UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

AMANDA GOMES GUIMARÃES

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FAGOS BACTERIOLÍTICOS CONTRA *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas perforans* CAUSADORES DA MURCHA E MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIROS

Belo Horizonte
2023

AMANDA GOMES GUIMARÃES

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FAGOS BACTERIOLÍTICOS CONTRA *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas perforans* CAUSADORES DA MURCHA E MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIROS

VERSÃO FINAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.
Orientadora: Profª. Dra. Vera Lúcia dos Santos

Belo Horizonte
2023

043 Guimarães, Amanda Gomes.
Isolamento e caracterização de fagos bacteriolíticos contra Ralstonia solanacearum e Xanthomonas perforans causadores da murcha e mancha bacteriana em tomateiros [manuscrito] / Amanda Gomes Guimarães. – 2023.
121 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profª. Dra. Vera Lúcia dos Santos.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Ralstonia solanacearum. 3. Xanthomonas. 4. Lycopersicon esculentum. 5. Terapia por Fagos. I. Santos, Vera Lúcia dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis - CRB 6 2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **AMANDA GOMES GUIMARÃES**

Nº REGISTRO: **2021661711**

Às 14:00 horas do dia **19 de abril de 2023**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Paula Luize Camargos Fonseca (Residente Pós Doutoral em Genética - Departamento de Genética - UFMG) e a Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos (Orientadora), para julgar o trabalho final **"ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FAGOS BACTERIOLÍTICOS CONTRA *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas perforans* CAUSADORES DA MURCHA E MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIROS.",** da aluna **Amanda Gomes Guimarães**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos - orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 19 de abril de 2023

Membros da banca:

Prof. Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues

Dra. Paula Luize Camargos Fonseca

De acordo:

Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos

(Orientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Coordenadora do Programa de Pós-graduação

em Microbiologia)

Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Araújo Lima Rodrigues**, **Professor do Magistério Superior**, em 24/04/2023, às 09:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Vera Lucia dos Santos**, **Servidor(a)**, em 24/04/2023, às 20:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Paula Luize Camargos Fonseca**, **Usuária Externa**, em 25/04/2023, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza**, **Professora do Magistério Superior**, em 25/04/2023, às 14:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2151554** e o código CRC **1B1CAFFF**.

Referência: Processo nº 23072.230924/2021-23 SEI nº 2151554

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Léia e Reinaldo que sempre estiveram ao meu lado nos momentos de incertezas e me incentivando em meus objetivos. Obrigada pelo amor incondicional, pelos valores passados e por serem exímios exemplos de respeito, paciência e honestidade.

Aos meus amigos que mesmo distantes fisicamente compartilharam das dores e alegrias ao descobrir uma vida nova longe de casa, mas que me cobriram de carinho e me aconselharam nas adversidades, saibam que vocês foram fundamentais nessa conquista.

Às pessoas maravilhosas que conheci no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) e se tornaram muito mais do que colegas de trabalho, verdadeiros amigos. Agradeço em especial, à minha orientadora, Vera, por toda paciência, pelo imenso aprendizado técnico-científico, mas também por agregar tanto em meu crescimento pessoal.

Por fim, agradeço a todos docentes, pós-graduandos e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) que de alguma forma contribuíram no meu caminho até aqui.

À CAPES, à UFMG e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia por financiarem e possibilitarem a realização desta pesquisa.

COLABORAÇÃO

Profª. Dra. Vera Lúcia dos Santos, PhD.

LMA, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

CM, Centro de Microscopia da UFMG.

Departamento de Ciências da Vida - Contrastação Negativa, UFMG

Profª. Dra. Alice Maria Quezado Duval, PhD.

Prof. Dr. Carlos Alberto Lopes, PhD.

Laboratório de Fitopatologia da Embrapa (Brasília, Distrito Federal)

APOIO FINANCEIRO

RESUMO

Os tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.) e seus frutos são uma das culturas que mais sofrem com ataques de pragas e patógenos nas safras brasileiras. Fatores climáticos como altas temperaturas e umidade elevada propiciam o estabelecimento de doenças, sendo que o uso de defensivos agrícolas no combate a fitopatógenos está se tornando limitado devido à resistência que esses microrganismos vêm apresentando perante a esses produtos. Nesse sentido, o uso da fagoterapia, tecnologia que utiliza formulações de fagos líticos que são vírus que infectam e matam bactérias, é considerada hoje uma alternativa promissora para o controle de patógenos bacterianos. Logo, no presente trabalho foram isolados fagos provenientes de amostras de solo e de folhas de tomateiros com sintomas de murcha e mancha bacteriana visando aplicações para o biocontrole dos fitopatógenos causadores das doenças em questão. Para o isolamento, foram utilizadas as linhagens hospedeiras *Ralstonia solanacearum* RS705 e *Xanthomonas perforans* IS3FMA sendo isolados o fago B3 (RS705) e os fagos X1, X2, X3 e X4 (IS3FMA) respectivamente. Posteriormente, os 5 fagos obtidos foram caracterizados a nível morfológico por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os 4 fagos de *X. perforans* apresentaram mesma morfologia e tamanho sendo que as demais caracterizações seguiram para o fago X1. Esse juntamente ao fago B3 de *R. solanacearum* foi classificado como pertencente à classe *Caudoviricetes* sendo que a análise genômica para melhor definição das atuais famílias encontra-se em andamento. Além disso, os fagos foram avaliados quanto a multiplicidade de infecção (MOI). O fago B3 apresentou maior efetividade contra RS705 na menor MOI testada (0,01), enquanto X1 foi mais eficiente na inibição do crescimento de IS3FMA na MOI 10. Em escalas maiores, a atividade bacteriolítica dos fagos também foi testada em meio líquido utilizando as melhores MOI's obtidas havendo uma diminuição de 49,23% na D.O 600 nm de RS705 e de 76,2% na D.O 600 nm de IS3FMA quando ambas culturas foram crescidas junto a seus respectivos fagos. Ademais, avaliou-se a estabilidade dos fagos frente a variações de pH, temperatura, luz UV e tempo de estocagem. Ambos os fagos apresentaram boa estabilidade entre os pH's 3,0 e 8,0 (B3) e entre pH's 3,0 e 9,0 (X1) por um período de 24 horas. Essa mesma estabilidade foi mantida entre as temperaturas de 20 e 40°C por 72 horas para ambos os fagos, assim como não houve variações significativas em seus títulos quando expostos à luz UV-A por 2 (B3) e 1 hora (X1). Além disso, o fago B3 mostrou ótima estabilidade não apresentando nenhum efeito negativo e significativo sobre o título até o 4° mês de estocagem quando mantido em tampão SM a 4°C. O último parâmetro avaliado *in vitro* foi a especificidade dos fagos através do espectro de hospedeiros. O fago B3 apresentou atividade lítica apenas contra espécies de *Ralstonia sp.*, enquanto X1 não mostrou atividade contra nenhuma das espécies testadas, até o momento sendo específico a sua linhagem hospedeira (IS3FMA). Ao final, foi conduzida uma avaliação do potencial bacteriolítico do fago B3 *in vivo* utilizando grupos de plantas infectadas com RS705 ao longo de 14 dias. Foi observado que B3 inibiu os sintomas da doença em 100% nos tratamentos em que o fago foi inoculado por 2 e 3 vezes após a infecção com o patógeno, além de serem encontradas menores densidades bacterianas (UFC/mL) no solo e caule de todos os grupos tratados com o fago ao menos uma vez quando comparados ao grupo controle que recebeu apenas o patógeno. Ademais, foram encontrados os maiores títulos (UFP/mL) de B3 no solo nos grupos que apresentaram as menores taxas de progressão da doença ao final do experimento. Em suma, os fagos B3 e X1 mostraram um grande potencial para o biocontrole de fitopatógenos

causadores da murcha e mancha bacteriana em tomateiros sendo os próximos passos a testagem do fago X1 *in vivo* e a expansão de testes com o fago B3 no campo.

Palavras-chave: fagoterapia, *Ralstonia solanacearum, Xanthomonas perforans Solanum lycopersicum* L., murcha bacteriana, mancha bacteriana.

ABSTRACT

Tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) and their fruits are one of the crops that most suffer from attacks by pests and pathogens in Brazilian crops. Climatic factors such as high temperatures and high humidity favor the establishment of diseases, and the use of pesticides that do not combat phytopathogens is becoming limited due to the resistance that these microorganisms have been showing to these products. In this sense, the use of phagotherapy, a technology that uses formulations of lytic phages that are viruses that infect and kill bacteria, is now considered a promising alternative for the control of bacterial pathogens. Therefore, in the present work, phages from samples of soil and leaves of tomato plants with symptoms of wilting and bacterial spot were isolated, aiming at applications for the biocontrol of phytopathogens that cause the diseases in question. For isolation, *Ralstonia solanacearum* RS705 and *Xanthomonas perforans* IS3FMA strains were used as host lines, and phage B3 (RS705) and phage X1, X2, X3 and X4 (IS3FMA) were isolated respectively. Subsequently, the 5 phages obtained were characterized at the morphological level by transmission electron microscopy (TEM). The 4 *X. perforans* phages showed the same morphology and size and the other characterizations followed for phage X1. This together with the B3 phage of R. solanacearum was classified as belonging to the class *Caudoviricetes* and a genomic analysis for better definition of the current families is in progress. In addition, phages were evaluated for multiplicity of infection (MOI). Phage B3 showed greater evolution against RS705 at the lowest MOI demonstrated (0.01), while X1 was more efficient in the evolution of IS3FMA at MOI 10. At larger scales, the bacteriolytic activity of phages was also transmitted in liquid medium using the best MOI's occurring with a decrease of 49.23% in the OD 600 nm of RS705 and of 76.2% in the OD 600 nm of IS3FMA when both cultures were grown with their respective phages. In addition, evaluate the stability of the phages against variations in pH, temperature, UV light and storage time. Both phages demonstrated good stability between pH's 3.0 and 8.0 (B3) and between pH's 3.0 and 9.0 (X1) for a period of 24 hours. This same stability was maintained between temperatures of 20 and 40°C for 72 hours for both phages, as well as there were no experimental variations in their titles when exposed to UV-A light for 2 (B3) and 1 hour (X1). In addition, phage B3 showed excellent stability, not showing any negative and significant effect on the titer until the 4th month of storage when kept in SM at 4°C. The last parameter evaluated in vitro was the phage specificity across the host spectrum. Phage B3 showed lytic activity only against species of Ralstonia sp., while X1 did not show activity against any of the species, so far being specific to its host lineage (IS3FMA). At the end, an evaluation of the bacteriolytic potential of the B3 phage in vivo was conducted using groups of plants infected with RS705 over 14 days. It was observed that B3 inhibited disease symptoms by 100% in treatments in which the phage was inoculated 2 and 3 times after infection with the pathogen, in addition to lower bacterial densities (CFU/mL) in the soil and stem of all the groups treated with the phage at least once when compared to the control group that received only the pathogen. In addition, the highest titers (PFU/mL) of B3 in the soil were found in groups that presented lower rates of disease progression at the end of the experiment. In short, the B3 and X1 phages enjoyed a great potential for the biocontrol of phytopathogens that cause bacterial wilt and spot in tomato plants.

Keywords: phagotherapy *Ralstonia solanacearum, Xanthomonas perforans, Solanum lycopersicum* L.*,* bacterial wilt, bacterial stain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do bacteriófago T7 responsável por infectar a maioria das linhagens de *Escherichia coli.* 28

Figura 2 - Os principais ciclos de multiplicação dos bacteriófagos.....36

Figura 3 - Folhas apresentando lesões necróticas de coloração pardo escura, sintomas clássicos da mancha bacteriana 49

Figura 4 - Planta apresentando aspecto de murcha de cima para baixo, o que caracteriza sintomas da murcha bacteriana. 49

Figura 5 - Placa de Petri com o cultivo bacteriano de RS705 juntamente com seu fago hospedeiro “B3” 67

Figura 6 - Morfologia das diferentes placas de lise dos fagos hospedeiros de IS3FMA. 68

Figura 7 - a) Macromorfologia da placa de lise do fago B3 sendo caracterizadas como grandes, regulares e com um halo opaco circundando seu interior translúcido. b) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do fago B3. Observe as três partículas virais caudas curtas. c) Macromorfologia da placa de lise do fago X1 sendo caracterizada como grande, com bordas levemente irregulares e translúcida. d) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do fago X1. Observe as duas partículas virais no centro da imagem caracterizadas por um capsídeo icosaédrico e caudas curtas. 69

Figura 8 - Gráfico apresentando as curvas de crescimento (D.O 600 nm) da bactéria hospedeira RS705 associada a diferentes concentrações dos fagos resultando em diferentes multiplicidades de infecção (MOI’s). 70

Figura 9 - Gráfico apresentando as curvas de crescimento (D.O 600 nm) da bactéria hospedeira IS3FMA associada a diferentes concentrações dos fagos resultando em diferentes multiplicidades de infecção (MOI’s). 71

Figura 10 - Gráfico da curva da atividade bacteriolítica do fago B3 em meio CPG líquido avaliada por meio de comparações entre as densidades ópticas (D.O 600 nm) do controle (apenas bactéria) e da bactéria junto ao fago em uma MOI final de 0,01. 72

Figura 11 - Gráfico da curva da atividade bacteriolítica do fago X1 em Caldo Nutriente (HiMedia, EUA) avaliada por meio de comparações entre as densidades ópticas (D.O 600 nm) do controle (apenas bactéria) e da bactéria junto ao fago X1 em uma MOI final de 10.....72

Figura 12 - Estabilidade do fago B3 frente a variações de pH entre 3,0 e 9,0 ao longo do tempo mantido a 4°C em tampão SM. Foi realizada a análise ANOVA Two-way por comparações múltiplas usando o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....74

Figura 13 - Estabilidade do fago X1 frente a variações de pH entre 3,0 e 9,0 ao longo do tempo mantido a 4°C em tampão SM. Foi realizada a análise ANOVA Two-way por comparações múltiplas usando o teste de Tukey. ($p \leq 0,05$).....75

Figura 14 - Estabilidade dos fagos B3 (a) e X1 (b) frente a variações de temperatura (20°C a 40°C) ao longo de 72 horas. Foi realizada a análise ANOVA Two-way por comparações múltiplas usando o teste de Tukey. ($p \leq 0,05$). O termo “ns” indica que não foi observado.....76

Figura 15 - Estabilidade dos fagos frente a exposição a luz UV-A. 77

Figura 16 - a) Estabilidade do fago B3 mantido a 4°C em tampão SM ao longo de 6 meses. Os resultados relacionam o log10 UFP/mL com o tempo e o controle representa o título inicial dos fagos antes do período de estocagem. b) Estabilidade do fago B3 mantido a 4°C em meio mineral BHB ao longo de 6 meses. Os resultados relacionam o $\log_{10}$ UFP/mL com o tempo e o controle representa o título inicial dos fagos antes do período de estocagem. Em ambos os gráficos foi utilizado o teste ANOVA One-way e o asterisco indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre cada tempo quando comparado ao controle. 78

Figura 17 - Teste de susceptibilidade das duas variedades de tomateiros ao patógeno RS705. 79

Figura 18 - Controles e tratamentos após 14 dias de experimento. 80

Figura 19 - Gráfico da porcentagem de folhas murchas de cada tratamento ao longo de 14 dias de experimento. 81

Figura 20 - a) Contagem (log_{10} UFP/mL) do patógeno RS705 no solo das plantas dos controles e de cada tratamento. b) Contagem (log_{10} UFP/mL) do patógeno RS705 no caule das plantas dos controles e também de cada tratamento. Em ambos foi utilizado o teste ANOVA One-way e o asterisco indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle CB. 82

Figura 21 -Avaliação da persistência do fago B3 no solo dos tratamentos após 14 dias. Foi utilizado o teste ANOVA One-way. O asterisco indica se houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) dos tratamentos em relação ao controle CF 83

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Fluxograma - Materiais e métodos.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - As famílias dos bacteriófagos e suas particularidades segundo ICTV, 2022. 31
Tabela 2 - Linhagens bacterianas fornecidas pela EMBRAPA HORTALIÇAS 50
Tabela 3 - Espectro de hospedeiros dos fagos B3 e X1 expresso pela formação ou não de placas de lise sobre camada uniforme das espécies bacterianas fornecidas pela EMBRAPA. Os hospedeiros foram sensíveis (+) ou insensíveis (-) aos fagos. 115
Tabela 4 -Espectro de hospedeiros dos fagos B3 e X1 expresso pela formação ou não de placas de lise sobre camada uniforme das espécies bacterianas isoladas das coletas. Os hospedeiros foram sensíveis (+) ou insensíveis (-) aos fagos.....115
Tabela 5 - Espectro de hospedeiros dos fagos B3 e X1 expresso pela formação ou não de placas de lise sobre camada uniforme das espécies bacterianas isoladas das coletas. Os hospedeiros foram sensíveis (+) ou insensíveis (-) aos fagos.....116
Tabela 6 - Espectro de hospedeiros dos fagos B3 e X1 expresso pela formação ou não de placas de lise sobre camada uniforme das espécies bacterianas pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA - UFMG). Os hospedeiros foram sensíveis (+) ou insensíveis (-) aos fagos. 116
Tabela 7 – Tabela das análises estatísticas (ANOVA Two-way) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para os dados de pH do fago B3. 117
Tabela 8 – Tabela das análises estatísticas (ANOVA Two-way) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para os dados de pH do fago X1. 117
Tabela 9 – Tabela das análises estatísticas (ANOVA Two-way) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para os dados de temperatura do fago B3. 117
Tabela 10 – Tabela das análises estatísticas (ANOVA Two-way) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para os dados de temperatura do fago X1. 117

