralstonia pickettii</i>	Ralstonia phage p12J
NR_044040	<i>Ralstonia solanacearum</i> K60-1	Ralstonia phage RSM1
NR_044040		Ralstonia phage RSS30
NR_044040		Ralstonia phage RS611
NR_044040		Ralstonia phage RS603
NR_044040		Ralstonia phage RSMSuper
NR_044040		Ralstonia phage PE226
NR_044040		Ralstonia phage RSS0
NR_044040		Ralstonia phage RSS-TH1
NR_044040		Ralstonia virus RSIBR1
NR_044040		Ralstonia phage RSBg
NR_044040		Ralstonia phage RSS1
NR_044040		Ralstonia phage RSM3
NR_044040		Ralstonia phage Rs551
NR_044040		Ralstonia phage 1 NP-2014

Continuação da tabela suplementar 3

NR_036849		Spiroplasma phage SVGII3
NR_036849	<i>Spiroplasma citri</i> R8A2HP	Spiroplasma phage SVTS2
NR_036849		Spiroplasma phage 1-R8A2B
NR_036849		Spiroplasma phage 1-C74
NR_104847	<i>Spiroplasma kunkelii</i> E275	Spiroplasma virus SkV1CR23x
NR_040804		Stenotrophomonas phage PSH1
NR_040804	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Stenotrophomonas phage SMA7
NR_040804		Stenotrophomonas phage SHP2
NR_040804		Stenotrophomonas phage SMA6
NR_037066	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	Thermus phage phiOH3
NR_037066		Thermus phage phiOH16
NR_044825		Vibrio phage K04M1_VK04M1
NR_044825	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Vibrio phage K05K4_VK05K4_1
NR_044825		Vibrio phage K05K4_VK05K4_2
NR_044825		Vibrio phage VALG_phi8

Continuação da tabela suplementar 3

NR_119051		Vibrio phage fs2
NR_119051		Vibrio phage ND1-fs1
NR_119051		Vibrio phage CTX
NR_119051		Vibrio phage VSK
NR_119051		Vibrio phage VGJ
NR_119051		Vibrio phage KSF1
NR_119051	<i>Vibrio cholerae ATCC 14035</i>	Vibrio virus fs1
NR_119051		Vibrio phage VEJphi
NR_119051		Vibrio phage VCY-phi
NR_119051		Vibrio phage VFJ
NR_119051		Vibrio phage pre-CTX
NR_119051		Vibrio phage VP24-2_Ke
NR_119051		Vibrio phage VSKK

Continuação da tabela suplementar 3

NR_041838		Vibrio virus Vf33
NR_041838	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	Vibrio phage Vf12
NR_041838		Vibrio phage VfO3K6
NR_041838		Vibrio phage VfO4K68
NR_026317	<i>Xanthomonas axonopodis</i> LMG 538	Xanthomonas phage XacF1
MN108237		Xanthomonas virus Cf1c
MN108237	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Xanthomonas phage phiXv2
MN108237		Xanthomonas phage phiLF
NR_026319	<i>Xanthomonas oryzae</i> strain LMG 5047	Xanthomonas phage Xf109
NR_026388	<i>Xanthomonas vesicatoria</i> ATCC 35937	Xanthomonas phage XaF13

CAPÍTULO 5

RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA USANDO SEQUENCIAS DE GENOMA COMPLETO É UMA FERRAMENTA ÚTIL PARA A TAXONOMIA DE TUBULAVIRUS.

Rezende R. R., Morgan T., Mendes S. F. e Alfenas-Zerbini, P.. A reconstrução filogenética através do genoma completo é uma ferramenta poderosa para a taxonomia de tubulavirus.

Reconstrução filogenética usando sequencias de genoma completo é uma ferramenta útil para a taxonomia de tubulavirus

Rafael Reis de Rezende^a, Túlio Morgan^a, Sávio Ferreira Mendes^a, e Poliane Alfenas-Zerbini^{a#}

^aDepartamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

#Autor para correspondência: Poliane Alfenas-Zerbini; e-mail: palfenas@ufv.br

Palavras-chaves: Tubulavirus, Taxonomia tubulaviruses, e classificação de tubulaviruses.

INTRODUÇÃO

Em 2020 foi proposta a megataxonomia viral em que os vírus foram classificados taxonomicamente em clados superiores à ordem, denominados classe, filo, reino e domínio (Koonin *et al.*, 2020). A megataxonomia é baseada na presença de *viral hallmark genes*, presentes em um grande número de vírus. Por exemplo, vírus de ssDNA compartilham proteínas de replicação homologas da superfamília de endonucleases His-hidrofóbica-His (HUH), sendo a característica utilizada para agrupar esses vírus na megataxonomia viral (Krupovic & Koonin, 2017; Kazlauskas *et al.*, 2019; Koonin *et al.*, 2020). Esse critério é útil para a classificação em táxons superiores, contudo não apresenta poder de resolução para classificação viral em táxons inferiores (família, gênero e espécie). Nestes casos, têm sido utilizadas características biológicas (hospedeiros, distribuição geográfica etc.), moleculares (conteúdo GC, tamanho do genoma etc.) e principalmente a reconstrução filogenética. Exemplificando, circovírus, genomovírus e geminivírus são vírus com características biológicas distintas, cujas proteínas de replicação são homologas da superfamília de endonucleases His-hidrofóbica-His, portando todos agrupados no domínio *Monodnaviria*. Contudo, as classificações desses vírus em níveis de família e gênero ocorrem utilizando comparações de sequências par-a-par e/ou filogenia molecular (Meng *et al.*, 2015; Zerbini *et al.*, 2017; Breitbart *et al.*, 2017; Knezevic & Adriaenssens, 2021b; Varsani & Krupovic, 2021b).

A filogenia é uma estratégia comumente adotada para classificar vírus, permitindo inferir associações entre as características biológicas dos vírus e sua história evolutiva (Varsani & Krupovic, 2017; Dutilh *et al.*, 2021). Para obtenção das reconstruções filogenéticas podem ser utilizadas sequências de nucleotídeos do genoma completo; regiões específicas dos genomas; ou sequências de nucleotídeos, ou aminoácidos de um ou mais genes. O principal aspecto que essas sequências devem possuir é a capacidade de fornecer informações suficientes para os métodos de reconstrução filogenética (Yang & Rannala, 2012).

