

# RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,  
o texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir  
de 29/11/2026.

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
( BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA )

---

***Xanthomonas citri* subsp. *citri*: population genomic structure in the state of São Paulo and citrus canker biocontrol potential of novel bacteriophages**

**CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNÉR**

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

---

***Xanthomonas citri* subsp. *citri*: population genomic structure in the state of São Paulo and citrus canker biocontrol potential of novel bacteriophages**

**CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNÉR**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia)

Orientador: Dr. Henrique Ferreira

Z26x Zamunér, Caio Felipe Cavicchia  
Xanthomonas citri subsp. citri: : population genomic structure in the state of São Paulo and citrus canker biocontrol potential of novel bacteriophages / Caio Felipe Cavicchia Zamunér. -- Rio Claro, 2024  
55 f. : il., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Henrique Ferreira

1. epidemiologia. 2. bacteriófagos. 3. citricultura. 4. genômica. 5. biocontrole. I. Título.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: population genomic structure in the state of São Paulo and citrus canker biocontrol potential of novel bacteriophages

**AUTOR: CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNÉR**

**ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro



Documento assinado digitalmente  
**HENRIQUE FERREIRA**  
Data: 29/11/2024 13:30:37-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ROBSON FRANCISCO DE SOUZA (Participação Virtual)  
Departamento de Microbiologia / Universidade de São Paulo



Documento assinado digitalmente  
**ROBSON FRANCISCO DE SOUZA**  
Data: 29/11/2024 14:13:14-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ALESSANDRO DE MELLO VARANI (Participação Virtual)  
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jabot



Documento assinado digitalmente  
**ALESSANDRO DE MELLO VARANI**  
Data: 29/11/2024 14:45:51-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. ALESSANDRA ALVES DE SOUZA (Participação Virtual)  
Centro de Citricultura Sylvio Moreira / Instituto Agronômico de Campinas



Documento assinado digitalmente  
**ALESSANDRA ALVES DE SOUZA DELLA COLETTI**  
Data: 29/11/2024 21:13:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rio Claro, 29 de novembro de 2024

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família por todo apoio durante todo o meu processo de formação e especialmente durante o período de desenvolvimento deste trabalho. Aos meus pais Fausto e Nicéia e minha irmã Mariana, por todo carinho, sabedoria, entendimento, educação e ensinamentos passados a mim.

A minha sempre companheira Carolina por seu suporte imprescindível e indescritível em palavras. Por sua paciência e afeto, em todos esses anos juntos e ainda muitos outros que virão.

A todos meus amigos pelo suporte intelectual e psicológico, Reto, Ina, Fer, Porteira, Karina, Cobra, Branca, Ju, Bigo e especialmente ao meu grande amigo Vítor por seu companheirismo, partilha de valores e momentos juntos.

Agradeço a todos os membros do laboratório pelo auxílio e amizade em especial ao Mario, Natalia, Igor e Giovane.

Agradeço sempre ao apoio, confiança, ética e humanidade de meu orientador Prof. Henrique. Por todo conhecimento passado, paciência e seus valores profissionais e de vida que nos inspiram.

Também gostaria de agradecer aos membros discentes, corpo técnico e profissionais do instituto e departamento. Os agrônomos e profissionais da Fundecitrus por todo o apoio técnico, em especial ao Dr. Franklin Behlau.

I would also like to thank Professor Mark Enright, for his partnership, support and knowledge. Also, a special thanks to Roobini and James in the making of this work.

Ao Professor Setúbal, por sua imprescindível colaboração, especialmente ao técnico Carlos e seus alunos Dennis e Carmen.

Ao Dr. Mateus Terceti por todo o auxílio proporcionado nos estágios iniciais deste trabalho.

Ao Professor German por seu apoio nas microscopias realizadas.

E a todos aqueles que não foram aqui nominalmente citados, mas que foram essenciais direta ou indiretamente em todo o processo.