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 REVISÃO DE LITERATURA 18

2.1 A origem do tomate e sua produção no Brasil 18

2.2 A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* 20

2.3 A mancha bacteriana causada por *Xanthomonas perforans* 21

2.4 A descoberta de entidades biológicas que infectam bactérias e o desenvolvimento da fagoterapia 24

2.5 Bacteriófagos: características gerais e morfologia 26

2.6 Bacteriófagos: genética e taxonomia 28

2.7 Bacteriófagos: a infecção de células hospedeiras e os ciclos de multiplicação 32

2.8 O uso da fagoterapia na agricultura e sua regulamentação 36

2.9 A fagoterapia no controle da murcha e mancha bacteriana em tomateiros 40

2.10 Fatores e limitações no uso de fagos na agricultura 41

3 JUSTIFICATIVA 45

4 OBJETIVOS 47

4.1 Objetivo geral 47

4.2 Objetivos Específicos 47

5 MATERIAL E MÉTODOS 48

5.1 Fluxograma 48

5.2 Coleta de amostras 49

5.3 Bactérias usadas no estudo 50

5.3.1 Isolamento de bactérias do solo rizosférico de plantas com sintomas da doença murcha bacteriana 50

5.3.2 Isolamento de bactérias com características macromorfológicas de *Ralstonia sp.* de plantas com sintomas da murcha bacteriana 51

5.3.3 Isolamento de bactérias com características macromorfológicas do gênero *Xanthomonas sp*. das folhas de plantas com sintomas de mancha bacteriana..51
5.4 Condições de cultivo, preservação e estocagem 52
5.5 Identificação dos isolados bacterianos.....52
5.5.1 Identificação pela técnica de MALDI-TOF 52
5.5.2 Identificação por sequenciamento do gene ribossomal 16S.....53
5.6 Isolamento de bacteriófagos 55
5.6.1 Purificação das partículas virais 56
5.6.2 Multiplicação dos fagos 57
5.6.3 Titulação dos fagos.....57
5.6.4 Propagação dos fagos.....58
5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....58
5.8 Caracterização Molecular.....58
5.9 Avaliação da atividade bacteriolítica em diferentes multiplicidades de infecção (MOI'S) 59
5.10 Avaliação da atividade bacteriolítica contra células planctônicas 60
5.11 Espectro de hospedeiros.....60
5.12 Testes de estabilidade 61
5.12.1 Estabilidade dos fagos em diferentes valores de pH.....61
5.12.2 Estabilidade dos fagos sob diferentes temperaturas 61
5.12.3 Estabilidade dos fagos frente a exposição à luz UV-A 61
5.12.4 Estabilidade do fago B3 ao longo do tempo de estocagem.....62
5.13 Avaliação da atividade bacteriolítica *in vivo* 62
5.13.1 Teste de desenvolvimento da doença *in vivo* associada ao patógeno RS705 62
5.13.2 Avaliação do fago B3 contra *Ralstonia solanacearum* (RS705) 63
5.13.3 Avaliação da progressão da doença.....63
5.13.4 Análise quantitativa da persistência do fago B3 após os tratamentos 64

6. Análises estatísticas 65
7 RESULTADOS 66
7.1 Obtenção e identificação das bactérias isoladas da folha, caule e solo rizosférico 66
7.2 Isolamento de bacteriófagos 66
7.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 68
7.4 Caracterização molecular 69
7.5 Avaliação da atividade bacteriolítica por diferentes multiplicidades de infecção (MOI'S) 70
7.6 Avaliação da atividade bacteriolítica contra células planctônicas 71
7.7 Espectro de hospedeiros 72
7.8 Testes de estabilidade 73
7.8.1 Estabilidade dos fagos em diferentes valores de pH 73
7.8.2 Estabilidade dos fagos sob diferentes temperaturas 75
7.8.3 Estabilidade dos fagos frente a exposição à luz UV-A 76
7.8.4 Estabilidade do fago B3 ao longo do tempo de estocagem 77
7.9 Avaliação da atividade bacteriolítica *in vivo* 78
7.9.1 Teste de desenvolvimento da doença *in vivo* associada ao patógeno RS705 78
7.9.2 Avaliação da progressão da doença 79
7.9.3 Análise quantitativa da persistência do fago B3 após os tratamentos 82
8 DISCUSSÃO 83
9 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 94
10 REFERÊNCIAS 95
ANEXOS 114
ANEXO A 114
ANEXO B 115
ANEXO C 117

1 INTRODUÇÃO

A agricultura sustentável é embasada na implementação de práticas que garantam o fornecimento de alimentos seguros para uma crescente população sem causar impactos negativos ao meio ambiente. Estima-se que em 2050, a população mundial atingirá cerca de 9 bilhões de habitantes fazendo com que haja, desde já, um impacto direto na urgência do setor agroindustrial em desenvolver novas alternativas que propiciem uma maior produção de alimentos (ODEGARD *et al*., 2014). Fato é que, atualmente, cerca de 10% da produção global alimentícia é perdida por ano devido às doenças bacterianas recorrentes em plantas, o que além de causar perdas econômicas, gera um desperdício de recursos naturais (FAO, 2021). Nesse sentido, a prevenção ou o tratamento dessas doenças poderia ser a chave para atender parcialmente às crescentes demandas por alimentos no futuro.

Após a Segunda Guerra Mundial, o uso de antibióticos foi incorporado à criação de animais e ao controle de patógenos em vegetais visando mitigar as perdas associadas às doenças. Contudo, ao longo do tempo, o uso excessivo e indiscriminado dessas substâncias tem gerado uma eficácia reduzida devido ao surgimento de patógenos resistentes (SUNDIN *et al.,* 2016). Além disso, outro fato bastante preocupante é a possibilidade de um acúmulo desses antibióticos em ambientes aquáticos, nos solos ou mesmo em produtos agropecuários, uma vez que o contato direto dessas substâncias com microrganismos não alvos já é associado a seleção de células resistentes em patógenos de importância clínica (SUNDIN *et al.,* 2016). Dessa forma, o Brasil, sendo um dos maiores produtores agrícolas mundiais, necessita veementemente de métodos alternativos para o controle de fitopatógenos.

Uma das culturas de grande relevância na agricultura brasileira é a do fruto de *Solanum lycopersicum* L. ou simplesmente, tomate. O Brasil ocupa a 11ª posição no ranking dentre os maiores produtores mundiais com safras chegando a produzir 3,9 milhões de toneladas e produtividade média de 71,8 toneladas por hectare (FAOSTAT, 2021). Todavia, a ocorrência de pragas reduz a produtividade desse insumo alimentar e dentre as doenças que mais acometem a cultura, destacam-se a murcha bacteriana causada pelo complexo de espécies de *Ralstonia solanacearum* e a mancha bacteriana causada por espécies de *Xanthomonas sp.* (LOPES *et al.,* 2005). Em geral, existe uma grande dificuldade no controle após o estabelecimento de tais

doenças. No caso da murcha bacteriana, ao infectar a planta, a bactéria se aloja nos vasos condutores de água, principalmente no xilema e sob condições favoráveis à doença como em ambiente quente e úmido, a bactéria se multiplica impedindo que a água absorvida pelas raízes consiga chegar até a parte aérea da planta causando o aspecto de murcha das folhas (QUEZADO-DUVAL, 2009). Já na ocorrência da mancha bacteriana, os sintomas se manifestam em toda parte aérea da planta, além de ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura. Além disso, as lesões podem começar pequenas e evoluírem de tamanho nas folhas, fazendo com que o tecido lesionado se torne necrosado e com o passar do tempo também alcance os frutos (QUEZADO-DUVAL e LOPES, 2010).

Atualmente, o combate a fitopatógenos bacterianos em tomateiros incluem aplicações de defensivos químicos e antibióticos. Contudo, esses produtos nem sempre apresentam a eficiência desejada devido, principalmente, à presença de estirpes resistentes (BUTTIMER *et al.,* 2017). Além disso, há uma preocupação crescente no uso de produtos que podem ser agressivos e ambientalmente hostis (BUTTIMER *et al.,* 2017). Logo, o investimento em pesquisas que recorram ao controle biológico desses fitopatógenos por outros microrganismos, ou mesmo pelo uso de biomoléculas, se torna imprescindível quando se trata da maximização da produtividade em larga escala (BUTTIMER *et al.,* 2017). Nesse contexto, o uso da fagoterapia que utiliza formulações de vírus que infectam e matam bactérias é considerada uma alternativa promissora para o controle dessas doenças. Isso se deve a vantagens como o fato do bacteriófago se multiplicar no local exato da infecção, do mesmo não persistir no ambiente na ausência do hospedeiro e, sobretudo, por sua alta especificidade em nível de gênero, espécie e até mesmo estirpe, fazendo com que a comunidade microbiana local que eventualmente seja benéfica a planta não seja afetada (LOC-CARRILLO *et al.,* 2011). Todavia, o sucesso na seleção de fagos líticos que sejam eficazes no controle desses patógenos requer uma série de avaliações que incluem elucidar fatores que possam impactar na estabilidade e persistência do fago no ambiente, assim como na sua interação com o hospedeiro (IRIARTE *et al.,* 2007). Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar fagos com potencial bacteriolítico para o biocontrole de espécies de *Ralstonia solanacearum* e da espécie *Xanthomonas perforans,* causadores da murcha e da mancha bacteriana em tomateiros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A origem do tomate e sua produção no Brasil

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é um fruto pertencente à família *Solanaceae,* mas é classificado como uma hortaliça em estudos de safras e cálculos das produções agronômicas anuais (MEDEIROS *et al.,* 2011). Ele é consumido em todo mundo, sendo uma importante fonte nutricional rica em vitaminas A e C e licopeno antioxidante (RAMKISSOON *et al.,* 2016).

O centro primário de origem deste fruto ocorreu na região norte do Chile se estendendo até o sul da Colômbia e a costa do Pacífico incluindo as Ilhas Galápagos, até às encostas orientais da Cordilheira dos Andes (RICK, 1982). A data exata de sua domesticação é desconhecida, mas a hipótese mais aceita é a de que ele foi levado e cultivado da região Andina para o Sul do México alcançando um estágio muito avançado de domesticação antes mesmo de ser introduzido na Europa, no século XVI (COX, 2000). Já no continente europeu, o processo de domesticação teve continuidade de maneira mais intensa entre os séculos XVII e XIX, havendo evidências de que os italianos foram os primeiros europeus a cultivar o fruto, por volta de 1550 (SIMS, 1980). Desde meados do século XX, o tomateiro se converteu em uma das espécies oleráceas mais cultivadas em todo o mundo. Ao longo dos anos, os melhoristas obtiveram inúmeras cultivares morfologicamente diferentes quanto às suas características hortícolas e qualitativas (COX, 2000).

No Brasil, país que figura como o 11º maior produtor de tomate do mundo (FAOSTAT, 2021), o fruto é cultivado em todas as regiões, com destaque para os estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Paraná, os quais normalmente concentram mais da metade da área de produção nacional e onde se encontram as principais indústrias processadoras do fruto (IBGE/LSPA Julho/2021). Os estados de São Paulo e Goiás foram responsáveis por 27,2% e 25,9%, respectivamente, da produção nacional de tomate no ano de 2021 (IBGE/LSPA Julho/2021). No caso de São Paulo, o estado possui a maior parte da produção voltada ao tomate estaqueado que tem como principal destino o consumo *in natura.* Já o estado de Goiás, retém a maior parte da produção de tomate rasteiro, o qual é cultivado sob irrigação e destinado às indústrias de polpa (IBGE, 2021).

Nesse sentido, a tomaticultura brasileira possui grande relevância, não só econômica, mas também social chegando a gerar cerca de 610 mil empregos no setor

de produção (IBGE 2018), além de ser muito presente na agricultura familiar (ARÊDES *et al.,* 2014). As cultivares de tomate destinadas ao consumo *in natura* possuem características específicas de qualidade voltada ao mercado de interesse, dentre as principais, a acidez, viscosidade, firmeza, coloração e tamanho do fruto (EMBRAPA, 2018). O ciclo cultural do tomate varia de 4 a 7 meses da semeadura até a produção de novas sementes, incluindo o período de colheita que pode variar de 1 a 3 meses (HORTIFRUTI BRASIL, 2018). A maior parte da produção de tomate é proveniente do cultivo em campo ao ar livre, mas o cultivo em ambiente protegido tem aumentado por garantir a produção em locais e épocas adversas ao ápice da safra, que normalmente ocorre nos meses de janeiro e fevereiro, o que possibilita a oferta do fruto durante todos os meses do ano (HORTIFRUTI BRASIL, 2018). Contudo, para assegurar que a cadeia produtiva mantenha um fluxo estável e com alta produtividade, é necessário o uso de estratégias eficazes de Manejo Integrado de Pragas (MIP) a fim de evitar a perda de produção associada ao ataque de pragas e estabelecimento de doenças nas plantações (MOURA, 2014).

O MIP emprega métodos de controle baseado em informações obtidas do próprio agroecossistema. Basicamente é realizado um levantamento das possíveis populações de pragas, o estádio fenológico da cultura e fatores como o clima e práticas culturais que influenciam na ocorrência do aparecimento de inimigos naturais dessas pragas, bem como a suscetibilidade das plantas às infestações (MOURA, 2014). Posteriormente são elencadas as técnicas de manejo mais adequadas visando identificar a época de maior ocorrência de determinadas pragas e os picos populacionais, orientando a tomada de decisão sobre o momento ideal de aplicação (MOURA *et al.,* 2014; SANTOS, 2016). Dentre as técnicas de controle utilizadas em culturas de tomate estão a rotação de culturas, o uso de plantas enxerto e híbridas já resistentes à determinadas doenças, a realização de drenagens do terreno evitando o acúmulo de água, e sobretudo, a utilização de produtos químicos como fungicidas cúpricos e antibióticos (MOURA, 2014). Apesar do emprego de tais técnicas, há nos últimos anos um aumento crescente na resistência de fitopatógenos a muitos defensivos agrícolas, tornando o uso do controle biológico por microrganismos que atacam pragas e não causam danos ambientais, uma ferramenta promissora no combate ao estabelecimento de doenças em tomateiros (MOURA, 2014).

2.2 A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*

A murcha bacteriana é uma doença que causa grandes perdas para os produtores de tomate e de outras solanáceas em regiões tropicais do mundo (GROVER *et al.,* 2006). O agente causador faz parte do Complexo de Espécies de *Ralstonia solanacearum* (RSSC), o qual agrupa bactérias de quatro subdivisões principais, nomeadas de filotipos (PAN *et al.,* 2013). Cada filotipo é subdividido em sequevares e cepas individuais que são intimamente relacionadas e, geralmente, só são diferenciadas por análises de similaridade genética. Esses filotipos correspondem à origem geográfica das cepas sendo o filótipo II originado nas Américas (REGO *et al.,* 2019). Atualmente, o Complexo de Espécies de *Ralstonia solanacearum* é composto pelas seguintes espécies: *R. solanacearum* (filótipo II); *R. pseudosolanacearum* (filotipos I e III); e três subespécies de *R. syzygii* (filótipo IV).

No Brasil, a doença em *S. lycopersicum* L é comumente associada às espécies *Ralstonia solanacearum* e *Ralstonia pseudosolanacearum* e possui maior ocorrência, entre os meses de dezembro a fevereiro (LOPES e ROSSATO, 2018). Tais espécies são classificadas como gram-negativas, aeróbias, móveis e contêm um flagelo polar sendo comumente encontradas nos solos onde podem sobreviver por mais de dez anos (MOURA e OLIVEIRA, 1994). O fitopatógeno normalmente obtém acesso à planta por seus sistemas radiculares que podem apresentar feridas naturais geradas durante a formação de raízes laterais ou por meio de feridas adquiridas conforme as raízes crescem no solo (CALDWELL *et al.,* 2017). Uma vez na raiz, o patógeno se desloca para o xilema colonizando-o e, posteriormente, subindo pelo caule até seu estabelecimento (DIGONNET *et al.,* 2012; TURNER *et al.,* 2009; VASSE *et al.,*1995).

As medidas de controle da murcha bacteriana causada por *Ralstonia sp.* são complexas, sobretudo pela já conhecida variabilidade genética da bactéria e da sua capacidade de sobrevivência no solo em associação com outras bactérias, ficando totalmente estabelecida no ambiente, mesmo em condições de repouso (NGUYEN e RANAMUKHAARACHCHI 2010; CHAUDHR e RASHID 2011). Nesse sentido, é muito difícil estabelecer metodologias de controle adequadas que funcionem de forma universal. Assim, as medidas gerais que auxiliam na redução da incidência da doença são práticas comuns que também são usadas como medidas profiláticas para outras doenças, como a rotação de cultura, plantio em áreas novas e distantes dos locais de cultivos anteriores, cuidados com a origem da água de irrigação e de seu manejo, o

bom estado das mudas e plantas, dentre outros (LOPES e SANTOS, 1994; LOPES e QUEZADO-SOARES, 1997).

Nos últimos anos, formas alternativas de controle biológico têm ganhado destaque. Um exemplo é o uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e que também são capazes de utilizar uma ampla gama de mecanismos envolvidos na supressão de fitopatógenos (AYOMIDE *et al.,* 2020). Assim, o controle da doença pela colonização das raízes das plantas por essas rizobactérias pode ocorrer diretamente por meio de competição por espaço, nutrientes e nicho ecológico, pela produção de substâncias antimicrobianas ou ainda indiretamente, por meio da indução de resistência sistêmica (ISR) (HAAS e DÉFAGO, 2005).