Os tubulavirus, semelhante aos demais vírus de ssDNA apresentam proteínas de replicação homologas da superfamília de endonucleases His-hidrofóbica-His, portanto agrupados no domínio *Monodnaviridae* (Koonin *et al.*, 2020). Para a classificação dos gêneros das famílias de tubulavirus têm sido utilizadas similaridade de DNA e sequências de aminoácidos de proteínas, como da proteína de

morfogênese pl (Knezevic & Adriaenssens, 2021a,b). A proteína de morfogênese pl está presente em todos os genomas de tubulavirus (Roux *et al.*, 2019; Capítulo 4). Entretanto, essa proteína apresenta vários ortólogos distintos, em outras palavras a variabilidade entre as proteínas pl são tão altas de modo que não são mais reconhecidas como ortólogos. Por essa razão, é desaconselhado o seu uso como um marcador filogenético (Capítulo 4). A reconstrução filogenética de tubulavirus utilizando sequências de aminoácidos da proteína pl agrupam no mesmo clado tubulavirus com características moleculares e biológicas distintas (Figura suplementar 2 - Capítulo 4). No entanto, a reconstrução filogenética utilizando genomas completos resulta em uma árvore em que os tubulavirus são agrupados em clados que apresentam características moleculares e biológicas semelhantes (Figuras 2, 3, 4 e 5 - Capítulo 4). Diferentemente do uso da proteína pl, a reconstrução filogenética usando genomas completos consegue evidenciar os eventos de especiação ocorridos no percurso evolutivo realizado pelos tubulavirus. Sendo assim, a filogenia molecular de tubulavirus usando genomas completos mostra um maior poder de resolução evolutiva do que o uso da proteína pl (Capítulo 4)(Rezende *et al.*, 2021).

O objetivo deste trabalho é propor um sistema para classificação dos tubulavirus nos níveis de família, gênero e espécie usando filogenia molecular e comparação par-a-par usando sequências de genomas completos.

RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA USANDO GENOMAS COMPLETOS, UMA FERRAMENTA IDEAL PARA CLASSIFICAÇÃO DOS TUBULAVIRUS

Um conjunto de dados com 241 sequências de genomas completos de tubulavirus presentes no *Genbank* foi preparado em setembro de 2021. As sequências foram caracterizadas por diferentes grupos em torno do mundo, sendo na Europa, América do Norte e Ásia o maior número de sequências caracterizadas (Figura 1A). Os primeiros tubulavirus foram identificados e caracterizados entre os anos 1975 e 1990. A partir do ano 2000 houve um aumento dos números de sequências identificadas, e a partir do ano de 2015 surgiram as primeiras sequências identificadas em metagenomas, aumentando em muito o número total de sequências de tubulavirus (Figura 1B). As sequências apresentam tamanho entre 5.000 e 10.000 nucleotídeos, no entanto, algumas sequências possuem de 15.000 a 25.000 nucleotídeos (Figure 1C). Essas são sequências de tubulavirus que infectam bactérias do gênero *Vibrio* na

forma de profago, os quais se arranjam em tandem no *locus* de inserção, contudo não tiveram o genoma presente na partícula sequenciados até o momento (Lee *et al.*, 2010a,b; Choi *et al.*, 2010; Tasaka *et al.*, 2020). Em relação à distribuição do conteúdo GC os genomas se dividem em três grupos. Um grupo maior com conteúdo GC de 40 a 50%, um segundo grupo com conteúdo GC em torno de 60% e um terceiro grupo com poucos indivíduos com conteúdo GC de 20 a 25% (Figura 1D).

Para a reconstrução filogenética, todas as sequências foram linearizadas a partir do ATG da ORF da proteína de morfogênese pl. As proteínas pl de todas as sequências foram identificadas conforme a metodologia proposta por Roux *et al.*, (2019). As sequências foram então alinhadas usando o programa MAFFT (--auto --maxiterate 1000 --op 1.0 --ep 0.1) (Nakamura *et al.*, 2018), o alinhamento foi trimado usando o programa TrimAl (-gt 0.6 -cons 60) (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009) e em seguida o melhor modelo de substituição foi determinado usando o programa ngModelTest (GTR+G4) (Darriba *et al.*, 2020). A árvore filogenética foi reconstruída utilizando o método de máxima verossimilhança usando o programa RAxML (Stamatakis, 2014) seguido do teste de *Bootstrap* com 1.000 repetições. A árvore foi visualizada, ajustada e enraizada em *midpoint* na plataforma iTool (Letunic & Bork, 2021).

A árvore filogenética dos tubulavirus evidenciou a formação de 15 clados (Figura 2 e Figura suplementar 1). Quando analisamos os tubulavirus agrupados em cada clado observamos uma relação entre os clados e as características biológicas como hospedeiro e nicho ecológico. Um bom exemplo são clados denominado Fibravirus e Yamadavirus (Figura 2 e Figura suplementar 1) composto pelos tubulavirus que infectam fitobactérias. Outro exemplo, é o clado denominado Choleravirus que é formado apenas pelos tubulavirus que infectam a bactéria *Vibrio cholerae*. Após análise da reconstrução filogenética propomos a criação de uma nova família denominada *Rexviridae* e a criação de 15 novos gêneros (Figura 2 e Figura Suplementar 1).

Para determinar um critério de corte para espécies foi realizada comparação par-a-par para determinar a porcentagem mínima de identidade compartilhada entre os tubulavirus. A comparação par-a-par entre todas as sequências de tubulavirus usados neste estudo revelou que majoritariamente os tubulavirus compartilham de 40 a 50% de identidade (Figura 3). Ao contrário, apenas um pequeno grupo de sequências compartilham alta identidade (> 90%). Essa variação inviabiliza a

determinação de um valor de *cut off* único para ser aplicado a todas as sequências. Sendo assim, realizamos análise de comparação par-a-par dentro de cada gênero e delimitamos valores de *cut off* específicos para cada gênero baseado nos valores de identidade e na aproximação filogenética observada na filogenia (Tabela 2 e Material suplementar). Esse método tem sido usado na classificação de vírus de ssDNA circular como os begomovírus e os genomovírus (Brown *et al.*, 2015; Varsani & Krupovic, 2017, 2021a; Rezende *et al.*, 2018). De todos os 15 novos gêneros proposto, os gêneros *Filamentovirus* e *Chordavirus* não apresentam um número de sequências suficiente para determinação do *cut off* utilizando comparações par-a-par. Sendo assim, utilizamos um valor de *cut off* de 95%, o mesmo valor usado para outros grupos de vírus que infectam procaríotos (Dutilh *et al.*, 2021).

Desse modo, é proposto que para a classificação dos tubulavirus em famílias e gêneros as sequências de genomas completos sejam usadas em reconstrução filogenética, e para classificação em espécies seja usado comparação par-a-par dos genomas completos (Figura 2, Tabela 1 e Tabela 2).

Na atual proposta para classificação dos gêneros das famílias *Inoviridae*, *Plectroviridae* não tem sido empregado a utilização de métodos filogenéticos. O critério proposto é um *cut off* de 50% obtido pelo algoritmo BLASTp para as proteínas pl e/ou *major coat protein* (Knezevic & Adriaenssens, 2021a,b). Ressaltamos que o BLASTp reporta a porcentagem de identidade em um alinhamento local, sendo assim, caso as sequências analisadas compartilhem uma região de alta identidade, porém com baixa cobertura serão equivocadamente classificadas no mesmo gênero. Em contrapartida, o método aqui proposto, analisa toda sequência do genoma viral em um alinhamento global, refletindo assim relações evolutivas entres as sequências, bem como demarcando um critério mais assertivo para classificação a nível de espécie.

PASSO A PASSO PARA CLASSIFICAÇÃO DOS TUBULAVIRUS

Com objetivo de facilitar a classificação de novos tubulavirus propomos o seguinte passo a passo:

1. A sequência analisada deve ser linearizada, sendo o nucleotídeo adenina do ATG da ORF da proteína de morfogênese pl como o nucleotídeo 1 da sequência.