Agradeço ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) .

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

“Muad’Dib learned rapidly because his first training was in how to learn. And the first lesson of all was the basic trust that he could learn. It’s shocking to find how many people do not believe they can learn, and how many more believe learning to be difficult. Muad’Dib knew that every experience carries its lesson.”

- Frank Herbert, Dune

## RESUMO

A citricultura é uma das atividades econômicas de maior importância no Brasil, especialmente no estado de São Paulo, responsável pelo posto da maior região exportadora de suco concentrado e maior produtor de laranja-doce no mundo. Dentre numerosas ameaças à produção agrícola, o cancro cítrico ainda possui a relevância de uma doença de grande importância que afeta a produção citrícola. A agente causal é a bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) que provoca lesões necróticas nos tecidos vegetais jovens e acaba por trazer grandes perdas em qualidade e produtividade. Desde a introdução do cancro cítrico no Brasil em 1957, inúmeras medidas de manejo foram implementadas ao longo dos anos na tentativa de suplantando o espalhamento da doença, notadamente o uso de bactericidas a base de cobre. Passados dez anos da implementação da atual legislação para manejo do cancro, a presença de árvores sintomáticas nos pomares passou a ser permitida pela primeira vez. Nesse contexto, muito pouco se sabe sobre a diversidade genética e estrutura da população de *X. citri* no campo, conhecimento que pode ser útil para um melhor entendimento epidemiológico da doença e direcionar medidas para seu controle. Ainda, com o crescente interesse no uso de métodos mais sustentáveis para o manejo de doenças agrícolas e com a emergência de linhagens bacterianas resistentes, alternativas ao uso do cobre devem ser buscadas. Com isso, o presente trabalho objetivou construir uma ampla biblioteca de novos isolados bacterianos, provenientes de pomares no estado de São Paulo, bem como isolar novos bacteriófagos líticos capazes de infectar *X. citri*, para melhor entender a estrutura populacional presente no campo, a diversidade de bactérias/bacteriófagos e avaliar o potencial de aplicação destes vírus como biocontrole. Desse modo, a primeira seção deste documento traz uma breve revisão da literatura acerca da importância do cancro cítrico, as bases da infecção e manejo, assim como sobre o uso de bacteriófagos no contexto da agricultura. Na segunda seção do documento é apresentada a construção de um banco de dados público (pubMLST) baseado nos sequenciamentos genômicos de isolados históricos de *X. citri*. O uso das ferramentas disponíveis a partir do banco construído pode servir como uma rápida ferramenta para avaliar aspectos epidemiológicos da doença. Na terceira seção, a diversidade genômica e estrutura populacional foi mais profundamente explorada a partir de análises com novos isolados bacterianos obtidos em São Paulo durante o período de 2018 a 2021. Finalmente, a quarta seção deste documento a diversidade de novos bacteriófagos isolados nos pomares de São Paulo foi avaliada. Além disso, os fagos foram caracterizados quanto a sua gama de hospedeiros, sobrevivência em diferentes condições e potencial uso como biocontrole do cancro cítrico em estudos de casa de vegetação