Além disso, o estudo do uso de bacteriófagos como possíveis agentes no controle da murcha vem ganhando notoriedade, sendo caracterizados vários fagos que infectam cepas de *Ralstonia sp.* e que obtiveram bons resultados no controle na aplicação em campo (HOLTAPPELS *et al.,* 2021).

2.3 A mancha bacteriana causada por *Xanthomonas perforans*

A mancha bacteriana é listada como uma das doenças mais destrutivas em várias culturas, sobretudo em cultivares de pimenta, berinjela, pimentão e tomate, sendo responsável por grandes perdas na produção global desses alimentos (FAO, 2021).

A doença foi relatada pela primeira vez por Doidge em 1920, na África do Sul, mas com o nome de cancro do tomate, sendo o agente causador então denominado como *Bacterium vesicatorium* (Doidge) (JONES *et al.,* 1997). Ao longo dos anos, devido ao emprego de novas técnicas laboratoriais de identificação de microrganismos, a taxonomia do agente causador da doença passou por diversas modificações. A primeira se deu em 1925, quando recebeu a denominação de *Pseudomonas vesicatoria*, a qual foi alterada para *Phytomonas vesicatoria*, em 1930; para *Xanthomonas vesicatoria,* em 1939 (BRADBURY, 1986; JONES *et al.,* 1997); e para um patovar de *X. campestris* com a denominação *de Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*, em 1978 (SAHIN, 1997). Contudo, em virtude da grande variabilidade genética detectada em *X. campestris* pv. vesicatoria, em 2004, Jones e colaboradores propuseram a reclassificação das bactérias causadoras da mancha bacteriana em quatro espécies baseando-se em testes com 13 fontes de carbono e hibridização do

DNA (JONES *et al.,* 2004). Essa reclassificação foi mantida após Potnis e colaboradores (2011) compararem o genoma completo das espécies e consolidar a divisão pelo Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (BULL *et al*., 2010). Dessa forma, as quatro espécies são conhecidas atualmente como *X. euvesicatoria, X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*. No Brasil há relatos da ocorrência de todas as espécies atacando o tomateiro, sendo as bactérias desse complexo descritas como baciliformes (0,7-1,0 x 2,0-2,4 µm), gram-negativas, aeróbias e móveis através de um flagelo polar (POTNIS *et al.,* 2015). Elas possuem ainda a característica marcante de formar colônias amarelas em meio ágar nutriente e de produzir o pigmento xantomonadina constituindo o complexo causador da mancha bacteriana em tomateiros (POTNIS *et al.,* 2015).

No caso da espécie *Xanthomonas perforans,* sua forma de ataque e colonização da planta já é bem descrita na literatura. De forma geral, o patógeno se estabelece na planta em diferentes estágios do desenvolvimento, seja em cultivos de estufa ou em campo. Normalmente, o cultivo do tomate é feito usando altas densidades, ou seja, alto número de mudas por unidade de área, criando um ambiente favorável para a multiplicação de *X. perforans* e ocorrência da doença que é de alta umidade relativa e temperaturas variando entre 25 e 28°C (ABRAHAMIAN *et al.,* 2021). Além disso, *X. perforans* possui a característica de colonizar a superfície da parte aérea das mudas do tomateiro, como epífita e, posteriormente, permanecer de forma latente e assintomática por um período, antes de causar os sintomas da doença. Dentro de instalações de produção de mudas, essas infecções latentes podem resultar em episódios de transmissão do patógeno para plantas vizinhas em um curto período, devido a práticas de irrigação por aspersão (ABRAHAMIAN *et al.,* 2021).

Assim, após o estabelecimento da doença, é possível observar que a mancha bacteriana é caracterizada pela presença de lesões necróticas nas folhas, caules e frutos. A doença ocorre, principalmente, em épocas chuvosas, sendo comum em sistemas de produção de mudas em telados com sistemas de micro aspersão, condições muito utilizadas em escala industrial (QUEZADO-DUVAL e LOPES, 2010). A entrada da bactéria no tecido da planta hospedeira ocorre por aberturas naturais como os estômatos, mas também por pequenas lesões causadas pelo vento, chuvas ou insetos (KIMURA, 1984). Uma vez estabelecida, a disseminação do patógeno se dá de planta para planta através da água das chuvas ou de irrigação associadas a ventos fortes (CARMO *et al.,* 1996). Em suas folhas, os primeiros sintomas aparecem

como pequenas manchas de formato irregular, podendo apresentar halos cloróticos (amarelados), que em condições ambientais favoráveis à doença, coalescem e provocam a seca das folhas, fazendo com que elas adquiram um aspecto de queimado (POTNIS *et al.,* 2015).

Para o manejo da doença existem algumas recomendações, dentre elas o uso de sementes sadias, a rotação de culturas com outras espécies, a instalação da cultura apenas em locais não propensos a cerração ou orvalho, o plantio em ambiente protegido durante as épocas mais quentes e chuvosas do ano e o controle químico baseado na pulverização periódica com fungicidas a base de cobre (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Apesar do amplo uso, a eficiência no controle químico à base desses produtos é bastante variável, mostrando-se até ineficiente em certas condições. Estudos na literatura discutem sobre a baixa eficiência de estreptomicina e cúpricos para o controle da mancha bacteriana e o aparecimento de indivíduos resistentes nas populações bacterianas a principal causa da ineficiência desses produtos no combate à doença (QUEZADO-DUVAL *et al.,* 2003; SILVA *et al.,* 2006; SAHIN *et al.,* 2007). Além disso, o uso excessivo desses produtos pode ser um problema no que diz respeito aos efeitos adversos no meio ambiente e à saúde humana (POTNIS *et al.,* 2015), sobretudo considerando o fato de que o tomate é uma das culturas com histórico de grande uso de pesticidas, principalmente nos países em desenvolvimento (JÚNIOR, 2019). Um exemplo é o trabalho de Garcia e colaboradores (2019), no qual os pesquisadores testaram diferentes combinações de acibenzolar-S-metil (ASM) e oxicloreto de cobre no controle da mancha bacteriana no tomate de mesa. Eles observaram que a severidade da doença diminuiu à medida que se aumentou o número de aplicações da combinação, mas que houve uma importante queda na relação custo benefício da produção, uma vez que para o controle significativo da doença foram necessárias sete aplicações de ASM, seguida de aplicações do cobre até o final do ciclo, próximo a colheita.

Nesse sentido, o controle biológico tem sido uma alternativa bastante estudada e de forma geral caracteriza-se pelo controle de pragas agrícolas e o estabelecimento de doenças a partir do uso de seus inimigos naturais que inclui os microrganismos (MATES *et al.,* 2019). Dentre as formas de controle, o desenvolvimento de formulações a base de fagos ganhou destaque nos últimos anos, principalmente devido à resistência apresentada por diversos fitopatógenos às formas de controle

usuais. Nos Estados Unidos e em alguns países europeus já existem produtos disponíveis comercialmente e que estão registrados como biopesticidas (HOLTAPPELS *et al.,* 2021).

2.4 A descoberta de entidades biológicas que infectam bactérias e o desenvolvimento da fagoterapia

Os bacteriófagos são entidades biológicas semi autônomas que possuem a característica exclusiva de infectar células bacterianas (AJUEBOR *et al.,* 2016). Esses tipos de vírus possuem uma gigantesca abundância sendo encontrados tanto nos ecossistemas abióticos como em solos e água salgada quanto em representantes bióticos como plantas, animais e até mesmo nos próprios seres humanos (DION *et al*, 2020). No caso dos solos, que em comparação com os ambientes marinhos são intrinsecamente mais diversos em termos de composição, heterogeneidade espacial e propriedades físico-químicas, a abundância viral tem correlação direta com tais propriedades garantindo uma enorme riqueza de bacteriófagos (ADRIAENSSENS *et al*., 2017).

Os fagos foram descobertos independentemente por dois cientistas, Frederick Twort, um patologista britânico e Felix d'Herelle, um microbiologista canadense, em 1915 e 1917, respectivamente. De acordo com os registros mais difundidos, Twort trabalhava tentando cultivar o vírus vaccinia (VACV) em um meio artificial sem uma célula hospedeira quando notou uma contaminação microcócica nos tubos de crescimento (TWORT, 1915). Ele descreveu um efeito incomum sobre essas colônias, verificando que algumas delas não podiam ser sub cultivadas, mas se mantidas se tornavam vítreas e transparentes (BORDET e CIUCA, 1921). Apesar de tal descoberta, mesmo anos depois, não estava claro para Twort se a observação foi de uma infecção viral da cultura ou se era apenas uma enzima que causava a lise da bactéria (TAYLOR, 2014). No caso de D'Herelle, evidências indicam que o mesmo não estava familiarizado com o trabalho de Twort quando mais tarde publicou sua descoberta dos bacteriófagos em 1917. D'Herelle foi convidado para investigar um surto de disenteria grave que ocorreu entre um grupo de soldados em Paris durante a Primeira Guerra Mundial. Ele isolou e caracterizou uma cepa de bacilo da disenteria e, durante o cultivo, observou áreas claras nos tapetes de células bacterianas formadas na superfície de meio sólido (TAYLOR, 2014). D'Herelle então percebeu que

as áreas claras eram placas resultantes da lise celular e das quais ele obteve um filtrado nomeando-o de “solução de bacteriófagos” ou uma “entidade comedora de bactérias”. Ele também notou uma diminuição de turbidez em culturas de bactérias em meio líquido acrescido desse filtrado (TAYLOR, 2014). A partir de então, D'Herelle estudou a fundo os eventos de replicação e adaptação desses vírus, propondo o uso destes como uma forma de tratamento para infecções bacterianas. Ele introduziu uma nova terminologia chamada de “bacteriofagologia” para descrever os eventos que aconteciam após a infecção e detalhou protocolos de purificação e titulação de bacteriófagos (TAYLOR, 2014). O principal interesse de D'Herelle era a área clínica e as principais doenças estudadas pelo mesmo foram a disenteria e febre tifóide (TAYLOR, 2014).

Outro fato muito importante observado por D’Herelle foi que linhagens bacterianas, mesmo pertencentes ao mesmo gênero, estavam associadas a diferentes bacteriófagos, o que fez o cientista pressupor que esses fagos deveriam ser muito específicos ao seu hospedeiro. Tal área de pesquisa foi considerada por muitos como o início da biologia molecular (TAYLOR, 2014).

Apesar de muitas controvérsias no meio científico, a literatura traz a descoberta dos fagos datada do início do século XX com sua aplicação ligada sobretudo à prática clínica em estudos para tratar doenças como a cólera e a peste bubônica, as quais começaram a emergir na Europa durante aquele período (BUTTIMER *et al.,* 2017). Contudo, apesar das experiências com terapias fágicas serem muito bem documentadas nos países europeus, muito do que foi alcançado em outros países é pouco relatado (ALMEIDA *et al.,* 2020). Uma peça interessante que falta na história da fagoterapia está na América do Sul. Citado apenas três vezes na literatura científica publicada na década de 2000, o papel do Brasil no uso de fagos como tratamento ainda é envolto em mistério (ALMEIDA *et al.,* 2020). Um texto de 2004, redigido por Alain Dublanchet para o “The Epic of Phage Therapy” de Oxford menciona que, na década de 1920, bacteriologistas da Alemanha, Estados Unidos e Brasil tentaram reproduzir alguns dos resultados obtidos por Felix D'Herelle, mas não obtiveram sucesso (DUBLANCHET *et al.,* 2007). Ademais, um outro relatório publicado em português para a Academia de Ciências (Pará, Brasil) ressalta o importante trabalho de José da Costa Cruz, o qual reporta ter utilizado a terapia fágica para tratar diarreia em crianças, além de ter criado um produto baseado em fagos para uso clínico (ALMEIDA *et al.,* 2020). A terceira menção às experiências brasileiras com fagoterapia

aparece em um capítulo sobre a história da fagoterapia, escrito por Nina Chanishvili, do Instituto Eliava (Tbilisi, Geórgia) (CHANISHVILI, 2012). O capítulo afirma que o Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) começou a produzir bacteriófagos no combate à disenteria para serem usados na América Latina no ano de 1924 (CHANISHVILI, 2012). A partir dessas publicações, fica claro que os pesquisadores brasileiros estavam envolvidos com a fagoterapia na mesma época dos estudos de Felix D 'Herelle (CHANISHVILI, 2012). Informações adicionais podem ser obtidas no obituário de Cruz, publicado em 1941, o qual não só confirma o interesse de Cruz pela fagoterapia em estudos sobre diarréia infantil, mas relata a produção e o uso terapêutico de fagos em larga escala no Instituto Oswaldo Cruz para tratar várias doenças infecciosas da época (CHANISHVILI, 2012).

Mesmo com estudos promissores em todo o mundo, a ampliação das pesquisas para o uso da fagoterapia foi negligenciada nos anos que se seguiram em favor da descoberta e utilização dos antibióticos (DEBARBIEUX *et al.,* 2010). A partir da década de 1940, com o seu uso clínico definido, várias classes de antibióticos começaram a ser produzidas, com destaque para os β-lactâmicos, fazendo com que os estudos acerca da fagoterapia ficassem em segundo plano (DEBARBIEUX *et al.,* 2010) e apenas algumas nações do Leste Europeu, como Polônia, Geórgia e Rússia continuassem as pesquisas no campo da terapia fágica contra doenças bacterianas infecciosas (SULAKVELIDZE, 2001).

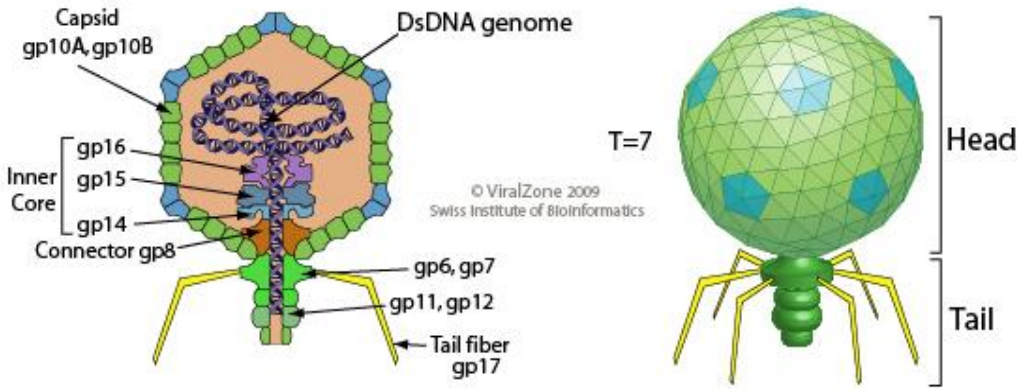
2.5 Bacteriófagos: características gerais e morfologia

Os bacteriófagos são as entidades biológicas mais diversas do planeta, atingindo a abundância total de 10^{31} partículas virais. Esses vírus são encontrados em todos os biomas terrestres, desde o trato gastrointestinal humano até as áreas mais profundas dos oceanos (DION *et al.,* 2020). Devido ao fato de, assim como os vírus de mamíferos, os fagos necessitarem da maquinaria de seu hospedeiro para produzir novos vírions, eles normalmente são encontrados em densidades muito maiores onde sua espécie bacteriana hospedeira está presente. Devido a essas constantes interações, os bacteriófagos e seus hospedeiros passam por ciclos de coevolução fazendo com que as espécies bacterianas consigam desenvolver mecanismos de resistência contra os fagos, e, em contrapartida, estes consigam desenvolver mecanismos para escapar da defesa bacteriana (LABRIE *et al*., 2010).

Os fagos podem apresentar diversos tamanhos, variando de 20 a 200 nm, embora alguns possam ultrapassar essa dimensão (GUTTMAN, *et al.,* 2004). Sua constituição inclui um material genético que pode ser tanto DNA quanto de RNA, sendo que este pode estar encapsulado num invólucro proteico ou lipoproteico denominado capsídeo. Esses capsídeos normalmente apresentam formas que podem ser poliédrica, filamentosa, pleomórfica ou caudada. Além de conferir proteção ao material genético, o capsídeo está envolvido na adsorção de epítopos específicos que ficam na superfície da célula hospedeira e que são de fundamental importância no processo de infecção do fago na célula bacteriana (ACKERMANN, 2012).

Entre os anos de 1959 e 2012 foram identificados morfologicamente cerca de 6.200 bacteriófagos sendo que desses, a imensa maioria (96,3%) foi descrita apresentando cauda e apenas 3,7% como sendo poliédricos, filamentosos ou pleomórficos (DION *et al,* 2020). No caso dos representantes de bacteriófagos caudados, uma grande variação no tamanho do capsídeo proteico pode ser observada entre seus membros. Os tamanhos observados variam de 45 a 185 nm e estão diretamente relacionados ao tamanho de seu genoma, geralmente de DNA fita dupla, contendo de 18 a 500 mil pares de bases (HUA *et al.,* 2017). Assim, estruturalmente, os fagos caudados pertencentes a classe *Caudoviricetes* consistem em uma cabeça proteica preenchida com DNA, caudas longas onde se encontra a bainha e uma placa basal que contêm as fibras da cauda onde também são encontradas as espículas (AIEWSAKUN E SIMMONDS, 2018). Além disso, vale ressaltar que a maioria dos fagos com cauda (cerca de 75%) têm estruturas do capsídeo em simetria icosaédrica, enquanto apenas cerca de 15% possuem um capsídeo alongado alinhado com o eixo da cauda (FIGURA 1).