- Ressaltamos também que todas as sequências já caracterizadas e depositadas em bancos de dados devem ser linearizadas da mesma forma para evitar alinhamentos errôneos devido às topologias das sequências;
2. O BLASTn com o parâmetro “*non-redundant nucleotide*” deve ser realizado para identificar as sequências semelhantes já caracterizadas. Para facilitar, configurar o parâmetro “*organism*” para “*Tubulavirales (taxid:2732094)*” o qual irá retornar apenas resultados relacionados aos tubulavirus;
 3. A filogenia molecular com genomas completos deve ser realizada utilizando sequências caracterizadas nos níveis taxonômicos de família e/ou gênero. Esses níveis serão determinados analisando a sequência com maior identidade determinada no passo 2. Recomendamos utilizar cladogramas monofiléticos como raiz para melhor evidenciar as relações evolutivas;
 4. Por fim, para determinar se a sequência corresponde a uma nova espécie ou não, deve ser realizada a comparação par-a-par para determinar a menor porcentagem de identidade compartilhada entre as sequências. Em seguida comparar esse valor com o valor de *cut off* determinado para cada gênero (Tabela 2 e Material suplementar).

Na proposta da criação de novos níveis taxonômicos e novas espécies deve-se seguir a nova norma de nome binomial em latim para espécie com formato livre dos epítomos dos nomes (Postler *et al.*, 2017). Aconselhamos também que ao nomear novas espécies e táxons sejam considerados as características de cada espécie e táxon.

REVISÃO TAXONÔMICA DOS VÍRUS PERTENCENTES A CLASSE TUBULAVIRALES

Utilizando a classificação proposta neste trabalho, realizamos a revisão taxonômica da classe *Tubulavirales* (Tabela 1). Propomos mudanças a níveis de família, gênero e espécie.

Nova família *Rexviridae*

Nesta família estão abrigados os gêneros *Filamentovirus*, *Chordavirus*, *Fibravirus* e *Yamadavirus*.

Filamentovirus e *Tenuivirus* são gêneros compostos por um único vírus cada e de origem de estudos de metagenoma.

O gênero *Fibravirus* é composto por tubulavirus que infectam bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*. No novo gênero *Yamadavirus* estão agrupados os tubulavirus que infectam bactérias naturais do solo as quais podem também viver em associação com plantas, seja como simbiote (*Stenotrophomonas* spp.) ou como fitopatógenos (*Ralstonia* spp., *Xanthomonas* spp., e *Pseudomonas* spp.), com exceção da bactéria *Propionibacterium freudenreichii*, uma actinobactéria parasita facultativa de animais.

Reorganização da família *Inoviridae*

A família *Inoviridae* foi reorganizada em 11 novos gêneros.

Novo gênero *Infulavirus*

Aqui estão hospedados três tubulavirus, identificados em estudos de metagenomas e um tubulavirus já caracterizado, Enterobacteria phage If1, pertencente à espécie *Infulavirus entero* proposta neste trabalho.

Novo gênero *Lineavirus*

No novo gênero *Lineavirus* estão agrupados os tubulavirus que infectam bactérias dos gêneros *Vibrio*, *Salmonella*, *Erwinia* e vários tubulavirus não caracterizados obtidos em estudos metagenomas.

Novos gêneros *Griphuvirus*, *Secretuvirus*, *Ignotusvirus* e *Mysterivirus*.

Nestes gêneros estão agrupados apenas tubulavirus não caracterizados obtidos de metagenomas: quatro espécies em *Griphuvirus*, três em *Secretuvirus*, nove em *Ignotusvirus* e 14 em *Mysterivirus*.

Novo gênero *Plectrovirus*

Esse táxon abriga os tubulavirus que infectam bactérias da classe *Mollicutes*. Além disso, o gênero abrigará várias sequências obtidas de metagenomas.

Novo gênero Tertilicivirus

Neste gênero estão abrigados tubulavirus que infectam *Pseudomonas* spp. e tubulavirus não classificados de origem de estudos de metagenomas.

Novo gênero Inovirus

Nesse gênero estão agrupados os primeiros tubulavirus caracterizados, como o Enterofago phage M13, agora nomeado como *Inovirus primis*. Os indivíduos desse clado infectam bactérias dos gêneros *Escherichia* e *Salmonella*.

Novo gênero Paulinivirus

Aqui estão agrupados os tubulavirus que infectam a bactéria extremófila *Thermus thermophilus* e três sequências de tubulavirus não caracterizados.

Novo gênero Choleravirus

Neste gênero estão agrupados os tubulavirus que infectam a bactéria *Vibrio cholera* e carregam os genes *ctxA* e *ctxB*, os quais conferem patogenicidade aos hospedeiros e algumas sequências obtidos de estudos de metagenomas.

CONCLUSÃO

Estudos de metagenomas têm demonstrados que os tubulavirus são mais abundantes no ambiente do que imaginávamos. Sendo assim, um método de classificação taxonômica que associe biologia e evolução deste vírus se torna necessário. Desta forma, esperamos que o método taxonômico aqui proposto possa cumprir essa demanda. Além disso, propomos aqui um método único que poderá ser aplicado a todas as sequências de tubulavirus permitindo assim sua classificação.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Doutor F. Murilo Zerbini pela discussão, leitura crítica e sugestões feitas para este trabalho.

REFERÊNCIAS

- Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Circoviridae. *Journal of General Virology* **98**, 1997–1998.
- Brown JK, Zerbini FM, Navas-Castillo J *et al.*, 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology* **160**, 1593–1619.
- Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T, 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **25**, 1972–1973.
- Choi SY, Lee JH, Kim EJ *et al.*, 2010. Classical RS1 and environmental RS1 elements in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains harbouring a tandem repeat of CTX prophage: revisiting Mozambique in 2005. *Journal of Medical Microbiology* **59**, 302–308.
- Darriba D, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B, Flouri T, 2020. ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models (K Crandall, Ed.). *Molecular Biology and Evolution* **37**, 291–294.
- Dutilh BE, Varsani A, Tong Y *et al.*, 2021. Perspective on taxonomic classification of uncultivated viruses. *Current Opinion in Virology* **51**, 207–215.
- Kazlauskas D, Varsani A, Koonin E V., Krupovic M, 2019. Multiple origins of prokaryotic and eukaryotic single-stranded DNA viruses from bacterial and archaeal plasmids. *Nature Communications* **10**, 3425.
- Knezevic P, Adriaenssens EM, 2021a. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Plectroviridae* ICTV VIRUS TAXONOMY PROFILE ICTV. *Journal of General Virology* **102**, 1597.
- Knezevic P, Adriaenssens EM, 2021b. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Inoviridae*. *Journal of General Virology* **102**, 1614.
- Koonin E V., Dolja V V., Krupovic M *et al.*, 2020. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **84**.
- Krupovic M, Koonin E V., 2017. Multiple origins of viral capsid proteins from cellular

- ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E2401–E2410.
- Lee JH, Choi SY, Jeon YS *et al.*, 2010a. Classification of hybrid and altered *Vibrio cholerae* strains by CTX prophage and RS1 element structure. *Journal of Microbiology* **47**, 783–788.
- Lee JH, Choi SY, Jeon Y-SS *et al.*, 2010b. Classification of hybrid and altered *Vibrio cholerae* strains by CTX prophage and RS1 element structure. *Journal of Microbiology* **47**, 783–788.
- Letunic I, Bork P, 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* **49**, W293–W296.
- Meng F, Babujee L, Jacobs JM, Allen C, 2015. Comparative transcriptome analysis reveals cool virulence factors of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *PLoS ONE* **10**.
- Nakamura T, Yamada KD, Tomii K, Katoh K, 2018. Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments (J Hancock, Ed.). *Bioinformatics* **34**, 2490–2492.
- Postler TS, Clawson AN, Amarasinghe GK *et al.*, 2017. Possibility and challenges of conversion of current virus species names to Linnaean binomials. *Systematic Biology* **66**, 463–473.
- Rezende RR de, Mar TB, Páez LMC *et al.*, 2018. Complete genome sequences of two gemycircularviruses associated with non-cultivated plants in Brazil. *Archives of Virology* **163**, 3163–3166.
- Rezende RR, Morgan T, Mendes SF *et al.*, 2021. Hosts are the primary driver of tubulaviruses evolution. (*Manuscript in preparation*).
- Roux S, Krupovic M, Daly RA *et al.*, 2019. Cryptic inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes. *Nature Microbiology* **4**, 1895–1906.
- Stamatakis A, 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312.

- Tasaka Y, Kawasaki T, Yamada T, 2020. Filamentous Phages Affect Virulence of the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. In: *Biocommunication of Phages*. Cham: Springer International Publishing, 221–237.
- Varsani A, Krupovic M, 2017. Sequence-based taxonomic framework for the classification of uncultured single-stranded DNA viruses of the family Genomoviridae. *Virus Evolution* **3**.
- Varsani A, Krupovic M, 2021a. Family Genomoviridae: 2021 taxonomy update. *Archives of Virology* **2021 166:10 166**, 2911–2926.
- Varsani A, Krupovic M, 2021b. Family Genomoviridae: 2021 taxonomy update. *Archives of Virology* **166**, 2911–2926.
- Yang Z, Rannala B, 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics* **2012 13:5 13**, 303–314.
- Zerbini FM, Bridson RW, Idris A *et al.*, 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *Journal of General Virology* **98**, 131–133.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Principais características das sequências de tubulavírus. Em A, distribuição geográficas dos tubulavirus. Em B, ano em que as sequências foram identificadas e/ou caracterizadas. Já em C e D, temos a distribuição dos tamanhos dos genomas (nucleotídeos) e composição GC% respectivamente.

Figura 2. Reconstrução filogenética dos tubulavírus usando genoma completo com indicação dos novos gêneros e das novas famílias.

Figura 3. Análise de comparação par-a-par com genoma completo dos tubulavírus. Distribuição dos valores de identidade obtidos em comparação par-a-par usando todos os genomas completos alinhados usando o algoritmo MAFFT no programa SDT.

Figura suplementa 1. Reconstrução filogenética dos tubulavírus usando genoma completo com demarcação dos novos táxons propostos neste trabalho. Na parte à esquerda do painel está indicado a divisão das famílias *Rexviridae* e *Inoviridae*. Na parte direita do painel estão indicadas as divisões dos 15 novos gêneros.