**Palavras-chave:** epidemiologia; bacteriófagos, citricultura, cancro, genômica, biocontrole.

## ABSTRACT

Citriculture is one of the most important economic activities in Brazil, especially in the state of São Paulo, the major juice exporter and producer of sweet orange worldwide. Among several threats that hinder agriculture production, citrus canker still poses as a disease of top importance for citriculture. The causal agent is *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), a Gram-negative bacterium which causes lesions on newly growing plant tissues provoking quality and productive losses. Since the introduction of citrus canker in Brazil in 1957, in order to decrease the impacts caused by the infection a number of management measures were implemented over the years to control its spread, notably the use of bactericides based on copper-spray. With the implementation of the most recent legislation for canker control, nearly 10 years ago, the presence of diseased trees in the field was permitted. In this context, little is known about the genetic diversity and population structure of *X. citri* in the field, which can be a useful tool to better understand its spread and direct its control. Furthermore, with growing interests in the use of more sustainable methods to manage crop diseases and the emergence of bacterial resistance, alternatives to copper must be sought. With all that, this work aimed to sample different bacterial isolates from orchards in Sao Paulo, as well as to isolate new *X. citri* infecting lytic phage to study their genetic diversity and biocontrol potential. The first section of this document will bring a brief literature revision, highlighting the importance of citrus canker, the basis of the infection and management as well as the use of bacteriophages in an agricultural context. In the second part of this work is presented a published paper on the build of a public available tool (pubMLST), build upon the sequenced core-genomes of historical *X. citri* isolates, that can serve a rapid and useful way to assess the genetic differences among strains. For the third section, the genomic diversity and population structure was further explored from novel *X. citri* isolates sampled in São Paulo during 2018 to 2021. Finally, in the fourth section of this work the diversity of novel bacteriophages isolated from orchards in São Paulo was evaluated and phages were characterized for their host range, virion survivability at different stress conditions and citrus canker control in greenhouse studies.

**Keywords:** epidemiology, bacteriophages, citriculture, canker, genomics, biocontrol

## TABLE OF CONTENTS

<b>1. LITERATURE REVIEW</b> .....	9
1.1. Citrus canker and its economic importance .....	9
1.2. Mechanism of infection: overcoming host defenses.....	9
1.3. Citrus canker in Brazil.....	10
1.3.1. First reports.....	10
1.3.2. Legislation and Management.....	10
1.4. Bacteriophages and their biocontrol potential in agriculture.....	13
1.4.1. Phage biology.....	13
1.4.2. Lytic cycle: we are at war.....	14
1.4.3. Bacteriophages in agriculture.....	14
1.5. References.....	16
<b>2. INTRODUCTION TO CHAPTERS</b> .....	18
<b>3. CHAPTER I: Core-genome multilocus sequence typing for epidemiological and evolutionary analyses of phytopathogenic <i>Xanthomonas citri</i></b> .....	19
<b>4. CHAPTER II: Evolution and spread of <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> in the São Paulo, Brazil citrus belt inferred from 758 novel genomes</b> .....	21
<b>5. CHAPTER III: <i>Xanthomonas citri</i> novel bacteriophages: phage biology and alternative control for citrus canker</b> .....	23
<b>6. FINAL CONSIDERATIONS</b> .....	44
<b>7. APENDICES</b> .....	45