Figura 1 - Ilustração do bacteriófago T7 responsável por infectar a maioria das linhagens de *Escherichia coli.*



Legenda: a) Esquema ilustrativo da estrutura subdividida em cabeça e cauda. O capsídeo é não envelopado, possui simetria icosaédrica com cerca de 60 nm de diâmetro e é composto por subunidades proteicas (gp). O material genético é composto de DNA linear dupla fita. Sua estrutura ainda apresenta uma cauda não contrátil com 6 fibras da cauda subterminais curtas.

FONTE: Disponível em < https://viralzone.expasy.org/ >. Acesso em 19 de fevereiro de 2023.

2.6 Bacteriófagos: genética e taxonomia

Os bacteriófagos frequentemente são caracterizados por uma grande diversidade genômica e relações evolutivas complexas. Toda essa diversidade pode ser entendida como um reflexo da matriz de hospedeiros bacterianos que estão disponíveis para os fagos e da alta taxa de evolução desses vírus quando enfrentam pressões seletivas criadas por barreiras anti fágicas expressas pelas bactérias (ACKERMANN, 2012). Nos fagos podem ser encontrados tanto DNA de fita dupla (dsDNA) que corresponde a grande maioria, quanto DNA de fita simples (ssDNA) ou mesmo RNA de fita simples (ssRNA) ou RNA de fita dupla (dsRNA), apesar dos dois últimos serem menos frequentes (DION *et al.,* 2020).

Nos últimos anos, os cientistas têm descoberto uma ampla variedade de tamanhos de genomas (DION *et al.,* 2020). O menor genoma de um bacteriófago relatado até então é o do fago Leuconostoc L5, com apenas 2.435 bp (DION *et al.,* 2020). Por outro lado, um número crescente de fagos denominados “jumbo” com tamanhos de genomas superiores a 200 kb também vêm sendo descobertos revelando características únicas (YUAN *et al.,* 2017). O grande tamanho do genoma

dos fagos jumbo permite que os mesmos carreguem genes envolvidos na replicação e no metabolismo de nucleotídeos que estão ausentes nos genomas de fagos menores. Em 2019, Devoto e colaboradores descobriram um novo grupo de fagos com os maiores genomas já registrados chamados de “megafagos”, ultrapassando a marca de 540 kb. A descoberta se deu a partir de estudos metagenômicos em intestino humano e de animais como babuínos e porcos (YUAN *et al.,* 2017).

Historicamente, os fagos começaram a ser classificados de acordo com sua morfologia, devido a inexistência de técnicas moleculares de fácil acesso, como as de PCR e sequenciamento de genomas, hoje, amplamente utilizadas (ACKERMANN *et al.,* 2006). Nessa abordagem, o sistema pioneiro de classificação de David Bradley (1967) agrupava os fagos caudados em três morfotipos, A (cauda contrátil), B (cauda longa não contrátil), C (cauda não contrátil curta) baseando-se em microscopias eletrônicas. Em 1971, esse sistema foi formalmente adotado pelo Comitê Internacional de Nomenclatura de Vírus (ICNV) da época. As famílias *Inoviridae, Microviridae, Tectiviridae, Corticoviridae, Plasmaviridae, Leviviridae* e *Cystoviridae* foram aceitas por votação em sessão plenária em 1978 e mais tarde em 1981 foram incluídas as famílias *Myoviridae, Podoviridae* e *Siphoviridae* (TONG *et al.,* 2020). Conforme a área genômica se desenvolvia no início dos anos 2000, o sequenciamento dos genomas dos fagos revelava uma gigantesca diversidade desses vírus, especialmente em bacteriófagos pertencentes à então ordem *Caudovirales,* levando à criação das primeiras subfamílias dentro das três famílias existentes (*Podoviridae, Myoviridae* e *Siphoviridae*). Com base nessa evidência, o Subcomitê de Vírus Bacterianos e Arqueados do ICTV começou a desemaranhar teia de grupos sobrepostos e complementares de fagos definindo então novas famílias baseadas no genoma. (TONG *et al.,* 2020).

O sistema de classificação atual dos bacteriófagos é baseado em dados genômicos e proteômicos juntamente às propriedades biológicas que incluem a morfologia viral, a organização do genoma (ssDNA, ssRNA, dsDNA ou dsRNA), a gama de hospedeiros, os mecanismos de empacotamento de DNA e a presença de genes DNA ou RNA polimerase no genoma (WALKER *et al.,* 2022).

Na última classificação do sistema taxonômico do ICTV (2022), a antiga ordem *Caudovirales* foi abolida, assim como as famílias polifiléticas (*Myoviridae, Podoviridae*

e Siphoviridae) sendo substituídas por novas famílias monofiléticas e permanecendo apenas informalmente como grupos não taxonômicos para classificação morfológica (morfotipos). Dessa forma, a maioria dos fagos pertencentes à antiga ordem *Caudovirales* foram distribuídos em uma nova ordem denominada *Crassvirales* (DION *et al.,* 2020; WALKER *et al.,* 2022; ICTV, 2022; ZERBINI *et al*., 2022). No presente trabalho, a classificação taxonômica foi delimitada aos níveis de classe e família. A classe *Caudoviricetes* (proposta 2021.015B e ratificada em março de 2022), atualmente é composta por 19 famílias de bacteriófagos. Já a classe *Faserviricetes* inclui 3 famílias, a classe *Tokiviricetes* 2 famílias e as classes *Malgrandaviricetes* e *Tectiliviricetes* compostas por 1 família cada. Os grupos *Leviviridae, Cystoviridae, Plasmaviridae, Fuselloviridae* e *Thaspiviridae* foram classificados até o momento apenas no nível de família (TABELA 1).

Com relação a nomenclatura, grande parte dos vírus são agrupados em ordens, cuja nomenclatura tem a terminação - virales, em classes, com terminação – viricetes, em famílias, com terminação -viridae, subfamílias, terminadas em -virinae e gênero, terminadas em -vírus. É importante destacar que houve uma importante mudança na nomenclatura (ratificada em 2021) que foi a adoção de um formato binomial uniforme para nomeação de espécies de vírus e que já foi publicado pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses). As novas regras do ICTV para classificação de vírus e nomenclatura de táxons estão estabelecidas no Código Internacional de Classificação e Nomenclatura de Vírus (ICVCN), o qual possui regras para nomear táxons garantindo a aplicação dos conceitos atuais. No entanto, ainda há uma falta na padronização das nomenclaturas podendo ser encontrados até mesmo nomes impronunciáveis, o que juntamente às constantes descobertas sobre novos vírus leva a geração de novas propostas para atualizações na classificação (WALKER *et al.,* 2022).

Tabela 1 - As famílias dos bacteriófagos e suas particularidades segundo ICTV, 2022.

Classe	Família	Estrutura	Material genético
Caudoviricetes	*Ackermannviridae*	Sem envelope, cauda longa contrátil Star-like, capsídeo icosaédrico.	dsDNA
Caudoviricetes	*Autographiviridae*	Sem envelope, capsídeo icosaédrico, cauda curta.	dsDNA
Caudoviricetes	*Chaseviridae*	Sem envelope, capsídeo icosaédrico cauda contrátil.	dsDNA
Caudoviricetes	*Demerecviridae*	Capsídeo icosaédrico, cauda flexível (representante colifago T5).	dsDNA
Caudoviricetes	*Drexlerviridae*	Sem envelope, capsídeo icosaédrico.	dsDNA
Caudoviricetes	*Casjensviridae*	Cauda longa e não contrátil.	dsDNA
Caudoviricetes	*Herelleviridae*	Sem envelope, cauda longa contrátil, capsídeo icosaédrico, DNA linear.	dsDNA
Caudoviricetes	*Straboviridae*	Sem envelope, cauda longa contrátil, capsídeo icosaédrico, DNA linear.	dsDNA
Caudoviricetes	*Guelinviridae*	Com caudas não contráteis e curtas.	dsDNA
Caudoviricetes	*Kyanoviridae*	Cabeça alongada com cauda contrátil que termina em uma placa de base com fibras de cauda longa e curta.	dsDNA
Caudoviricetes	*Mesyanzhinovviridae*	Cauda flexível e não contrátil e capsídeo alongado.	dsDNA
Caudoviricetes	*Orlajensenviridae*	Caudas não contráteis flexíveis; capsídeos isométricos.	dsDNA
Caudoviricetes	*Peduoviridae*	Caudas longas contráteis com capsídeos icosaédrico.	dsDNA
Caudoviricetes	*Vilmaviridae*	Caudas não contráteis flexíveis; capsídeos isométricos.	dsDNA
Caudoviricetes	*Zierdtviridae*	Caudas longas não contráteis com capsídeos isométricos.	dsDNA
Caudoviricetes	*Zobellviridae*	Capsídeo icosaédrico com cauda curta.	dsDNA
Caudoviricetes	*Schitoviridae*	Capsídeos icosaédricos e caudas curtas não contráteis.	dsDNA
Caudoviricetes	*Rountreeviridae*	Capsídeo isométrico, cauda dificilmente visualizada.	dsDNA
Caudoviricetes	*Salasmaviridae*	Caudas curtas e capsídeos pequenos e alongados.	dsDNA
Faserviricetes	*Inoviridae*	Com DNA circular: a- sem envelope, filamento longo b- sem envelope, filamento curto.	dsDNA
Faserviricetes	*Plectroviridae*	Simetria helicoidal.	dsDNA
Faserviricetes	*Paulinoviridae*	Filamentosos flexíveis não envelopados.	ssDNA
Malgrandaviricetes	*Microviridae*	Sem envelope, capsídeo icosaédrico.	ssDNA
Tectiliviricetes	*Tectiviridae*	Sem envelope, capsídeo icosaédrico, vesícula lipídica.	dsDNA
Sem classe definida	*Plasmaviridae*	Com envelope, lipídeos, pleomórfico, sem capsídeo.	dsDNA
Sem classe definida	*Fuselloviridae*	Com envelope, lipídeos, pleomórfico, sem capsídeo, forma de limão.	dsDNA
Sem classe definida	*Cystoviridae*	Com envelope, capsídeo esférico, RNA tri-segmentado, espiral	dsRNA
Sem classe definida	*Leviviridae*	Sem envelope, capsídeo icosaédrico e esférico.	ssRNA
Tokiviricetes	*Rudiviridae*	Sem envelope, simetria helicoidal como TMV.	dsDNA
Tokiviricetes	*Lipothrixviridae*	Com envelope e simetria helicoidal.	dsDNA
Sem classe definida	*Thaspiviridae*	Com envelope, cauda curta flexível em um pólo, capsídeo fusiforme.	dsDNA

Legenda: ssDNA: ácido desoxirribonucleico de cadeia simples / dsDNA: ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla / ssRNA: ácido ribonucleico de cadeia simples / dsRNA: ácido ribonucleico de cadeia dupla.

FONTE: Adaptado do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), 2022.

2.7 Bacteriófagos: a infecção de células hospedeiras e os ciclos de multiplicação

A multiplicação viral é a peça-chave para permanência e evolução dos bacteriófagos no ambiente. Esse processo, o qual envolve o vírus e seu hospedeiro bacteriano compreende cinco etapas, as quais são subdivididas em: adsorção (fixação e reconhecimento da partícula viral), desnudamento (separação do ácido nucleico do envoltório proteico), replicação (a expressão e replicação do ácido nucleico), maturação (formação de novas partículas fágicas) e liberação ou eluição de novos fagos. A primeira fase do processo de infecção é a adsorção do fago à superfície da membrana celular bacteriana. Nesta etapa, várias estruturas do hospedeiro são responsáveis pelo reconhecimento e fixação da partícula viral. Essas estruturas passam a desempenhar a função de receptores celulares e são identificados como moléculas de superfície que realizam funções normais da célula, como proteínas, oligossacarídeos, pili, peptideoglicanos, lipopolissacarídeos, dentre outros. Já as proteínas fágicas responsáveis pela ligação a esses receptores bacterianos ficam geralmente localizadas nas pontas das fibras da cauda (no caso dos fagos caudados) e em estruturas análogas em fagos não caudados. Assim, é importante ressaltar que apesar dos receptores desempenharem funções vitais para a célula bacteriana, os fagos desenvolveram a capacidade de utilizá-los em benefício próprio a fim de garantir o sucesso de sua infecção (MAKKY *et al.,* 2021).

Os fagos podem tanto se ligar aos receptores do hospedeiro de forma reversível, por meio de interações não covalentes e instáveis como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals (WEIMBAUER, 2004), quanto de forma irreversível fazendo com que a partir da ligação da proteína fágica com o receptor bacteriano haja uma contração da bainha do fago impulsionando o material genético para atravessar o envoltório bacteriano (MAYER *et al.,* 2021). Outros bacteriófagos possuem enzimas hidrolíticas com a capacidade de digerir vários componentes da parede celular bacteriana de forma a garantir a separação do ácido nucleico da proteína resultando na liberação do material genético do fago no interior da célula hospedeira (MAYER *et al.,* 2021). Concomitantemente a esse processo, ocorrem modificações na membrana celular bacteriana tornando a célula mais permissiva à entrada de material genético fágico pela introdução de novas proteínas na membrana celular que pode ocorrer por injeção do material genético ou também por endocitose, envolvendo o seu englobamento em vesículas formadas por porções

da membrana plasmática (WEIMBAUER, 2004). Normalmente, o único componente do fago que entra na célula bacteriana é o ácido nucléico, sendo que o restante do vírus permanece do lado externo. Esse mecanismo é diferente dos observados em vírus que infectam células animais, sendo que muitas vezes, as partículas virais penetram na célula. Essa diferença é provavelmente devido à inabilidade da bactéria de englobar partículas virais (MAYER *et al.,* 2021).

Uma vez que o material genético do fago é injetado no interior da célula hospedeira, o mesmo, a partir de então, segue uma das duas principais rotas de replicação: a lítica ou lisogênica. De forma simplificada, os ciclos de vida líticos são caracterizados pela adsorção bacteriana, replicação do genoma do fago, síntese de novas partículas virais e lise bacteriana, enquanto a lisogenia é caracterizada pela integração do vírus como profago no genoma bacteriano e a persistência indefinida da infecção (MAYER *et al.,* 2021). Todavia, é de suma importância ressaltar a existência de outros modos de multiplicação, destacando-se o ciclo crônico em fagos filamentosos (RAKONJAC *et al.,* 2017) e a pseudo-lisogenia (FILIPIAK *et al.,* 2020).

De modo geral, fagos virulentos entram no ciclo lítico, enquanto os fagos temperados são caracterizados pela atividade lisogênica. Os fagos líticos ou virulentos possuem uma fase chamada de eclipse na qual nenhuma partícula fágica infecciosa pode ser encontrada dentro ou fora da célula bacteriana. A partir da ativação de genes específicos, o ácido nucléico do fago se apossa da maquinaria biossintética do hospedeiro para sintetizar seu próprio material genético e proteínas essenciais. Ocorre então uma expressão ordenada para a síntese macromolecular orquestrada pelo fago, tal como se vê em infecções por vírus de animais (MAKKY *et al.,* 2021).

Os primeiros mRNA’s sintetizados codificam para as primeiras proteínas que são necessárias para a síntese do DNA do fago e para inativar a replicação do DNA, RNA e a biossíntese protéica do hospedeiro (MAKKY *et al.,* 2021). Contudo, em alguns casos, as primeiras proteínas na verdade degradam o cromossomo do hospedeiro. Depois que o DNA do fago é sintetizado, novas moléculas de ácidos nucleicos, proteínas estruturais do fago e as proteínas necessárias para a lise da célula bacteriana são produzidas. Após a síntese das moléculas essenciais ao fago, há um período de acúmulo intracelular, no qual o ácido nucléico e as proteínas

estruturais que foram sintetizados são montados formando novas partículas de fago infecciosas que se acumulam no interior da célula (MAYER *et al.,* 2021). Passado um certo tempo, o envoltório da bactéria começa a se romper devido ao acúmulo de enzimas líticas produzidas pelo bacteriófago e as partículas intracelulares são liberadas no meio extracelular (MAYER *et al.,* 2021).

Do ponto de vista fenotípico, a presença de fagos líticos é evidenciada pela observação de unidades formadoras de placas que são normalmente mais claras e resultam em concentrações relativamente altas na superfície do tapete de células bacterianas presentes em meio sólido. Além disso, pode ser observada uma diminuição de turbidez no caso das culturas líquidas (MAKKY *et al.,* 2021).

Já na via lisogênica, após a evasão dos mecanismos de resistência do hospedeiro, os fagos lisogênicos ou temperados integram seu material genético junto ao do hospedeiro (profago), e esse é transmitido verticalmente por meio de divisões celulares do hospedeiro às células filhas (DOLGIN, 2019). A “decisão” de entrar na lisogenia é impulsionada pela compatibilidade genética (por exemplo, sítios de integração attB do hospedeiro), estado fisiológico do hospedeiro (por exemplo, a depleção de nutrientes que aumenta a lisogenia) ou mesmo pela densidade do fago (CASJENS e HENDRIX, 2015). Já a integração do material genético é conduzida por meio de recombinases que agem nas sequências de local de fixação de fago (attP) e bacteriana (attB) que determinam a especificidade de ligação, mas que também pode acontecer aleatoriamente (profagos se integrarem como por exemplo, Mu) ou não se integrarem (por exemplo, P1) (FOGG *et al.,* 2014).