FIGURAS

FIGURA 1

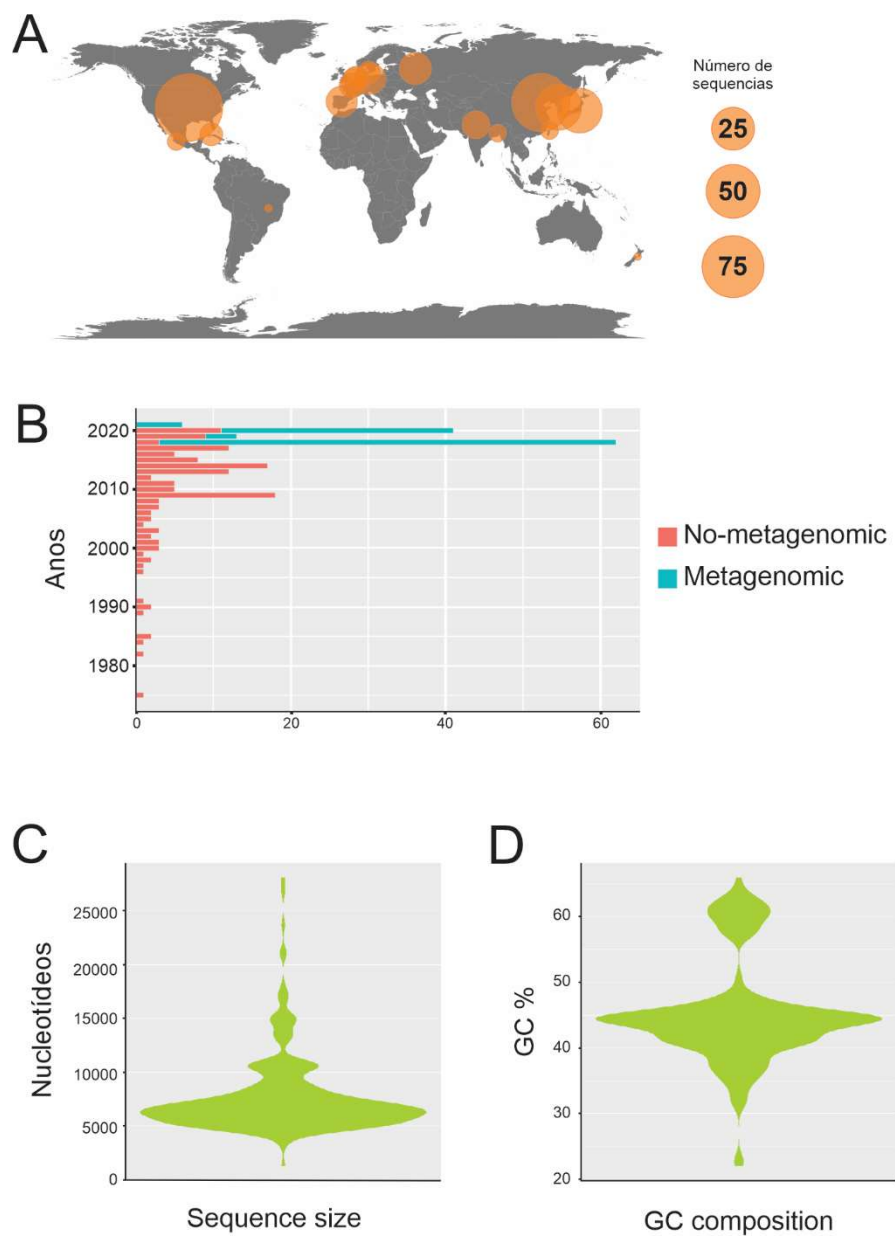


FIGURA 2

Tree scale: 0.1

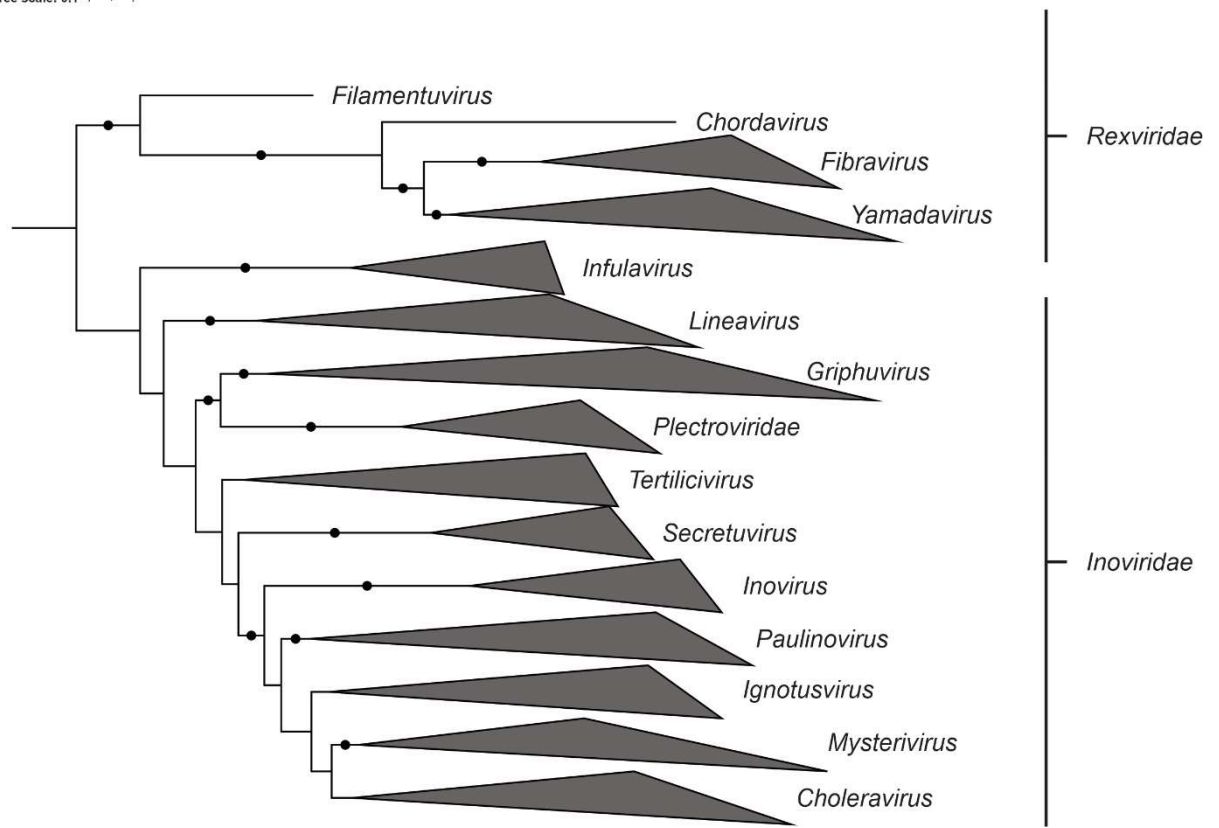


FIGURA 3

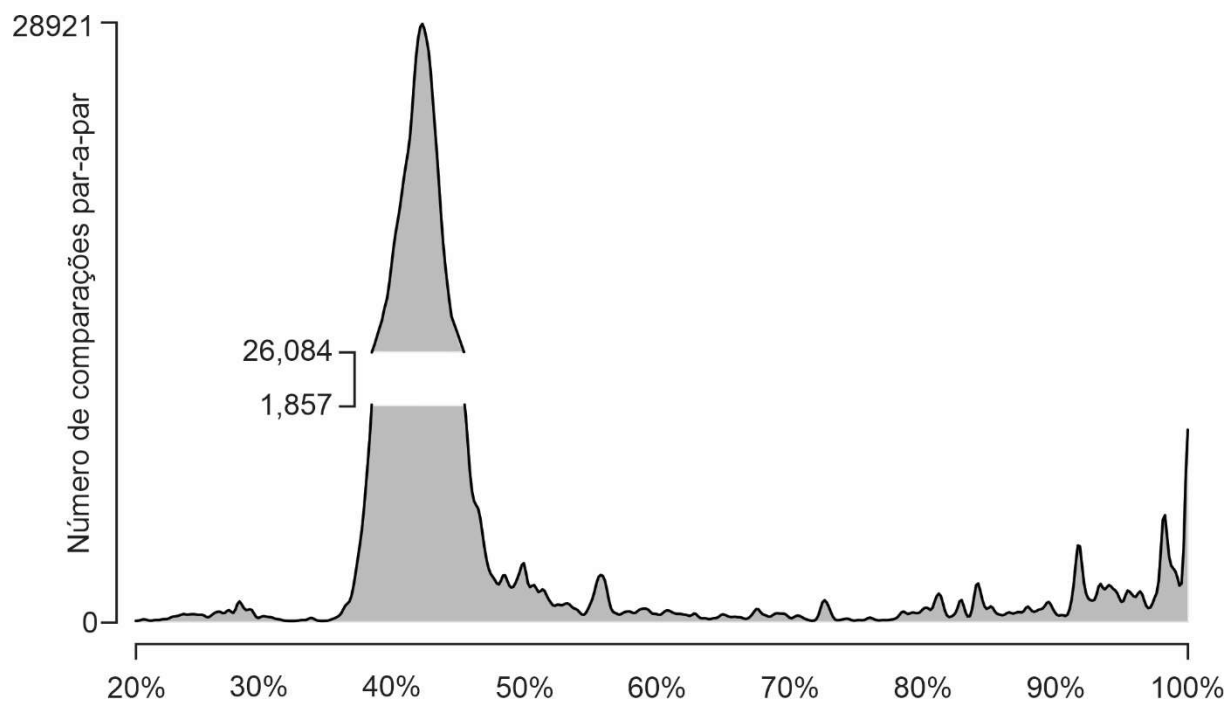
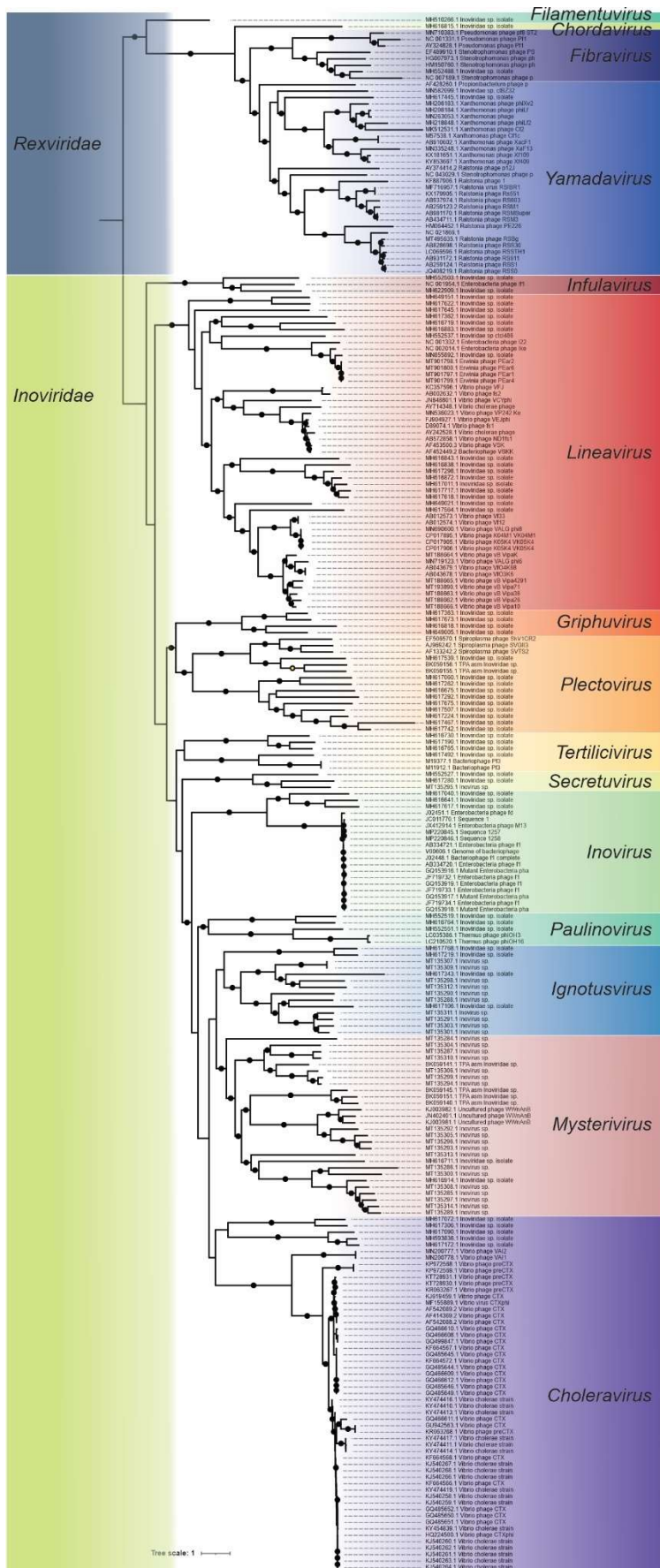