## 1.5 REFERENCES

- Balogh, B.*et al.* "Control of Citrus Canker and Citrus Bacterial Spot with Bacteriophages." **Plant Disease** v. 92, n. 7, p. 1048-1052, 2008.
- Behlau, F. "An overview of citrus canker in Brazil." **Tropical Plant Pathology** v. 46, n., p. 1-12, 2021.
- Behlau, F. and J. Belasque. **Cancro cítrico: a doença e seu controle**. Fundecitrus, 2014. *E-book*. 82 p. DOI 10.13140/RG.2.1.1207.0485. Disponível em: [https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual\\_detalhes/cancro-citrico-a-doenca-e-seu-controle/49](https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual_detalhes/cancro-citrico-a-doenca-e-seu-controle/49). Acesso em: 12 set. 2014.
- Behlau, F.*et al.* "A comprehensive analysis of the Asiatic citrus canker eradication programme in São Paulo state, Brazil, from 1999 to 2009." **Plant Pathology** v. 65, n. 8, p. 1390-1399, 2016.
- Belasque Jr., J.*et al.* "The Success of eradication campaign os Citrus Canker in São Paulo States, Brazil." **Summa Phytopathol** v. 35, n. 2, p. 91-92, 2009.
- Belasque Junior, J.*et al.* "Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo." **Tropical Plant Pathology** v. 35, n. 5, p. 314-317, 2010.
- Bitancourt, A. A. "O cancro cítrico." **Biologico** v. 23, n., p. 101-111, 1957.
- Brasil (2016). Instrução Normativa No. 37. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária – Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial da União. No. 172: 1.
- Brasil (2018). Instrução Normativa No. 21. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária – Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial da União. No. 90: 9–12.
- Canteros, B. I.*et al.* "Management of Citrus Canker in Argentina, a Success Story." **Plant Pathol J** v. 33, n. 5, p. 441-449, 2017.
- Cernadas, R. A.*et al.* "Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. citri and *Xanthomonas axonopodis* pv. aurantifolii." **Mol Plant Pathol** v. 9, n. 5, p. 609-631, 2008.
- Chagas, M. C. M.*et al.* "Phyllocnistis citrella Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv citri in Brazil." **Neotrop. Entomol.** v. 30, n. 1, p. 55-59, 2001.
- Clokic, M. R.*et al.* "Phages in nature." **Bacteriophage** v. 1, n. 1, p. 31-45, 2011.
- Domingues, M. N.*et al.* "The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair." **Mol Plant Pathol** v. 11, n. 5, p. 663-675, 2010.
- Favaro, M. A.*et al.* "Surface barriers of mandarin 'okitsu' leaves make a major contribution to canker disease resistance." **Phytopathology** v. 104, n. 9, p. 970-976, 2014.
- Favaro, M. A.*et al.* "Relationships between copper content in orange leaves, bacterial biofilm formation and citrus canker disease control after different copper treatments." **Crop Protection** v. 92, n., p. 182-189, 2017.
- Ference, C. M.*et al.* "Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. citri pathogenesis and citrus canker disease management." **Mol Plant Pathol** v. 19, n. 6, p. 1302-1318, 2018.
- Fortier, L. C. and O. Sekulovic. "Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens." **Virulence** v. 4, n. 5, p. 354-365, 2013.
- Gottwald, T. and J. Graham (1992). A Device for Precise and Nondisruptive Stomatal Inoculation of Leaf Tissue with Bacterial Pathogens. *Phytopathology*. 82: 930-935.

- Gottwald, T. R.*et al.* "Citrus Canker : The Pathogen and Its Impact Plant Health Progress Plant Health Progress." **Plant Management Network**. v. 1993, n., p. 48824, 2002.
- Graham, J. H.*et al.* "Xanthomonas axonopodis pv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker." **Mol Plant Pathol** v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.
- Hampton, H. G.*et al.* "The arms race between bacteria and their phage foes." **Nature** v. 577, n. 7790, p. 327-336, 2020.
- Hobbs, Z. and S. T. Abedon. "Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic'." **FEMS Microbiol Lett** v. 363, n. 7, p., 2016.
- Ibrahim, Y. E.*et al.* "Management of Asiatic Citrus Canker Under Field Conditions in Saudi Arabia Using Bacteriophages and Acibenzolar-S-Methyl." **Plant Dis** v. 101, n. 5, p. 761-765, 2017.
- Leite, R. P. and S. K. Mohan. "Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by Xanthomonas campestris pv. citri in the State of Paraná, Brazil." **Crop Protection** v. 9, n. 1, p. 3-7, 1990.
- Mallmann, W. L. and C. Hemstreet. "Isolation of an inhibitory substance from plants." **Agric. Res** v. 28, n., p. 599-602, 1924.
- Moreira, L. M.*et al.* "Proteomics-based identification of differentially abundant proteins reveals adaptation mechanisms of Xanthomonas citri subsp. citri during Citrus sinensis infection." **BMC Microbiol** v. 17, n. 1, p. 155, 2017.
- Nakayinga, R.*et al.* "Xanthomonas bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture." **BMC Microbiol** v. 21, n. 1, p. 291, 2021.
- Patane, J. S. L.*et al.* "Origin and diversification of Xanthomonas citri subsp. citri pathotypes revealed by inclusive phylogenomic, dating, and biogeographic analyses." **BMC Genomics** v. 20, n. 1, p. 700, 2019.
- Rigano, L. A.*et al.* "Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in Xanthomonas axonopodis pv. citri." **Mol Plant Microbe Interact** v. 20, n. 10, p. 1222-1230, 2007.
- Schaad, N. W.*et al.* "Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus." **Syst Appl Microbiol** v. 29, n. 8, p. 690-695, 2006.
- Shahbaz, E.*et al.* "Citrus Canker Pathogen, Its Mechanism of Infection, Eradication, and Impacts." **Plants (Basel)** v. 12, n. 1, p., 2022.
- Silva, I. C.*et al.* "Antibacterial activity of alkyl gallates against Xanthomonas citri subsp. citri." **J Bacteriol** v. 195, n. 1, p. 85-94, 2013.
- Singh, B. K.*et al.* "Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward." **Nat Rev Microbiol** v. 21, n. 10, p. 640-656, 2023.
- Strathdee, S. A.*et al.* "Phage therapy: From biological mechanisms to future directions." **Cell** v. 186, n. 1, p. 17-31, 2023.
- Svircev, A.*et al.* "Framing the Future with Bacteriophages in Agriculture." **Viruses** v. 10, n. 5, p., 2018.