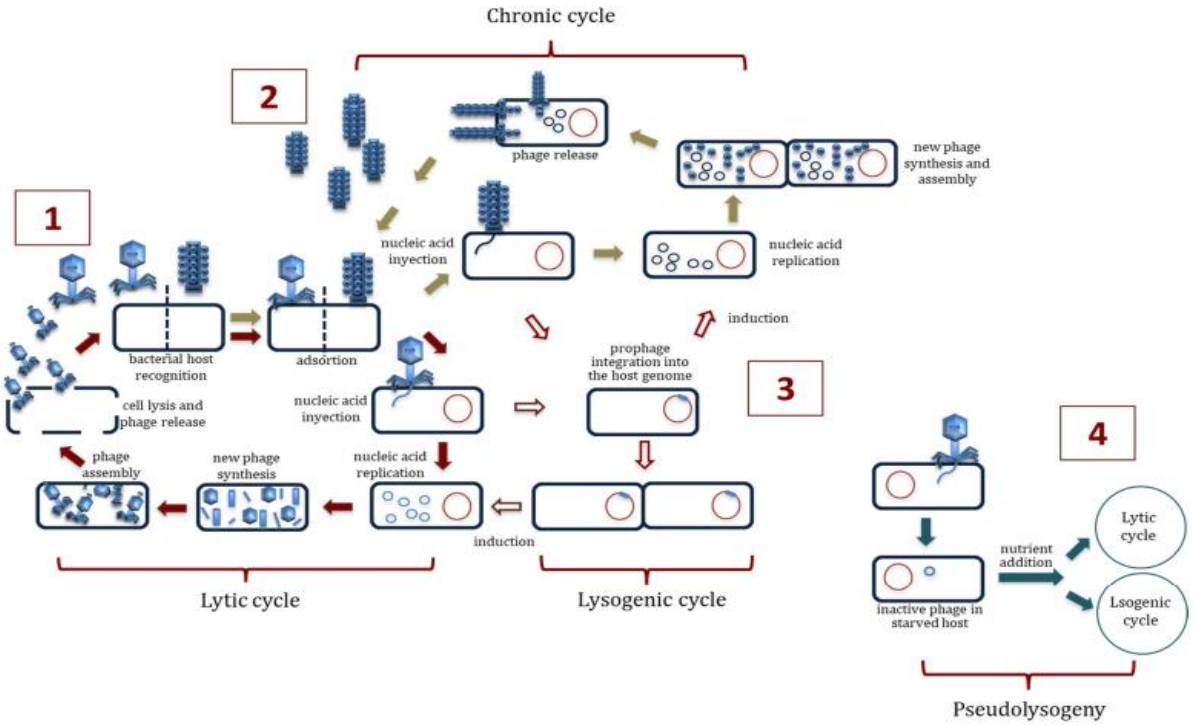
Após a integração do material genético, a lisogenia do fago pode ser resumida em três fases principais: o estabelecimento, a manutenção e a indução (HOWARD-VARONA *et al.,* 2017). Uma vez estabelecidos, os profagos integrados se replicam como parte do cromossomo bacteriano sendo que durante este estágio, eles não apenas podem alterar os processos celulares do hospedeiro, mas também estarem sujeitos a mudanças evolutivas (CASJENS e HENDRIX, 2015). Já o estado de manutenção da lisogenicidade se apresenta dominante quando os genes das proteínas líticas são bloqueados por repressores de lise (por exemplo, repressores CI, CII, CIII). Um fato a se destacar é que mediante a um estresse celular físico ou químico

que causam dano no DNA, essa lisogenicidade pode ser mudada para o modo lítico por meio de um processo denominado “indução”. A indução leva a mudanças nos repressores dos genes reguladores dos ciclos lítico-lisogênicos (FILIPIAK *et al.,* 2020). Por exemplo, durante o estresse e dano ao DNA, o sistema de reparo SOS é ativado com expressão da proteína RecA que suprime uma série de repressores, incluindo os repressores líticos, que por sua vez leva à ativação do ciclo lítico (CAMPOY *et al.,* 2006). Do ponto de vista do fenótipo, os fagos lisogênicos geralmente aparecem na forma de placas turvas de lise incompleta sob a superfície de meios sólidos (MAKKY *et al.,* 2021).

Um outro modo de multiplicação é a pseudo-lisogenia que pode ser definida como o estágio de desenvolvimento estagnado de um bacteriófago em uma célula hospedeira sem multiplicação do genoma do fago (como no desenvolvimento lítico) ou sem sua replicação sincronizada com o ciclo celular e manutenção estável na linha celular (como na lisogenização) que prossegue sem degradação do genoma viral, permitindo assim o reinício subsequente do desenvolvimento do vírus. Este fenômeno é geralmente causado por condições de crescimento desfavoráveis para a célula hospedeira (como por exemplo limitação de nutrientes) e termina com o início da lisogenização verdadeira ou do crescimento lítico em condições que os nutrientes e crescimento do hospedeiro aumentam (ŁOŚ e WĘGRZYN, 2012).

Atualmente, a pseudo-lisogenia está sendo considerada mais frequentemente como um aspecto importante nas interações fago-hospedeiro. A razão para isso é principalmente um aumento do interesse nas interações fago-hospedeiro no ambiente natural. A pseudo-lisogenia parece desempenhar um papel importante na sobrevivência do fago, pois as bactérias em um ambiente natural possuem um crescimento muito lento. Este fenômeno pode ser um aspecto importante da mortalidade bacteriana dependente de fago e pode influenciar a virulência de algumas cepas bacterianas (ŁOŚ e WĘGRZYN, 2012). Por fim, na infecção crônica, o fago filamentoso se replica ativamente no hospedeiro originando sua progênie viral. Contudo, a progênie sai da bactéria sem causar lise bacteriana como por exemplo, por brotamento (FIGURA 2) (CENENS *et al.,* 2013).

Figura 2 - Os principais ciclos de multiplicação dos bacteriófagos



FONTE: Makky *et al.,* 2021

2.8 O uso da fagoterapia na agricultura e sua regulamentação

Ao longo de mais de três décadas, D'Herelle demonstrou que preparações de fagos poderiam ser utilizadas no combate a doenças bacterianas clínicas, incluindo a cólera e a febre tifóide. Esses tratamentos foram tão eficazes que levaram muitas empresas farmacêuticas a comercializarem preparações de fagos para combater tais infecções (TAYLOR, 2014). Entretanto, essa aplicação não ficou restrita à área médica. Quase que em paralelo, diversas tentativas foram feitas de uso de fagos no controle de fitopatógenos bacterianos. Em 1924, Mallman e Hemstreet demonstraram que um filtrado obtido de repolho em decomposição inibiu o crescimento da bactéria *Xanthomonas campestris pv. campestris,* responsável pela podridão negra nessas crucíferas (MALLMANN, 1924). Em 1925, Kotila e Coons demonstraram em bioensaios a prevenção da podridão mole causada por *Pectobacterium atrosepticum* e *Pectobacterium carotovorum ssp carotovorum* em tubérculo de batata e cenoura, respectivamente, utilizando fagos isolados das próprias plantas (COONS, 1925). Já os primeiros testes de campo foram realizados por Thomas em 1935, quando mostrou a redução em cerca de 18% da incidência da doença Murcha de Stewart por meio do

tratamento de sementes com fagos ativos contra o fitopatógeno *Pantoea stewartii* (THOMAS, 1935).

Mesmo com o grande potencial demonstrado para a fagoterapia no controle de bactérias fitopatogênicas, a emergência de várias classes de antibióticos na época fez com que os mesmos fossem amplamente utilizados por conta de sua eficácia e amplo espectro de hospedeiros, fazendo com que estes, junto a compostos de cobre, fossem definidos como o tratamento padrão para doenças fitopatogênicas (SUNDIN *et al*., 2018).

Contudo, a partir da década de 1980, uma difícil situação no tratamento bacteriano foi experimentada em todo o mundo evidenciando uma imensa dificuldade em se obter novos antibióticos com novos modos de ação capazes de solucionar os problemas de resistência antimicrobiana em ascensão. Tal fato resultou em um interesse renovado pela fagoterapia (SULAKVELIDZE, 2001), sendo que ela hoje é considerada uma das sete estratégias destacadas pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos (NIAID) para lidar com os problemas de resistência antimicrobiana (EL-SHIBINY *et al.,* 2017). Conforme indicado acima, o fato de desde 1924 os fagos serem aplicados como agentes para eliminar bactérias fitopatogênicas e serem considerados seguros para uso na agricultura visando o controle de doenças em plantas desde a década de 1970, reforçam ainda mais as vantagens de se investir nas técnicas de terapia fágica (MEADEN *et al.,* 2013).

O primeiro bacteriófago disponível para comercialização na agricultura foi registrado na Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA, no ano de 2005, e foi formulado para o tratamento da pinta-bacteriana em pimenta e mancha bacteriana do tomateiro causadas por *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* e *Pseudomonas syringae pv.* tomato respectivamente (Balogh *et al.,* 2010). A companhia OmniLytics, Inc., Sant Lake City, UT, USA foi a primeira empresa a receber o registro da EPA para o uso de bacteriófagos contra fitopatógenos (STEFANI *et al.,* 2021). Posteriormente, nas últimas duas décadas, diversos produtos à base de bacteriófagos enquadrados na categoria “Biopesticidas” foram registrados no EPA para o controle de doenças bacterianas de plantas. Alguns exemplos incluem produtos para controle do cancro bacteriano do tomate, do cancro cítrico e do fogo da maçã e da pêra (STEFANI *et al.,* 2021). Outra empresa, a Otsuka Pharmaceutical, desenvolveu o biopesticida XylPhi-PD, aprovado nos Estados Unidos, que contém bacteriófagos que infectam a espécie *Xylella fastidiosa,* o principal patógeno causador da doença Pierce da Uva (STEFANI

et al., 2021). Já na Europa existem duas empresas com produtos à base de bacteriófagos registrados: a empresa húngara Enviroinvest, a qual desenvolveu o Erwiphage® Plus para o controle do crestamento da maçã e a empresa escocesa APS Biocontrol Ltd, a qual projetou o Biolyse® PB contendo bacteriófagos para o controle da podridão mole da batata (STEFANI *et al.,* 2021).

Embora atualmente haja uma grande discussão em torno dos vírus serem ou não considerados seres vivos, a agência regulatória internacional os agrupa junto a outros microrganismos como bactérias e fungos. Logo, os fagos entram na classificação de Agentes de Biocontrole Microbiano (MBA's) como biopesticidas (EHLERS, 2011). Contudo, é importante salientar que antes do registro e comercialização, os MBAs precisam passar por uma avaliação de risco completa quanto a segurança alimentar e o destino ambiental (STEFANI, 2016).

Nos Estados Unidos, o marco regulatório para registro envolve apenas duas autoridades que são a Agência de Proteção Ambiental (EPA) e a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA), sendo, portanto, considerado um processo bem menos complexo do que na União Europeia, a qual exige pelo menos quatro autoridades principais: O Estado-Membro relator, onde o requerente apresenta um dossiê com todas as informações relevantes sobre o MBA, a Agência Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), fornecendo uma avaliação e comunicação dos riscos, a Direção-geral da Saúde e Segurança Alimentar (DG SANTE) e o Comité Permanente das Plantas, Animais, Alimentos e Rações (Comité PAFF). Ao final do processo de avaliação, que leva de 26 a 36 meses, o MBA pode ou não ser incluído na lista de substâncias ativas (STEFANI *et al.,* 2021).

Já no Brasil, os procedimentos para experimentação e registro de produtos biológicos para controle de pragas e doenças na agricultura precisa passar por avaliação de três órgãos competentes: o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento **(**MAPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Assim, após a empresa ou pesquisador obter os resultados preliminares *in vitro,* é necessário realizar uma solicitação de Registro Especial Temporário (RET) para que sejam conduzidos estudos em campo do produto potencial desenvolvido (PORTARIA Nº 24, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, site do Governo Federal). O RET possui regulamentação prevista nos artigos 23 a 28, do Decreto nº 4.074, de 2002, disposto na Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 e estabelece as diretrizes a

serem adotadas junto ao MAPA, ANVISA e IBAMA para efeito das avaliações preliminares de produtos técnicos, pré-misturas, agrotóxicos e afins, destinados à pesquisa e experimentação. Após a obtenção do RET, a empresa ou o solicitante poderá então conduzir os estudos de eficácia e praticabilidade agronômica do produto em questão conforme a Instrução Normativa nº15, de 7 de julho de 2016.

É importante salientar que existem algumas especificidades na Instrução Normativa INC 03/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o registro de microrganismos. Logo, na regulamentação brasileira, os bacteriófagos e a aplicação da fagoterapia se enquadrariam na categoria “Agente Biológico de Controle”, a qual engloba organismos vivos, de ocorrência natural ou obtidos por manipulação genética introduzidos no ambiente para o controle de uma população ou de atividades biológicas de outro organismo vivo considerado nocivo (DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Governo Federal).

Assim, seguindo essa normativa, alguns dados requerem especificações sobre o agente biológico de controle em questão, podendo-se citar parâmetros como a infectividade, ou seja, a habilidade do microrganismo para atravessar ou escapar das barreiras naturais, colonizando o hospedeiro, a patogenicidade que seria a capacidade do microrganismo para causar doença ao hospedeiro após a infecção e a toxicidade, relacionada ao potencial do agente em causar lesão ou dano ao hospedeiro, devido a produção de toxina, independentemente da infecção, da replicação ou da viabilidade do microrganismo (DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Governo Federal).

Na avaliação das solicitações feitas, a ANVISA é responsável pela avaliação toxicológica e emite o Informe de Avaliação Toxicológico (IAT) e o IBAMA faz a avaliação ecotoxicológica e se tudo estiver conforme os parâmetros legais estabelecidos, emite o Parecer de Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA). O IAT e o PPA são então encaminhados para o MAPA que ficará responsável em avaliar a eficácia e praticabilidade agronômica do produto. Ao final, caso os 3 órgãos aprovem o registro, o MAPA irá emitir o certificado e publicar no Diário Oficial da União (DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Governo Federal).

Em relação ao patenteamento, uma visão geral é fornecida por Holtappels e colaboradores (2019), a qual traz uma extensa revisão de dados sobre o processo de petição para patenteamento de formulações de fagos para uso no controle biológico voltado à agricultura. Os dados levantados revelam que as reivindicações de patentes são bastante amplas em todo o mundo indicando uma grande atividade de publicações e registro de patentes e revelando que, de fato, existe um grande interesse no desenvolvimento de formulações a base de fagos (HOLTAPPELS *et al.,* 2019). Todavia, apesar do crescente número de pedidos, poucos produtos à base de bacteriófagos foram autorizados e estão disponíveis no mercado atualmente (STEFANI *et al.,* 2021).

2.9 A fagoterapia no controle da murcha e mancha bacteriana em tomateiros

A aplicação de fagos no controle de doenças bacterianas em tomateiros já demonstrou resultados satisfatórios ao longo dos anos em diversos trabalhos presentes na literatura. No trabalho de FUJIWARA e colaboradores (2011), três fagos líticos (RSA1, RSB1 e RSL1) foram capazes de diminuir os sintomas da doença em plantas de *Solanum lycopersicum* L. No estudo, a aplicação dos fagos foi feita nas sementes antes do plantio, enquanto a inoculação da bactéria patogênica *Ralstonia solanacearum* foi realizada na raiz das mudas. Esse tipo de tratamento resultou em uma redução drástica na penetração, crescimento e espalhamento das bactérias na parte aérea das mudas, limitando o estabelecimento da murcha.

Resultados similares foram obtidos por Bae e colaboradores (2012), que conseguiram isolar o fago lítico PE204, o qual inibiu completamente a ocorrência da murcha bacteriana por *R. solanacearum* em tomateiros quando aplicado na rizosfera das plantas. Um outro estudo demonstrou aumento da eficácia do biocontrole da murcha aplicando quatro bacteriófagos diferentes em conjunto na infecção por *R. solanacearum* em tomateiros, tanto nos experimentos em casa de vegetação quanto em condições de campo chegando a diminuir a incidência da doença em até 80%. Os autores mostraram também que o tratamento à base de fagos não afetou a microbiota da rizosfera existente (WANG *et al.,* 2019).

No caso da mancha bacteriana, Balogh e Jones (2003) constataram que fagos líticos isolados de folhas e do solo de tomateiros eram capazes de reduzir a severidade da doença causada por *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria em até

62%. Para isso, os pesquisadores testaram diferentes formulações de fagos junto a farinha de milho pré-gelatinizada, sacarose, leite e leite em pó desnatados separadamente. Foi observado que todas essas substâncias potencializavam a longevidade dos fagos na superfície da planta, tanto em casa de vegetação quanto em ensaios de campo fazendo com que fosse possível inferir que certos aditivos podem atuar como substâncias protetoras dos bacteriófagos perante condições ambientais adversas, as quais as plantas são frequentemente submetidas em campo.

Obradovic e Jones (2004) também demonstraram que combinações de fagos junto a proteína harpina e junto ao acibenzolar-S-metil (ASM) que é um análogo do ácido salicílico e induz resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas foram bastante eficazes no controle da mancha bacteriana do tomate causada por *X. campestris pv. vesicatoria* em experimentos de campo. Tal estudo junto a pesquisas complementares culminou no registro de uma formulação de 6 fagos aplicados junto ao ASM como biopesticida contra por *X. campestris pv. vesicatoria* o qual foi detido pelas empresas Agriphage, OmniLytics, Inc e Salt Lake Cith, UT (STEFANI *et al.,* 2021).