FIGURA SUPLEMENTAR 1



TABELAS

Tabela 1. Nova proposta taxonômica para a classe *Tubulavirales*

Número de acesso Genbank	Nome da sequência	Espécie	Genêro	Família
MH510266.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Filamentovirus arcuscaelestis</i>		<i>Filamentovirus</i>
MH616815.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Chordavirus piscis</i>		<i>Chordavirus</i>
MN710383.1	Pseudomonas phage p8 ST2			
NC 001331.1	Pseudomonas phage Pf1			
AY324828.1	Pseudomonas phage Pf1	<i>Fibravirus pseudomonas</i>		
EF489910.1	Stenotrophomonas phage PS	<i>Fibravirus wuhan</i>		<i>Fibravirus</i>
HG007973.1	Stenotrophomonas phage ph	<i>Fibravirus russia</i>		
HM150760.1	Stenotrophomonas phage ph	<i>Fibravirus chine</i>		
MH552488.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Fibravirus haliotis</i>		
NC 007189.1	Stenotrophomonas phage p	<i>Fibravirus stenotrophomonas</i>		
AF428260.1	Propionibacterium phage p	<i>Yamadavirus propionibacterium</i>		
MN582099.1	Inoviridae sp. ctBZ32	<i>Yamadavirus aquafontana</i>		
MH617445.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Yamadavirus salamandra</i>		
MH206183.1	Xanthomonas phage phiXv2	<i>Yamadavirus baltimore</i>		
MH206184.1	Xanthomonas phage phiLf	<i>Yamadavirus campestris</i>		
MN263053.1	Xanthomonas phage			
MH218848.1	Xanthomonas phage phiLf2			
MK512531.1	Xanthomonas phage Cf2	<i>Yamadavirus lemon</i>		
M57538.1	Xanthomonas phage Cf1c	<i>Yamadavirus primexantho</i>		
AB910602.1	Xanthomonas phage XacF1			<i>Rexviridae</i>
MN335248.1	Xanthomonas phage XaF13	<i>Yamadavirus mexicanus</i>		
KX181651.1	Xanthomonas phage Xf109	<i>Yamadavirus xanthoryza</i>		
KY853667.1	Xanthomonas phage Xf409			
AY374414.2	Ralstonia phage p12J	<i>Yamadavirus ralstonia</i>		
NC 043029.1	Stenotrophomonas phage p	<i>Yamadavirus baikal</i>		<i>Yamadavirus</i>
KF887906.1	Ralstonia phage 1	<i>Yamadavirus ralpickettii</i>		
MF716957.1	Ralstonia virus RSIBR1			
KX179905.1	Ralstonia phage Rs551	<i>Yamadavirus imperium</i>		
AB937974.1	Ralstonia phage RS603	<i>Yamadavirus regio</i>		
AB259123.2	Ralstonia phage RSM1			
AB981170.1	Ralstonia phage RSMSuper	<i>Yamadavirus proprietas</i>		
AB434711.1	Ralstonia phage RSM3			
HM064452.1	Ralstonia phage PE226	<i>Yamadavirus corea</i>		
NC 021866.1	Ralstonia phage RSS20	<i>Yamadavirus iapo</i>		
MT495635.1	Ralstonia phage RSBg			
AB828698.1	Ralstonia phage RSS30			
LC066596.1	Ralstonia phage RSSTH1			
AB931172.1	Ralstonia phage RS611	<i>Yamadavirus regere</i>		
AB259124.1	Ralstonia phage RSS1			
JQ408219.1	Ralstonia phage RSS0			