## 2. INTRODUCTION TO CHAPTERS

The results obtained during this work led to the assembly of three scientific papers that will be presented in three chapters in this document.

In the first chapter of this work, the first published paper is presented, describing the construction of a pubMLST database of sequenced genomes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) isolates. The public database was built based on the whole genome of 100 *X. citri* isolates sequenced in this study, comprising the core -genome analysis of a total of 250 genomes in a cgMLST scheme. This scheme poses as a useful epidemiological monitoring and evolutionary tool, to quickly differentiate between clades of *Xanthomonas isolates*. To date, this database (available at: <https://pubmlst.org/organisms/xanthomonas-citri>) was updated to comprise a total of 1025 genomes with the addition of 758 novel isolates sampled by our group in the state of Sao Paulo.

In the second chapter, the genomic structure of the population of *X. citri* isolates sampled throughout the state of Sao Paulo will be presented. During the years of 2018 and 2021, 758 new *X. citri* isolates were sampled from 13 different orchards and had its whole genome sequence. Adding up to the 100 historical genomes that were a base for the construction of our cgMLST scheme (Chapter 1) for a total of 858 genomes sequenced during our study.

Finally in the third chapter the genomic and phylogenetic analysis of the bacteriophages that were sampled in orchards during the period of 2018 and 2021, as well as the characterization of the host range of all phages, stability assays for phylogenetic representative phage and plant protection assays will be presented.

## 6 FINAL CONSIDERATIONS

In order to answer the questions raised during the development of this work we were able to produce a robust, publicly available database for rapid epidemiological monitoring of *Xanthomonas citri*, requiring minimal computational demand, as seen in Chapter I.

Furthermore, we identified the predominance of two lineages of *X. citri* in São Paulo state, the most important citrus producing region in the world. Still, a relatively low diversity of the bacteria suggests that it has a clonal expansion, but sufficient differences are found making it possible to pinpoint specific municipalities from where a certain isolate has originated. In relation to copper monitoring, we still have not found copper resistance isolates, but we identified metal detoxification genes under positive selection – as demonstrated in Chapter II. In addition, we see a direct relation with the expansion of the citrus industry and the different strategies adopted during the years to manage the disease associated with the diversification and population size of *X. citri*. We expect that these findings will aid future decision making in citrus canker management and monitoring.

Finally, we found that *X. citri* lytic bacteriophages have a low diversity, which is probably related to the similarly low diverse bacterial population present in the field but still showing a high specificity as for their host range. Nevertheless, the potential of bacteriophages as an alternative to *X. citri* management has been demonstrated in greenhouse assays, where a significant reduction in citrus canker symptoms was achieved – as related in Chapter III.