Já em um trabalho recente, Kizheva e colaboradores (2021) caracterizaram três bacteriófagos (SfXv124t / 1, 2 e 3) isolados do solo da rizosfera de tomateiros que foram capazes de lisar patógenos causadores da mancha bacteriana. A caracterização incluiu a determinação da gama de hospedeiros, morfologia das placas de lise, temperatura ótima de armazenamento de lisados de fago puro, sensibilidade à luz ultravioleta, inativação térmica, multiplicidade ótima de infecção (MOI) e morfologia do fago. Os resultados obtidos mostraram que um dos isolados foi capaz de lisar cepas selvagens de três espécies bacterianas fitopatogênicas: *Xanthomonas vesicatoria, Xanthomonas euvesicatoria e Xanthomonas gardneri* e os outros dois fagos foram ativos contra *X. vesicatoria e X. euvesicatoria.* Apesar do estudo ter ficado restrito a testes *in vitro*, os resultados se mostraram bastante promissores pela capacidade bacteriolítica dos fagos contra espécies bacterianas relacionadas, mas com diferenças genéticas significativas (KIZHEVA *et al.,* 2021).

2.10 Fatores e limitações no uso de fagos na agricultura

Desde as primeiras tentativas de uso de fagoterapia na agricultura, a falta de conhecimento sobre a biologia e epidemiologia dos bacteriófagos, a complexidade dos diferentes sistemas de interação bacteriófago-bactéria-planta e fatores ambientais

contribuíram para a diminuição do interesse no desenvolvimento e implementação de estratégias de controle baseadas em bacteriófagos (STEFANI *et al.,* 2021). Felizmente, nos últimos anos, esse cenário tem mudado já que lacunas do conhecimento, antes existentes na área, estão sendo preenchidas resultando em uma maior compreensão das limitações do uso de fagos e de como contorná-las.

O primeiro desafio a se considerar é que os bacteriófagos são veículos biológicos, logo, a exposição e interação desses vírus frente a fatores ambientais possui um impacto muito maior na sua eficácia quando se comparado a maioria dos bactericidas sintéticos. Dessa forma, variações de temperatura, pH, umidade, radiação ultravioleta, dentre outros, podem afetar a sobrevivência dos fagos na filosfera da planta, sendo necessária uma compreensão aprofundada das condições ideais para a capacidade de multiplicação desses fagos no ambiente de sua aplicação (JONES *et al.,* 2007).

Assim, algumas estratégias têm sido sugeridas para melhorar a sobrevivência dos fagos na planta e no ambiente onde ela se encontra. Um exemplo é a adição de substâncias como a sacarose, farinha de milho e leite desnatado às formulações de fagos que mostraram a capacidade de proteger esses vírus contra a dessecação, variações bruscas de pH, incidência de luz ultravioleta e componentes químicos liberados pelas plantas (STEFANI *et al.,* 2021).

Outra questão diz respeito a forma de infecção do patógeno-alvo na planta e o estabelecimento da doença, os quais precisam ser previamente analisados visando se estabelecer os melhores momentos e formas de aplicação dos fagos, tanto os que já são produtos comerciais como em formulações de potenciais produtos ainda em desenvolvimento e que necessitam de experimentações *in vivo* (STEFANI *et al.,* 2021).

Nesse sentido, o biopesticida Erwiphage® Plus, por exemplo, o qual já se encontra disponível no mercado e visa combater o patógeno *Erwinia amylovora* responsável pela queima bacteriana das rosáceas no hemisfério norte, traz a recomendação de aplicação do produto após o pôr do sol de forma a evitar exposição dos fagos a grandes intensidades luminosas. Já o produto AgriPhage que visa o controle da pinta bacteriana (causada por *Pseudomonas syringae* pv. tomato) em tomates e pimentões, apesar de não especificar sobre as melhores condições climáticas e horários para as aplicações, destaca em sua instrução de uso que o produto pode ser utilizado tanto de forma preventiva sendo aplicado para proteger o

tecido foliar em crescimento, quanto de forma curativa, em que os primeiros sintomas da doença são visíveis ou quando as condições são propícias a forte pressão da doença (US LABEL Agriphage. United States Environmental Protection Agency Washington, D.C. 20460). Os dados reforçam a importância de considerar a forma de infecção do patógeno e estabelecimento da doença na definição do uso da fagoterapia.

No caso do biopesticida AgriPhage citado anteriormente, como os patógenos causadores da pinta bacteriana normalmente infectam o tecido da planta por meio aberturas naturais e lesões se estabelecendo na parte aérea da planta, a forma de aplicação recomendada é através de sprays foliares ou nebulização de forma a garantir uma cobertura completa, mas evitando quantidades excessivas que resulte em escoamento. Nas aplicações em maiores escalas, o fabricante recomenda utilizar equipamento convencional de pulverização aérea imediatamente após o plantio e à medida que as plantas se desenvolvem (US LABEL Agriphage. United States Environmental Protection Agency Washington, D.C. 20460).

Já o produto XylPhi-PD ™ registrado pela Otsuka Pharmaceutical, o qual visa o controle do patógeno *Xylella fastidiosa,* responsável pela doença “mal-de-Pierce” em videiras (*Vitis vinifera*) e amendoeiras (*Prunus dulcis*) e alfafas (*Medicago sativa*), a aplicação do produto é realizada por injeção direta no tecido ativo do xilema das videiras. Ao infectar uma árvore, a bactéria gram-negativa se multiplica até obstruir os vasos responsáveis pelo transporte de água e nutrientes da raiz para a copa das plantas. Dessa forma, não seria adequado, por exemplo, o uso de pulverização nas folhas, já que o patógeno se instala no interior dos vasos condutores. Assim, o fabricante recomenda a utilização de um dispositivo de injeção pressurizado que fornece os volumes de aplicação ideias assim como parâmetros de calibre e comprimento da agulha que permitem uma distribuição consistente e eficaz do produto nos sistemas vasculares das plantas tratadas (Biopesticides and Pollution Prevention Division LABEL XylPhi-PD™ Registration. United States Environmental Protection Agency).

Com relação ao tratamento de doenças causadas por patógenos que infectam os sistemas radiculares da planta, como no caso de *Ralstonia solanacearum,* entraves também são observados. Apesar de ainda não existirem produtos registrados contra esse patógeno, pesquisadores que utilizaram formulações fágicas contra a espécie *in vivo*, como por exemplo, no trabalho de Ramírez *et al.,* 2020, observaram uma

redução satisfatória da doença de Moko causada por uma linhagem de *R. solanacearum* em mudas de bananeiras quando os fagos foram misturados ao solo de forma preventiva, ou seja, antes do desenvolvimento dos sintomas da doença. Apesar disso, os autores destacam que os tratamentos foram realizados em vasos individualizados em casa de vegetação. Por isso, um tratamento à base de fagos com aplicações diretamente na rizosfera da planta em campo teria de levar em consideração o fato do conteúdo de água no solo influenciar na taxa de difusão dos bacteriófagos através de suas matrizes heterogêneas (GILL *et al.,* 2003). Dessa forma, a drenagem e a disponibilidade de água nessas matrizes poderiam interferir nas taxas de difusão desses vírus e resultar em um menor número de bacteriófagos viáveis para lisar a bactéria-alvo, diminuindo assim a eficácia da aplicação (GILL *et al.,* 2003). Outros problemas já bem caracterizados incluem a inativação dos fagos devido sua adsorção a partículas de argila do solo (WILLIAMS *et al.,* 1987) e também em solos com baixos valores de pH (BAE *et al.,* 2012). Além disso, existe a probabilidade do aparecimento de cepas bacterianas resistentes a bacteriófagos ao longo do tempo (FUJIWARA *et al.,* 2011). Isso pode comprometer a eficácia da fagoterapia tornando o uso de coquetéis de fagos ideal para minimizar esse risco e oferecer uma solução potencial (MERABISHVILI *et al.,* 2018).

Nesse sentido, o desenvolvimento de produtos requer uma série de testes *in vivo*, uma vez que somente experimentos *in vitro* podem não avaliar e refletir fielmente as condições adversas do ambiente real e de diferentes culturas (STEFANI *et al.,* 2021). Mesmo assim, fatores relacionados ao ciclo de multiplicação dos fagos como multiplicidade de infecção, atividade bacteriolítica e espectro de hospedeiros são de fundamental importância para a avaliação e seleção de potenciais fagos aptos a infectar e destruir colônias de patógenos-alvo. Outrossim, deve ser avaliada a influência de fatores ambientais como variações de temperatura, pH e luz ultravioleta sobre os coquetéis de bacteriófagos (STEFANI *et al.,* 2021). Essas informações são essenciais e permitem melhor definir o tempo de estocagem, doses, frequência e formas de aplicações desses fagos.

3 JUSTIFICATIVA

A solução dos problemas associados à falta de antimicrobianos eficazes para o controle de doenças na cultura do tomateiro e o aumento de fitopatógenos resistentes aos antimicrobianos existentes é dependente do desenvolvimento de novas formas de combate a esses patógenos. Para este fim, os bacteriófagos, que são vírus que infectam exclusivamente bactérias, podem ser particularmente úteis.

Atualmente, agências regulatórias dos Estados Unidos, como a Environmental Protection Agency (EPA), Food and Drug Administration (FDA) e United States Department of Agriculture **(**USDA) já detém produtos registrados a base de fagos para uso e comercialização na indústria de alimentos, na área clínica e na agricultura (HOUSBY e MANN, 2009). Já na Europa, apesar de um trâmite um pouco mais complexo para o registro pelas agências regulatórias, também já existem produtos à base de fagos aprovados para uso com destaque para a empresa húngara Enviroinvest e a empresa escocesa APS Biocontrol Ltd, as quais comercializam produtos fágicos contra fitopatógenos para uso na agricultura. Com relação ao Brasil, ainda não há produtos à base de fagos registrados para uso na agricultura, contudo, o seu desenvolvimento precisa ser considerado visando uma produção nacional autossuficiente de biopesticidas que causem o menor impacto ambiental possível e contribua para menores perdas nas safras anuais de alimentos (SCHWARCZINGER *et al.,* 2017).

Existem inúmeras vantagens no uso de formulações a base de fagos, a começar pelo fato desses vírus não serem tóxicos já que a sua persistência no ambiente está condicionada a presença de bactérias hospedeiras viáveis. Logo, a possibilidade de prejuízo aos seres vivos presentes no mesmo ambiente de aplicação e a microbiota benéfica a planta e solo é diminuída devido a especificidade de hospedeiros que normalmente chega a baixos níveis taxonômicos como de espécie e linhagem (BUCKLING, 2011). Ademais, os fagos possuem a capacidade de se amplificar em seu hospedeiro e, em uma etapa final, destruir o patógeno para liberação de sua progênie que irá infectar novas células. Esse efeito de auto amplificação é uma enorme vantagem, já que um menor número de aplicações pode ser requerida (SCHWARCZINGER *et al.,* 2017)

Com relação aos entraves no desenvolvimento das formulações, diversas alternativas foram e estão sendo desenvolvidas para superar o problema da

estabilidade e persistência dos fagos no ambiente. Dentre essas saídas pode-se citar a aplicação de substâncias que protegem os bacteriófagos contra condições ambientais adversas, assim como estratégias para diminuir a incidência da resistência bacteriana aos fagos, como por exemplo a combinação de mais de um bacteriófago para ampliar a gama de hospedeiros e suprimir a evolução da resistência (STEFANI *et al.,* 2021).

Logo, diante das problemáticas apresentadas, o desenvolvimento de novas estratégias profiláticas e terapêuticas para o controle bacteriano de fitopatógenos do tomateiro é imprescindível e é o primeiro passo para a criação de um produto, o qual beneficiará consumidores de produtos agrícolas que receberão alimentos livres de resíduos de produtos antimicrobianos químicos, assim como poderá ter um impacto muito positivo frente às questões ambientais, já que os fagos são considerados não tóxicos (GRAS) e biodegradáveis. Ademais, beneficiará a empresa envolvida, uma vez que a tecnologia é economicamente rentável para o fabricante sendo mais barato de se desenvolver e produzir do que pesticidas convencionais (SCHWARCZINGER *et al.,* 2017).

Dessa forma, esse trabalho possibilitou o isolamento de fagos que apresentaram grande potencial de biocontrole dos agentes etiológicos da murcha e mancha bacteriana. Os resultados mostraram uma boa estabilidade dos fagos submetidos à amplas variações de pH, variações de temperatura e exposição à luz UV, além dos mesmos mostrarem alta especificidade as bactérias hospedeiras de interesse e resultados bastante promissores na testagem *in vivo* utilizando um dos bacteriófagos. Com os resultados dessa pesquisa, espera-se ampliar, a médio e longo prazo os testes *in vivo* e em larga escala no campo, abrindo a possibilidade para a formulação de um produto fágico visando o manejo e controle da murcha e da mancha bacteriana em tomateiros.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Isolamento e caracterização de fagos com potencial bacteriolítico para aplicação no biocontrole de linhagens de *Ralstonia solanacearum* e de uma linhagem de *Xanthomonas perforans,* causadores da murcha e mancha bacteriana em tomateiros.

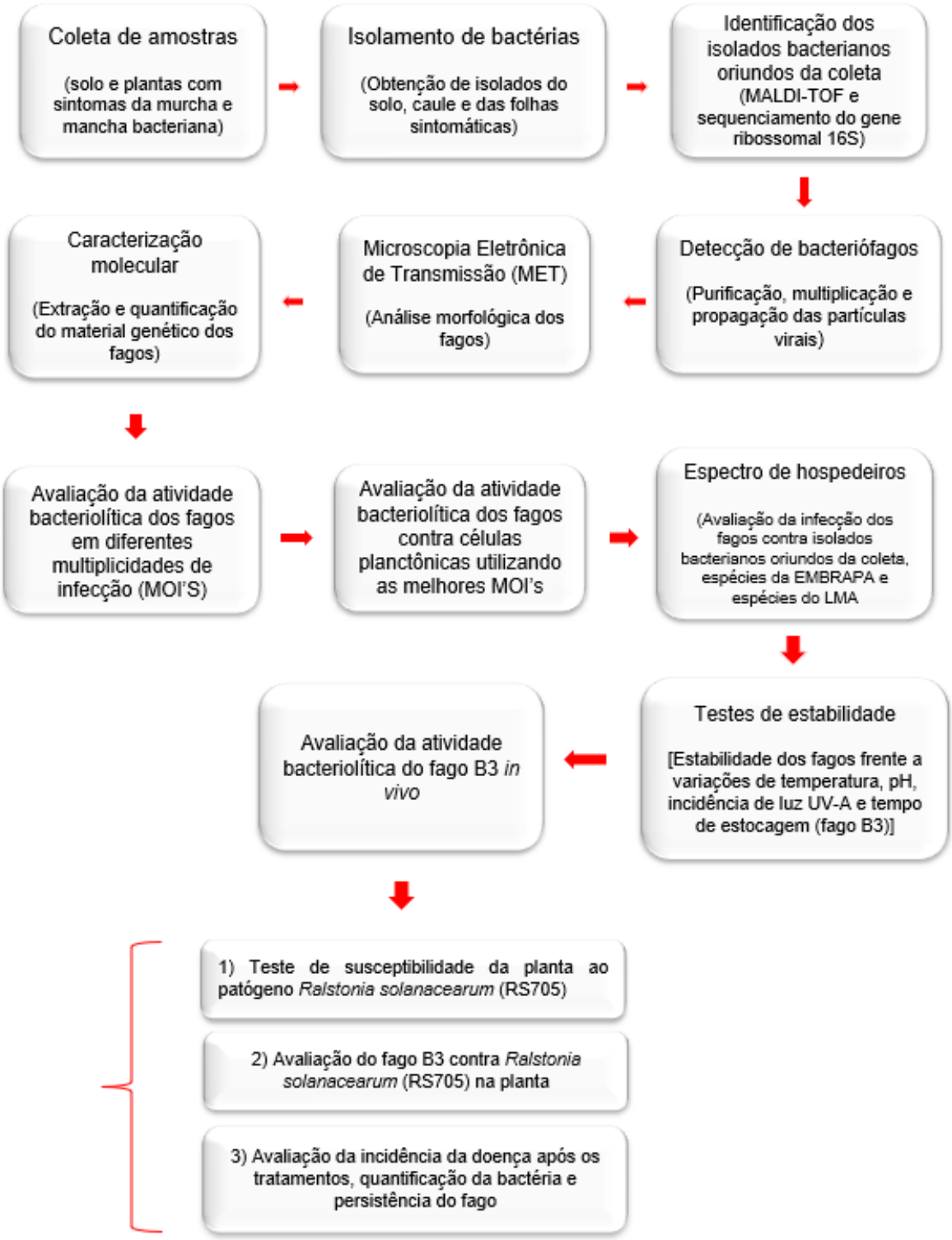
4.2 Objetivos Específicos

- Isolamento e purificação de fagos líticos a partir de amostras de solo e plantas do tomateiro com sinais de murcha e mancha bacteriana utilizando como bactérias hospedeiras: *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas perforans;*
- Isolamento de bactérias do solo rizosférico, caule e das folhas de tomateiros doentes para utilização nos testes de especificidade de hospedeiro;
- Caracterização morfológica e molecular dos fagos;
- Caracterização dos fagos quanto a multiplicidade de infecção (MOI), atividade bacteriolítica e espectro de hospedeiros;
- Avaliação da estabilidade das partículas virais obtidas frente a variações de pH, temperatura, exposição à luz UV e tempo de estocagem para o uso na agricultura;
- Avaliação da atividade bacteriolítica do fago B3 contra *Ralstonia solanacearum in vivo.*

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Fluxograma

Fluxograma 1 - Fluxograma - Materiais e métodos



FONTE: Elaborado pelo autor (2023)

5.2 Coleta de amostras

Foram realizadas coletas de solo rizosférico e partes de plantas em dois diferentes plantios comerciais de tomate. A primeira delas ocorreu no Sítio São Francisco, localizado no município de Coimbra, Minas Gerais. Nessa primeira localidade, foram extraídas partes aéreas de 7 plantas que apresentavam sintomas da mancha bacteriana (FIGURA 3) juntamente com parte das raízes e de seu solo rizosférico. Já a segunda coleta foi realizada na propriedade Água Espalhada também localizada no município de Coimbra. Nesse plantio, foram recolhidas as partes aéreas, raízes e solo rizosférico também de 7 plantas que apresentavam sintomas da murcha bacteriana (FIGURA 4).