Continuação da tabela 1

MH552503.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Infulavirus mus</i>	
NC 001954.1	Enterobacteria phage If1	<i>Infulavirus entero</i>	<i>Infulavirus</i>
MH622909.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Infulavirus simia</i>	
MH649151.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Lineavirus acipenser</i>	
MH617622.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Lineavirus alteracipenser</i>	
MH617645.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Lineavirus gadus</i>	
MH617362.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Lineavirus marine</i>	
MH616719.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Lineavirus aqua</i>	
MH616883.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Lineavirus argentumpiscis</i>	
MH552537.1	Inoviridae sp. ctc1486	<i>Lineavirus jerry</i>	
NC 001332.1	Enterobacteria phage I22	<i>Lineavirus pretoria</i>	
NC 002014.1	Enterobacteria phage ke		
MN855892.1	Inoviridae sp. isolate		
MT901798.1	Erwinia phage PEar2	<i>Lineavirus enterico</i>	
MT901800.1	Erwinia phage PEar6		
MT901797.1	Erwinia phage PEar1		
MT901799.1	Erwinia phage PEar4		
KC357596.1	Vibrio phage VFJ	<i>Lineavirus opustessellatum</i>	
AB002632.1	Vibrio phage fs2	<i>Lineavirus insula</i>	
JN848801.1	Vibrio phage VCYphi	<i>Lineavirus vicialia</i>	
AY714348.1	Vibrio cholerae phage KSF-1phi	<i>Lineavirus capistri</i>	
MN536023.1	Vibrio phage VP242 Ke		
FJ904927.1	Vibrio phage VEJphi		
D89074.1	Vibrio phage fs1	<i>Lineavirus mundanus</i>	
AY242528.1	Vibrio cholerae phage VGJphi		
AB572858.1	Vibrio phage ND 1fs1		<i>Inoviridae</i>
AF453500.3	Vibrio phage VSK		
AF452449.2	Bacteriophage VSKK	<i>Lineavirus india</i>	<i>Lineavirus</i>
MH616843.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Lineavirus musca</i>	
MH616838.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Lineavirus agricopiscis</i>	
MH617298.1	Inoviridae sp. isolate		
MH616872.1	Inoviridae sp. isolate		
MH617011.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Lineavirus aeglefinus</i>	
MH617717.1	Inoviridae sp. isolate		
MH617618.1	Inoviridae sp. isolate		
MH649021.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Lineavirus loligo</i>	
AB012573.1	Vibrio phage Vf33		
AB012574.1	Vibrio phage Vf12		
MN690600.1	Vibrio phage VALG phi8	<i>Lineavirus villus</i>	
CP017895.1	Vibrio phage K04M1 VK04M1		
CP017906.1	Vibrio phage K05K4 VK05K4		
MH617564.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Lineavirus vialginolyticus</i>	
CP017905.1	Vibrio phage K05K4 VK05K4	<i>Lineavirus kielFjord</i>	
MT188664.1	Vibrio phage vB VipaK		
MN719123.1	Vibrio phage VALG phi6		
AB043679.1	Vibrio phage VfO4K68		
AB043678.1	Vibrio phage VfO3K6		
MT188665.1	Vibrio phage vB Vipa4291	<i>Lineavirus viparahaemolyticus</i>	
MT193890.1	Vibrio phage vB Vipa71		
MT188663.1	Vibrio phage vB Vipa36		
MT188662.1	Vibrio phage vB Vipa26		
MT188666.1	Vibrio phage vB Vipa10		

Continuação da tabela 1

MH617363.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Griphovirus boreas</i>	<i>Griphovirus</i>	
MH617673.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Griphovirus zefiro</i>		
MH616818.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Griphovirus euro</i>		
MH649005.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Griphovirus noto</i>		
EF506570.1	Spiroplasma phage SkV1CR23x	<i>Plectrovirus maiziumobus</i>	<i>Plectrovirus</i>	
AJ969242.1	Spiroplasma phage SVGI3	<i>Plectroviridae citrumobus</i>		
AF133242.2	Spiroplasma phage SVTS2	<i>Plectrovirus spiralis</i>		
MH617539.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Plectrovirus asiaticusimia</i>		
BK059156.1	TPA asm Inoviridae sp.	<i>Plectrovirus homoos</i>		
BK059155.1	TPA asm Inoviridae sp.	<i>Plectrovirus homovagina</i>		
MH617060.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Plectrovirus situlakappa</i>		
MH617262.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Plectrovirus hydrofambda</i>		
MH616675.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Plectrovirus anchatheta</i>		
MH617292.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Plectrovirus sadalmelikalpha</i>		
MH617675.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Plectrovirus cutieffy</i>		
MH617507.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Plectrovirus sadalbachia gamma</i>		
MH617224.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Plectrovirus skatdelta</i>		
MH617467.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Plectrovirus alballi</i>		
MH617742.1	Inoviridae sp. isolate			
MH616730.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Tertlicivirus alfapiscium</i>		
MH617190.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Tertlicivirus betapiscium</i>		
MH616765.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Tertlicivirus etapiscium</i>		
MH617492.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Tertlicivirus omicronpiscium</i>		
M19377.1	Bacteriophage PF3	<i>Tertlicivirus pseudomonas</i>		
M11912.1	Bacteriophage PF3			
MH552527.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Secretuvirus mankey</i>	<i>Secretuvirus</i>	<i>Inoviridae</i>
MH617280.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Secretuvirus aipom</i>		
MT135295.1	Inovirus sp.	<i>Secretuvirus spoink</i>		
MH617040.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Inovirus secundum</i>	<i>Inovirus</i>	
MH616641.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Inovirus tertium</i>		
MH617617.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Inovirus quartus</i>		
J02451.1	Enterobacteria phage fd			
JC011770.1	Sequence 1			
JX412914.1	Enterobacteria phage M13			
MP220845.1	Sequence 1257			
MP220846.1	Sequence 1258			
AB334721.1	Enterobacteria phage f1			
V00606.1	Genome of bacteriophage			
J02448.1	Bacteriophage f1 complete	<i>Inovirus primis</i>		
AB334720.1	Enterobacteria phage f1			
GQ153916.1	Mutant Enterobacteria pha			
JF719732.1	Enterobacteria phage f1			
GQ153919.1	Enterobacteria phage f1			
JF719733.1	Enterobacteria phage f1			
GQ153917.1	Mutant Enterobacteria pha			
JF719734.1	Enterobacteria phage f1			
GQ153918.1	Mutant Enterobacteria pha			
MH552519.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Paulinovirus dedenne</i>	<i>Paulinovirus</i>	
MH616764.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Paulinovirus rattuvulva</i>		
MH552551.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Paulinovirus manil</i>		
LC035386.1	Thermus phage phiOH3	<i>Paulinovirus thermus</i>		
LC210520.1	Thermus phage phiOH16			

Continuação da tabela 1

MH617768.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Ignotusvirus oceano</i>	
MH617219.1	Inoviridae sp. isolate		
MT135307.1	Inovirus sp.	<i>Ignotusvirus porcus</i>	
MT135309.1	Inovirus sp.		
MH617343.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Ignotusvirus poseidon</i>	
MT135298.1	Inovirus sp.	<i>Ignotusvirus grumpig</i>	
MT135312.1	Inovirus sp.	<i>Ignotusvirus tepig</i>	<i>Ignotusvirus</i>
MT135290.1	Inovirus sp.	<i>Ignotusvirus swinub</i>	
MT135288.1	Inovirus sp.	<i>Ignotusvirus emboar</i>	
MH617106.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Ignotusvirus faecesimia</i>	
MT135311.1	Inovirus sp.		
MT135291.1	Inovirus sp.	<i>Ignotusvirus sus</i>	
MT135303.1	Inovirus sp.		
MT135301.1	Inovirus sp.		
MT135284.1	Inovirus sp.	<i>Mysterivirus</i>	
MT135304.1	Inovirus sp.	<i>Mysterivirus</i>	
MT135287.1	Inovirus sp.	<i>Mysterivirus</i>	
MT135310.1	Inovirus sp.		
BK059141.1	TPA asm Inoviridae sp.	<i>Mysterivirus homintestinum</i>	
MT135306.1	Inovirus sp.		
MT135299.1	Inovirus sp.	<i>Mysterivirus</i>	<i>Inoviridae</i>
MT135294.1	Inovirus sp.		
BK059145.1	TPA asm Inoviridae sp.		
BK059151.1	TPA asm Inoviridae sp.	<i>Mysterivirus homoviscera</i>	
BK059140.1	TPA asm Inoviridae sp.		
KJ003982.1	Uncultured phage WWnAnB		
JN402401.1	Uncultured phage WWnAnB	<i>Mysterivirus diarrhoea</i>	
KJ003981.1	Uncultured phage WWnAnB		
MT135292.1	Inovirus sp.	<i>Mysterivirus</i>	<i>Mysterivirus</i>
MT135305.1	Inovirus sp.		
MT135296.1	Inovirus sp.	<i>Mysterivirus</i>	
MT135293.1	Inovirus sp.		
MT135313.1	Inovirus sp.	<i>Mysterivirus</i>	
MH616711.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Mysterivirus homostercus</i>	
MT135286.1	Inovirus sp.	<i>Mysterivirus</i>	
MT135300.1	Inovirus sp.	<i>Mysterivirus</i>	
MH616914.1	Inoviridae sp. isolate		
MT135308.1	Inovirus sp.		
MT135285.1	Inovirus sp.	<i>Mysteriviridae porcellus</i>	
MT135297.1	Inovirus sp.		
MT135314.1	Inovirus sp.		
MT135289.1	Inovirus sp.		