Figura 3 - Folhas apresentando lesões necróticas de coloração pardo escura, sintomas clássicos da mancha bacteriana

FONTE: Elaborado pelo autor.

Figura 4 - Planta apresentando aspecto de murcha de cima para baixo, o que caracteriza sintomas da murcha bacteriana.

FONTE: Elaborado pelo autor.

5.3 Bactérias usadas no estudo

No presente estudo foram isoladas bactérias do caule e do solo rizosférico de plantas com sintomas da murcha bacteriana e das folhas de plantas com sintomas de mancha bacteriana. Além desses isolados, foram utilizadas linhagens bacterianas patogênicas pertencentes da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas de Hortaliças do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa (Brasília, Distrito Federal), as quais foram gentilmente cedidas pelos professores Carlos Alberto Lopes e Alice Quezado Duval. As linhagens são causadoras da murcha, mancha e pinta bacteriana e encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Linhagens bacterianas fornecidas pela EMBRAPA HORTALIÇAS

Código	Isolados
EH_PSD 320	*Pseudomonas syringae* pv. tomato
EH_ 2015-56	*Xanthomonas hortorum* pv gardneri
EH_ 2015-90	*Xanthomonas euvesicatoria* pv perforans
RS639	*Ralstonia pseudosolanacearum*
RS672	*Ralstonia pseudosolanacearum*
RS683	*Ralstonia solanacearum*
RS705	*Ralstonia solanacearum*

FONTE: Elaborado pelo autor.

5.3.1 Isolamento de bactérias do solo rizosférico de plantas com sintomas da doença murcha bacteriana

Aproximadamente 3 gramas do solo rizosférico de cada planta doente coletada foram homogeneizadas em 50 mL de tampão (¼) Ringer (0,125 mol/L de cloreto de sódio, 1,5 mmol/L de cloreto de cálcio di-hidratado, 5 mmol/L de cloreto de potássio e 0,8 mmol/L de fosfato de sódio dibásico ajustado a pH 7.4), acrescido de 5 mL de meio CPG líquido de Kado & Heskett (1970) (caseína hidrolisada 1 g/L, peptona 10 g/L, glicose 5g/L, ágar-ágar 17 g/L). O conteúdo foi agitado por 2 horas a 140 rpm. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL do extrato foi diluída em 900 µL de NaCl (0,85%) e realizada uma diluição seriada até 10^{-8}. Em seguida, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram espalhadas em placa de Petri contendo meio CPG sólido pela

técnica “spread plate”. As placas foram incubadas em câmaras do tipo B.O.D. por 24 horas a 30ºC. Após o crescimento, colônias individualizadas de diferentes aspectos macromorfológicos foram isoladas pela técnica de estria composta usando o mesmo meio de cultura. Posteriormente, os isolados foram codificados e realizado um estoque das culturas sob as condições descritas no item 5.4.

5.3.2 Isolamento de bactérias com características macromorfológicas de *Ralstonia sp.* de plantas com sintomas da murcha bacteriana

Segmentos de caule com exsudação bacteriana foram parcialmente desinfetados pela lavagem com sabão em água corrente. Em seguida, fragmentos do interior do caule com cerca de 1 cm foram cortados e depositados em 1 mL de água esterilizada em placa de porcelana, sob condições assépticas. Após cerca de 4 minutos em repouso, uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-8} utilizando NaCl (0,85%) foi realizada partindo de uma alíquota de 100 µL. Em seguida, 100 µL de cada diluição foram espalhados pela técnica “spread plate” em placas de Petri contendo meio de cultivo sólido CPG de Kado & Heskett (1970). As placas foram mantidas em câmaras do tipo B.O.D. por 48 horas a 30ºC, e posteriormente, colônias individualizadas que apresentaram aparência fluida e esbranquiçada, características de *Ralstonia solanacearum*, foram isoladas pela técnica de estria composta usando o mesmo meio de cultura e então codificadas sendo realizado um estoque das culturas sob as condições descritas no item 5.4.

5.3.3 Isolamento de bactérias com características macromorfológicas do gênero *Xanthomonas sp*. das folhas de plantas com sintomas de mancha bacteriana

Fragmentos de folhas sintomáticas do tomateiro foram desinfetados em álcool 70% por 30 segundos, depois em hipoclorito de sódio (0,7%) pelo mesmo intervalo de tempo e, em seguida, lavados três vezes em água destilada estéril. Posteriormente, a amostra foi macerada em cadinho junto a 1 mL de água destilada estéril, sendo então realizada uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-8} utilizando NaCl (0,85%) a partir de uma alíquota de 100 µL do extrato obtido. Logo, 100 µL de cada diluição foram espalhados pela técnica “spread plate” em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Nutriente (HiMedia, EUA). As placas foram mantidas em câmaras do tipo B.O.D. por 24 horas a 30ºC. Após o crescimento, foram selecionadas colônias de cor variando de amarelo

claro a amarelo escuro, com consistência mucóide e margens opacas, características de *Xanthomonas sp*. Os morfotipos individualizados foram purificados por meio da técnica de estria composta em outra placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Os morfotipos foram codificados e realizado um estoque das culturas sob as condições descritas no item 5.4.

5.4 Condições de cultivo, preservação e estocagem

Os morfotipos isolados do caule e do solo rizosférico de plantas com sintomas da murcha bacteriana juntamente aos isolados de *Ralstonia sp*. obtidos da Embrapa foram multiplicados em meio de cultivo CPG de Kado & Heskett (1970) a 140 rpm e 30ºC e realizado um estoque utilizando glicerol a uma concentração final de 25% (v/v). Já os morfotipos isolados das folhas com sintomas da mancha bacteriana e os isolados de *Xanthomonas sp.* e *Pseudomonas sp.* (Embrapa) foram multiplicados em Caldo Nutriente (HiMedia, EUA) a 140 rpm e 30ºC sendo também preservados em glicerol com a mesma concentração final. Todos os isolados foram mantidos a - 20 ºC.

5.5 Identificação dos isolados bacterianos

5.5.1 Identificação pela técnica de MALDI-TOF

Os isolados bacterianos obtidos do caule e das folhas foram estriados em placas de petri contendo meio sólido CPG de Kado & Heskett (1970) e Ágar Nutriente (HiMedia, EUA) respectivamente e incubados por de 24 a 48 horas a 30ºC. Posteriormente uma colônia de cada isolado foi transferida para poços da placa de aço inoxidável de Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI (Bruker, Alemanha). Em seguida, 1 µL de ácido fórmico (P.A) foi adicionado em cada amostra e as mesmas foram mantidas à temperatura ambiente até secar. Os poços receberam 1 µL de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Sigma-Aldrich, Polônia) e foram mantidos a temperatura ambiente para, posteriormente, serem analisadas em espectrofotômetro de massa. Os espectros de massa obtidos foram analisados pelo Software Bruker Daltonik MALDI Biotype (Bruker, Alemanha) e as identificações realizadas com base em um ranking contendo as 20 melhores correspondências entre a amostra e o banco de dados junto ao valor de confiança variando de 0 a 3. A identificação final foi realizada de acordo com os critérios recomendados pelo

fabricante. A técnica procedeu-se no Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (Aquavet) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG.

5.5.2 Identificação por sequenciamento do gene ribossomal 16S

5.5.2.1 Extração do DNA

A obtenção do DNA total foi realizada utilizando o kit da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente 1 mL de cada cultura bacteriana (D.O.600nm= 0,5 a 1,0) foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Thermo Fischer Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Alemanha) por 2 minutos a 14.0000 x *g*, e o sobrenadante descartado. Em seguida, na etapa de lise celular, o pellet foi ressuspendido em 600 µL de solução de lise, pipetada suavemente para homogeneizar. As amostras foram então incubadas durante 5 minutos a 80°C e depois resfriadas até a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 3 µL de solução de RNase (4 mg/mL) e o conteúdo incubado a 37 °C durante 1 hora. Para a precipitação de proteínas, adicionou-se 200 µL de solução de precipitação e realizada a homogeneização em vórtex (Agitador de tubos vórtex INBRAS - AG 230 AT), seguido de centrifugação a 16.000 × g por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 600 µL de isopropanol (100%) em temperatura ambiente, e após nova centrifugação numa rotação de 16.000 × g por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 600 µl de etanol a 70% e centrifugado por 2 minutos a 13.000 × *g*. Em seguida, o etanol foi descartado e o precipitado deixado em temperatura ambiente para a secagem por 15 minutos. Por fim, o DNA precipitado foi reidratado em 60 µL de solução de reidratação por 1 hora a 65 °C. A qualidade da extração foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e quantificada em Nanodrop (Lite da Thermo Scientific).

5.5.2.2 Amplificação das regiões V1 a V5 do gene ribossomal 16S

As amostras de DNA extraídos foram utilizadas em reações de PCR para amplificação do marcador filogenético RNAr 16S, utilizando os primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3'). As reações de PCR foram realizadas utilizando o Kit PCR Master Mix Promega (Promega Corporation) em um volume total de 25 µL seguindo o protocolo do fabricante. A amplificação foi realizada em termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad

Laboratories) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 ºC por 4 minutos seguindo para 30 ciclos de desnaturação a 94 ºC por 1 minuto, anelamento de 57 ºC por 1 minuto, extensão a 72 ºC por 1 minuto e 30 segundos, finalizado por extensão final de 72 ºC por 10 minutos. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%. Para realização da eletroforese, foram adicionados 4 µL de tampão de amostra Gel Loading Dye (Sinapse Biotecnologia) e 2 µL de GelRed® (Uniscience). No gel foram pipetados 5 µL do marcador de DNA de 1 Kb (DNA Ladder, Thermo Fisher) juntamente a 2 µL de GelRed® (Uniscience). A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1X por 40 minutos a 110 volts. Após a corrida em gel, a observação do fragmento amplificado foi realizada utilizando fotodocumentador com luz UV (302 nm). O material extraído foi armazenado a -20 ºC até a próxima etapa de sequenciamento dos “amplicons”.

5.5.2.3 Montagem da placa para sequenciamento dos “amplicons” do DNA ribossomal 16S

Após a amplificação do material genético na etapa anterior, foi realizada a purificação dos “amplicons”. Para isso, foram adicionados a cada produto da PCR, 135 µL de etanol absoluto e 11,25 µL de EDTA (125mM). O conteúdo foi homogeneizado e deixado em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 25 minutos e, em seguida, foi descartado o sobrenadante. Adicionou-se então, 120 µL de etanol (70%) e a solução homogeneizada por inversão. Novamente foi realizada uma centrifugação a 14.0000 × g por 10 minutos e o sobrenadante cuidadosamente descartado. Mais uma vez, foi realizado o mesmo passo anterior, adicionando-se 120 µL de etanol (70%) seguido por uma centrifugação a 13.0000 × g por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram deixados abertos por cerca de 30 minutos ou até toda a evaporação do etanol ocorrer. O pellet foi então ressuspendido em 10 µL de água e homogeneizado. Os “amplicons” obtidos foram dosados em NanoDrop (Lite da Thermo Scientific) e diluídos de forma a resultar em concentrações finais entre 10 a 12 ng/µL. Na etapa seguinte, foi realizada a reação de precipitação dos “amplicons”. Para isso, foram pipetados em placa específica para sequenciamento (PCR-96M2-HS-C) 0,8 µL do reagente BigDye, 1,6 µL do tampão do kit, 1ul (5 pmol) de cada primer usado na amplificação, 2 µL de cada “amplicon” e água até atingir 10 µL de volume

final. A placa foi submetida a um ciclo inicial de 96 ºC por 1 minuto, seguido por 96 ºC (Rampa entre 1ºC/seg e 0ºC/seg) por 15 segundos, 50ºC por 15 segundos, 60ºC por 4 minutos por 34 ciclos em termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories). Posteriormente, foram adicionados 2,5 µL de EDTA e 30 µL de etanol 95% em cada poço e a placa centrifugada a 4.000 x *g,* por 45 minutos, sendo todo o líquido em excesso retirado posteriormente. A placa foi então armazenada em freezer a -20ºC até posterior envio para o sequenciamento.

5.6 Isolamento de bacteriófagos

Nessa etapa, foram utilizados como bactérias hospedeiras de fagos, tanto os isolados bacterianos da coleta quanto as linhagens dos gêneros de *Ralstonia sp*. e *Xanthomonas sp.* pertencentes a Coleção de Bactérias Fitopatogênicas de Hortaliças do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa (Brasília, Distrito Federal). Para o isolamento de bacteriófagos hospedeiros de *Ralstonia sp.,* cerca de 3 gramas do solo rizosférico de cada planta com sintomas da murcha bacteriana foram adicionados a 50 mL de tampão (¼) Ringer. Os extratos obtidos foram adicionados de 2 mL de meio líquido CPG de Kado & Heskett (1970) e o conteúdo incubado em agitador a 140 rpm e 30 ºC por 24 horas. Já para detecção de bacteriófagos hospedeiros de *Xanthomonas sp.*, 3 folhas de cada planta sintomática (mancha bacteriana) foram maceradas em cadinho junto a 3 gramas de areia lavada estéril e, posteriormente, também adicionados de 50 mL de tampão (¼) Ringer. A esse extrato, foram adicionados 2 mL de meio Caldo Nutriente (HiMedia, EUA) incubado em agitador a 140 rpm e 30 ºC por 24 horas. No outro dia, ambas as amostras foram centrifugadas a 13.0000 x *g* por 20 minutos e tiveram os sobrenadantes filtrados em membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemanha). Posteriormente, foram realizadas sobrecamadas formadas por 100 µL dos extratos filtrados junto a 100 µL de cada uma das linhagens bacterianas de *Ralstonia sp*. e *Xanthomonas sp*. em D.O 600 nm entre 0,3 e 0,5 e a 4 mL de meio semi sólido (0,7% p/v de ágar), as quais foram vertidas em placas contendo meio sólido CPG de Kado & Heskett (1970) ou Ágar Nutriente. As placas foram incubadas por 24 horas a 30°C visando a observação de placas de lise (Adaptado de Czajkowski *et al.,* 2015). No dia posterior, foi retirado com o auxílio de uma ponteira estéril, um pequeno pedaço de ágar do centro de cada placa de lise formada que apresentava características macromorfológicas únicas. Estas porções das placas de lise foram transferidas individualmente para microtubos

de 2 mL, contendo 1 mL de solução salina (NaCl 0,85%), e armazenadas a 4°C até a etapa seguinte de purificação (ANDREWSPFANNKOCH *et al.,* 2010).

5.6.1 Purificação das partículas virais

Após a separação inicial, foram realizadas seis passagens sucessivas de reinfecção para cada placa de lise isolada pelas técnicas de “spot” e “sobrecamada” visando manter-se ao final, um único padrão macromorfológico que normalmente inclui presença ou ausência de halos, opacidade e tamanho. Esses padrões são de fundamental importância, uma vez que é a primeira indicação de que os fagos recuperados podem pertencer a ordens, classes ou famílias diferentes. Assim, em cada passagem, foi retirado um pequeno pedaço de ágar do centro da placa de lise com o auxílio de uma ponteira estéril e foi transferido para um microtubo de 2 mL, contendo 1 mL de solução salina (NaCl 0,85%) (ANDREWSPFANNKOCH *et al.,* 2010). Os microtubos foram agitados vigorosamente com o uso de agitador (Agitador de tubos vórtex INBRAS - AG 230 AT), seguidos de centrifugação a 13.000 x *g* por 20 minutos (Thermo Fischer Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Alemanha). Posteriormente, 100 µL do sobrenadante foi utilizado para realização de diluições seriadas para que uma alíquota de 10 µL de cada diluição fosse então pipetada sobre uma fina camada de meio semi sólido CPG ou Ágar nutriente (0,7% p/v de ágar) contendo 100 µL da bactéria hospedeira em D.O a 600 nm entre 0,3 e 0,5. As placas foram então incubadas a 30°C por 24 horas. Essa última etapa é denominada “spot” e foi utilizada para verificação do título (UFP/mL) em que as partículas virais se encontravam para definição de qual diluição escolher para realização da técnica de sobrecamada para confirmação da pureza. Em seguida, alíquotas de 100µL da diluição selecionada acrescidas de 100 µL de cada bactéria-alvo em D.O a 600 nm entre 0,3 e 0,5 foram transferidas para tubos contendo 4 mL de meio semi sólido. O conteúdo foi homogeneizado e vertido em placas contendo cerca de 20 mL meio sólido, seguido de incubação a 30°C por 24 horas. As placas foram inspecionadas quanto a uniformidade das características das placas de lise, para confirmação da pureza e então serem utilizadas para as etapas seguintes de multiplicação, propagação e estocagem dos fagos.