Final da tabela 1

MH617072.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Cholerae</i>		
MH617306.1	Inoviridae sp. isolate			
MH617090.1	Inoviridae sp. isolate			
MH593836.1	Inoviridae sp. isolate	<i>Cholerae</i>		
MH617172.1	Inoviridae sp. isolate			
MN200777.1	Vibrio phage VA2			
MN200778.1	Vibrio phage VA1	<i>Cholerae</i>		
KY474410.1	Vibrio cholerae strain			
KY454839.1	Vibrio cholerae strain			
KY474414.1	Vibrio cholerae strain			
KP972568.1	Vibrio phage preCTX			
KP972569.1	Vibrio phage preCTX			
KT728931.1	Vibrio phage preCTX			
KT728930.1	Vibrio phage preCTX			
KR063267.1	Vibrio phage preCTX			
KJ619459.1	Vibrio phage CTX			
MF155889.1	Vibrio virus CTXphi			
AF542089.2	Vibrio phage CTX			
AF414369.2	Vibrio phage CTX			
AF542088.2	Vibrio phage CTX			
GQ466610.1	Vibrio phage CTX			
GQ466608.1	Vibrio phage CTX			
GQ499847.1	Vibrio phage CTX			
KF664567.1	Vibrio phage CTX			
GQ485645.1	Vibrio phage CTX			
KF664572.1	Vibrio phage CTX			
GQ485644.1	Vibrio phage CTX			
GQ466609.1	Vibrio phage CTX	<i>Cholerae</i>		<i>Inoviridae</i>
GQ466612.1	Vibrio phage CTX			
GQ485646.1	Vibrio phage CTX			
GQ485649.1	Vibrio phage CTX			
KY474416.1	Vibrio cholerae strain			
KY474413.1	Vibrio cholerae strain			
GQ466611.1	Vibrio phage CTX	<i>Cholerae</i>		
GU942563.1	Vibrio phage CTX			
KR063268.1	Vibrio phage preCTX			
KY474417.1	Vibrio cholerae strain			
KY474411.1	Vibrio cholerae strain			
KF664568.1	Vibrio phage CTX			
KJ540267.1	Vibrio cholerae strain			
KJ540268.1	Vibrio cholerae strain			
KJ540266.1	Vibrio cholerae strain			
KF664566.1	Vibrio phage CTX			
KY474419.1	Vibrio cholerae strain			
KJ540258.1	Vibrio cholerae strain			
KJ540259.1	Vibrio cholerae strain			
GQ485652.1	Vibrio phage CTX			
GQ485650.1	Vibrio phage CTX			
GQ485651.1	Vibrio phage CTX			
HQ224500.1	Vibrio phage CTXphi			
KJ540260.1	Vibrio cholerae strain			
KJ540262.1	Vibrio cholerae strain			
KJ540261.1	Vibrio cholerae strain			
KJ540263.1	Vibrio cholerae strain			
KJ540264.1	Vibrio cholerae strain			

Tabela 2. Valores de *cutt off* para determinar espécie em cada gênero.

Gêneros	Cutt off (%)
<i>Filamentovirus</i>	>= 95
<i>Chordavirus</i>	>= 95
<i>Fibravirus</i>	>= 80
<i>Yamadavirus</i>	>= 86
<i>Infulavirus</i>	>= 86
<i>Lineavirus</i>	>= 70
<i>Griphuvirus</i>	>=70
<i>Plectovirus</i>	>= 68
<i>Tertilicivirus</i>	>= 75
<i>Secretuvirus</i>	>= 95
<i>Inovirus</i>	>= 89
<i>Paulinovirus</i>	>= 61
<i>Ignotusvirus</i>	>= 76
<i>Mysterivirus</i>	>= 74
<i>Choleravirus</i>	>= 67

CONCLUSÕES GERAIS

- *In vitro*, observamos que a *R. pseudosolanacearum* infectada com o tubulavírus RSIBR1 apresenta um aumento da produção do biofilme;
- Observamos que a *R. pseudosolanacearum* infectada com o tubulavírus RSIBR1 apresenta alteração na produção do biofilme em condições como a disponibilidade ou ausência de carboidratos (glicose) e nutrientes gerando respostas diferentes da bactéria não infectada;
- A *R. pseudosolanacearum* infectada com o tubulavírus RSIBR1 mostrou alterações do fenótipo de motilidade do tipo *swimming* e redução da motilidade do tipo *twitching*, o que sinaliza de tendência de crescimento séssil;
- Análise por microscopia confocal revelou que a *R. pseudosolanacearum* infectada com o tubulavírus RSIBR1 formar um biofilme com uma estrutura distinta do biofilme de *R. pseudosolanacearum* não infectada, a qual hipotetizamos promover uma matriz que permite a passagem de líquido, o que poderia explicar a ausência do bloqueio do xilema, conseqüentemente ausência também da morte da planta;
- *R. pseudosolanacearum* infectada pelo tubulavírus RSIBR1 apresenta redução a produção de EVs, bem como alterações na quantidade de DNA e proteínas que elas carregam. Essas alterações podem estar diretamente ligadas com a capacidade do RSIBR1 de converter bactérias fitopatogênicas *Ralstonia* spp. em bactérias endofíticas;
- O tubulavírus RSIBR1 produz dois pequenos RNAs, os quais podem estar envolvidos com a capacidade deste vírus de converter bactérias fitopatogênicas *Ralstonia* spp. em bactérias endofíticas;
- A evolução dos tubulavírus é impulsionada principalmente pelos hospedeiros;
- A Reconstrução filogenética a partir de genomas completos de tubulavírus pode ser uma ferramenta apropriada para a classificação de tubulavírus, pois permite associar a história evolutiva com as características biológicas desses vírus.