5.6.2 Multiplicação dos fagos

As suspensões dos fagos purificados obtidas na etapa anterior (100 µL) foram misturadas junto a 100 µL da bactéria-alvo hospedeira em D.O 600 nm entre 0,3 e 0,5 em 4 mL de meio semi sólido (0,7% p/v de ágar) e vertidos em placas de Petri grandes contendo meio sólido. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas para observação do efeito de lise confluente dos fagos. Em caso positivo, as placas foram adicionadas de 14 mL de tampão SM (5.8 g/L de NaCl e concentração final de 100 mmol/L, 2 g/L de MgSO4.7H2O e concentração final de 8 mmol/L e 50 mL de Tris-Cl a 1 mol/L, pH 7.5 e concentração final de 50 mmol/L) e incubadas a 90 rpm e 30°C por aproximadamente 2 horas. Após esse período, utilizando uma alça de Drigalski, todo o meio semi sólido foi raspado e vertido em um tubo de centrífuga de 50 mL. Esse conteúdo foi centrifugado a 13.000 x *g* por 20 minutos e, posteriormente, filtrado utilizando uma em membrana PVDF com 0,22 µm de tamanho de poro (Millipore, Darmstadt, Alemanha). Ao final, obteve-se um filtrado com partículas fágicas puras e em altos títulos para seguir para a etapa de titulação.

5.6.3 Titulação dos fagos

Para determinação da concentração dos fagos, foram realizadas diluições seriadas em solução salina (NaCl, 0,85%) nas proporções de 1:10 até a ordem de 10^{10} para cada amostra de fago já purificada e multiplicada. Assim, através da técnica de "spot", anteriormente descrita, foi definida a diluição em que era possível observar placas de lise individualizadas. Para garantir tal reprodutibilidade, foi realizado um ensaio em placas de Petri na diluição selecionada para cálculo do título de partículas virais infecciosas expresso em UFP/mL usando a seguinte fórmula:

$$\mathbf{UFP/mL = n \times FC \times FD}$$

n = número de placa de lises contadas;
FC = fator de correção (número pelo qual o valor do inóculo utilizado deve ser multiplicado para que se obtenha o valor em 1 mL);
FD = Fator de diluição, corresponde ao inverso da diluição na qual foi encontrado o valor de n.

5.6.4 Propagação dos fagos

Para se obter maiores quantidades de fagos em altos títulos, realizou-se a propagação dessas partículas virais. Para tal, as bactérias hospedeiras foram crescidas até uma D.O 600 nm de 0,3 em 500 mL de meio líquido BHB (Bushnell Haas Broth, HiMedia, PA, USA.) suplementado com 0,05 g/L de extrato de levedura e 2 g/L de glicose para a então adição do fago. O conteúdo foi incubado a 90 rpm e a 30°C por aproximadamente 36 horas até que se observou uma diminuição da turbidez da cultura bacteriana. Posteriormente, o lisado foi centrifugado por 20 minutos a 13.000 x *g*, o sobrenadante filtrado em membrana PVDF 0,22 µm (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemanha) e o filtrado armazenado a 4°C. O extrato de fagos foi titulado para determinação da concentração das partículas virais e armazenado em geladeira a 4°C para uso nos posteriores testes *in vitro* e *in vivo.*

5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para essa análise, os extratos foram submetidos a uma etapa prévia de concentração e limpeza pela técnica da ultracentrifugação com acetato de amônio ($C_2H_7NO_2$) (Adaptado de Ackermann *et al.*, 2009). Para isso, 35 mL do lisado não filtrado de cada fago em altos títulos (10^8 UFP/mL ou mais) foi centrifugado a 25.000 x g por 1 hora. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o mesmo substituído por uma solução de 0,1 mol/L de acetato de amônio. Novamente o conteúdo foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sedimento final foi ressuspendido em 200 µL de tampão SM. O concentrado final foi armazenado a 4°C para posterior titulação e envio ao Centro de Microscopia da UFMG. As amostras foram contrastadas negativamente com 2% (peso/vol) de acetato de uranila por 30 segundos e examinadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit G2-12 (FEI Company, Hillsboro, OR, Estados Unidos) operando a 120kV em diferentes magnitudes para determinação das morfologias dos fagos.

5.8 Caracterização Molecular

A extração do material genético dos fagos foi realizada em três etapas. Primeiramente, visando a concentração das partículas virais, 25 mL do lisado filtrado de cada fago foi tratado com uma solução de 2 mol/L de ZnCl2 (20 µL/mL). O conteúdo foi incubado a 37°C por 5 minutos e posteriormente centrifugado a 8000 x *g* por 10

minutos, sendo o precipitado obtido ressuspendido em 450µL de tampão SM (Adaptado de Santos et al.,1991). Em uma segunda etapa visando remover o DNA e RNA bacteriano residual, o conteúdo ressuspendido foi adicionado de 50 µL de tampão da enzima DNase I (10x), 1 µL de DNase I (1 U/µL) e 1 µL RNase A (10 mg/mL) e, em seguida, incubado por 1,5 hora a 37°C em banho maria, sem agitação. Após esse tempo, foram adicionados 20 µL de 0.5 mol/L de EDTA em uma concentração final de 20 mol/L para inativação das enzimas (Jakočiūnė *et al.,* 2018). Posteriormente, o conteúdo foi tratado com 1,25 µL de Proteinase K (20 mg/mL) a uma concentração final de 50 µg/mL, sendo então incubado por 1,5 horas a 56°C. Após o período de incubação, adicionou-se 200µL de solução de precipitação de proteína do kit Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit), sendo a solução homogeneizada e incubada no gelo por 5 minutos. Após centrifugação por 10 minutos a 21000 x *g*, o sobrenadante foi transferido para tubo contendo 600 µL de isopropanol e mantido por 20 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, uma nova centrifugação foi realizada na mesma condição anterior, mas dessa vez o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado gentilmente com 600 µL de etanol 70%. Após nova centrifugação (21000 x *g* por 10 minutos), o etanol foi aspirado e após o precipitado secar, o mesmo foi gentilmente homogeneizado com 50 µL de solução de reidratação (Wizard Genomic DNA Purification Kit). O material obtido foi analisado em gel de agarose, quantificado e submetido para sequenciamento usando a plataforma Illumina HiSeq (Macrogen - Seoul, Coreia) e os dados serão analisados utilizando o software Geneious versão 9.1.2. (Biomatters).

5.9 Avaliação da atividade bacteriolítica em diferentes multiplicidades de infecção (MOI'S)

A atividade bacteriolítica *in vitro* utilizando diferentes multiplicidades de infecção (MOI's) dos fagos foi avaliada em microplacas de 48 poços. Logo, primeiramente foi estabelecida a relação entre a densidade óptica (D.O. 600 nm), as unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) e as unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) de cada bactéria hospedeira (ANEXO A). Posteriormente, os poços de cada placa foram preenchidos com 450 µL da cultura da bactéria hospedeira (RS705 ou IS3FMA) em uma D.O 600 nm inicial de 0.2 e 50 µL dos fagos em diferentes concentrações, de modo que no volume final de 500 µL fossem obtidos MOI's de 0,01; 0,1; 1 e 10, respectivamente. A placa foi incubada sob agitação de 90

rpm a 30ºC (Varioskan® Flash, Thermo Scientific, Finlândia) e realizadas leituras de D.O 600 nm a cada 60 minutos durante 24 (IS3FMA) e 36 horas (RS705). Também foram adicionados 500 µL das respectivas culturas bacterianas configurando o controle, uma vez que os tratamentos foram avaliados pela diferença da D.O 600 nm entre os diferentes valores de MOI's em relação aos poços contendo somente a bactéria. Os tratamentos foram realizados em triplicata e as médias dos resultados usadas para construção da curva do crescimento bacteriano (D.O 600 nm) ao longo do tempo.

5.10 Avaliação da atividade bacteriolítica contra células planctônicas

Para avaliar a atividade do fago contra as células planctônicas em suspensão, uma alíquota de 100 µL de cada cultura bacteriana (RS705 e IS3FMA) em fase exponencial de crescimento (D.O 600nm= 0,5) foi inoculada em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido CPG e 200 mL de Caldo Nutriente (Nutrient Medium, HiMedia, EUA), respectivamente. Em seguida, acrescentou-se 2 mL do fago B3 junto a cultura de RS705 configurando uma MOI final de 0,01 e 20 mL do fago x1 na cultura de IS3FMA, configurando uma MOI final de 10. Essas MOI's finais foram escolhidas com base nos melhores resultados de supressão do crescimento bacteriano obtidos no item 5.9. A partir de então foram realizadas medidas da D.O. a 600nm em espectrofotômetro (modelo UV-Vis Shimadzu) nos tempos de 2, 4, 8, 18, 24 e 36 horas. Os controles consistiram em frascos de 500 mL contendo 200 mL das culturas bacterianas crescidas e avaliadas nas mesmas condições.

5.11 Espectro de hospedeiros

A fim de se conhecer o espectro de infecção dos bacteriófagos obtidos, foi testado o potencial de infecção dos fagos contra espécies bacterianas isoladas das plantas (folhas e caules), solo rizosférico, as espécies recebidas da Embrapa Hortaliças, bem como de algumas espécies bacterianas já identificadas pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA). Logo, através da técnica de spot, 10 µL de cada fago foram depositados sobre um tapete uniforme de cada uma das bactérias em D.O. de 600nm entre 0,3 e 0,5 em meio semi sólido. A formação de placas de lise foi o indicativo de atividade lítica contra as respectivas espécies. O experimento foi realizado em duplicata e repetido duas vezes.

5.12 Testes de estabilidade

5.12.1 Estabilidade dos fagos em diferentes valores de pH

Para verificação da estabilidade dos fagos em diferentes valores de pH's, foi inicialmente preparado o tampão SM (2X) em diferentes valores de pH (variando de 3,0 a 9,0). Para isso, utilizou-se 0.2 mol/L de tampão Tris, o qual teve os valores de pH ajustados pela adição de 0.2 M de HCl. Posteriormente, cada tampão de TrisHCl com pH já ajustado foi acrescido de NaCl (11,6 g/L) e MgSO4.7H2O (4g/L). Para a realização do teste, uma alíquota de 100 µL de cada fago armazenado em tampão SM (pH= 7.0) foi adicionada a 900 µL de tampão SM (2X) nos pH's de 3,0 a 9,0. Os conteúdos foram gentilmente homogeneizados e deixados em repouso por 0, 1, 2, 6, 10 e 24 horas a 4°C. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada tempo e cada pH e realizada uma diluição seriada para posterior plaqueamento e titulação. O experimento foi realizado em triplicata e para avaliar a diferença significativa dos títulos (UFP/mL) em função do pH e do tempo foram realizados testes estatísticos, os quais estão descritos no item 6.

5.12.2 Estabilidade dos fagos sob diferentes temperaturas

Alíquotas de 1 mL dos fagos armazenados em tampão SM (pH = 7,0) foram mantidas nas temperaturas de 20°C, 30°C e 40 °C por 24, 48 e 72 horas. Após esse período, 100 µL de cada amostra em cada temperatura foi diluída em tampão SM para posterior plaqueamento e titulação. O experimento foi realizado em triplicata e o controle se deu a partir da titulação dos fagos mantidos em estoque a 4°C. Para avaliar a significância da diminuição dos títulos (UFP/mL) em função da temperatura e do tempo foram realizados os testes estatísticos descritos no item 6.

5.12.3 Estabilidade dos fagos frente a exposição à luz UV-A

Alíquotas de 1 mL dos fagos armazenados em tampão SM (pH = 7,0) foram submetidas a exposição sob luz UV-A utilizando-se uma lanterna de emissão de radiação UV-A 365nm onda longa (BOIT-LUV01) acoplada a uma caixa sem interferência de luminosidade externa. As alíquotas foram colocadas a uma distância de 25 cm da fonte de luz e deixadas pelos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 e 180 minutos (Umrao *et al.,* 2021). Posteriormente, foram retirados 100 µL de cada amostra e realizada uma diluição seriada para posterior titulação. O experimento foi realizado

em triplicata e os controles se deram a partir da titulação dos fagos mantidos em temperatura ambiente, mas sem exposição à luz pelo mesmo período do teste. Para avaliar a significância da diminuição dos títulos dos fagos em relação ao controle (UFP/mL), foram realizados os testes estatísticos descritos no item 6.

5.12.4 Estabilidade do fago B3 ao longo do tempo de estocagem

Foram realizados testes de estabilidade do fago B3 em tampão SM (pH= 7,0) e em meio mineral Bushnell Haas Broth (pH= 7,0) ao longo do tempo. Logo, alíquotas de partículas virais preservadas a 4°C em ambas as soluções foram utilizadas para realização da titulação (UFP/mL) do fago através da técnica de spot utilizando sua bactéria hospedeira *Ralstonia solanacearum* (RS705). O procedimento foi repetido a cada 30 dias em um período de 6 meses e o experimento foi realizado em triplicata. Para avaliar a significância dos fatores de variação (UFP/mL x tempo) na viabilidade dos fagos, os resultados foram submetidos aos testes estatísticos descritos no item 6.

5.13 Avaliação da atividade bacteriolítica *in vivo*

5.13.1 Teste de desenvolvimento da doença *in vivo* associada ao patógeno RS705

Sementes de tomate das variedades “caqui” e “grape” foram plantadas em potes contendo 2/3 de solo arenoso e 1/3 de solo rico em matéria orgânica. Após 21 dias, as mudas ao serem replantadas (3–5 folhas/plântula), tiveram os caules na região próxima às raízes gentilmente arranhados com a ponta fina de uma agulha estéril (0,25 mm) e em seguida, suas raízes mergulhadas em 2 mL de suspensão celular de RS705 em D. O 600nm= 0,5, cerca de 2,0 x 10^8 UFC/mL, facilitando a penetração do patógeno na inoculação artificial. O experimento foi realizado em triplicata e contou com os controles negativos (sem a doença) para ambas as variedades. Após o aparecimento dos sintomas e posterior morte das plantas, foi adotada a mesma metodologia do item 5.3.2 para isolar bactérias com as mesmas características macromorfológicas do patógeno *Ralstonia solanacearum* (RS705), etapa importante para validar o modelo da doença *in vivo*. O DNA das colônias isoladas foi extraído visando a confirmação do patógeno pela realização de reação de PCR para amplificação do marcador filogenético RNAr 16S utilizando a mesma metodologia do item 5.5.2.

5.13.2 Avaliação do fago B3 contra *Ralstonia solanacearum* (RS705)

Para o teste da atividade bacteriolítica do fago *in vivo,* sementes de tomate do tipo “grape” foram plantadas em potes contendo 2/3 de solo arenoso e 1/3 de solo rico em matéria orgânica. Para isso, inicialmente foi realizada a tindalização do solo, caracterizado pelo tratamento a uma temperatura de 100°C por 1 hora, seguido de um resfriamento a 4°C e repetição desse processo por três vezes. Passados 21 dias após a germinação das sementes, mudas contendo 6-7 folhas, foram transferidas para potes plásticos (500 mL), sendo usadas 3 plantas por vaso. No momento do plantio, as mudas tiveram os caules gentilmente arranhados com a ponta fina de uma agulha estéril (0,25 mm). Posteriormente, 2 mL de suspensão celular de RS705 (D.O 600nm= 0,5) contendo cerca de 2,0 x 10^8 UFC/mL foram inoculados na superfície do solo próximo às raízes de cada plântula. Em seguida, inoculou-se 20 mL do fago B3 (2,0 x 10^8 UFC/mL) nessa mesma região, configurando uma MOI= 10 (Adaptado de Umrao *et al.,* 2021). O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 8 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos consistiram em: um controle positivo, em que houve a infecção com RS705, mas não se inoculou o fago B3 (CB), um controle em que se inoculou apenas o fago B3 (CF) e um controle negativo em que não houve inoculação nem da bactéria nem do fago (SS); inoculação do fago B3 três dias antes da infecção com RS705 (B1F3); inoculação do fago B3 no mesmo momento da infecção com RS705 (B1F0); inoculação do fago B3 três dias após a infecção com RS705 (B1FA); inoculação do fago B3 no mesmo momento da infecção com RS705 e outra aplicação do fago três dias depois (B1F0D3); e por último, inoculação do fago B3 no mesmo momento da infecção com RS705 e mais duas aplicações do fago, sendo a primeira três dias depois e a segunda oito dias depois (B1F0D8).

5.13.3 Avaliação da progressão da doença

A progressão da murcha bacteriana nas plantas foi avaliada em dois parâmetros. Primeiramente foi calculado o número de folhas murchas de cada réplica de cada tratamento ao longo dos dias (MAGAR *et al.,* 2022). Para isso foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\mathbf{PD = M/TF \times 100\%}$$

PD = progressão da doença
M = número de folhas murchas em todas as plantas (quadruplicata) por tratamento
TF = número total de folhas em todas as plantas (quadruplicata) por tratamento

Após a morte das plantas do controle positivo para doença (CB), também foi calculado a densidade de células bacterianas remanescentes de *Ralstonia solanacearum* (RS705) tanto no solo, quanto no caule das plantas sintomáticas. Para a análise quantitativa da variável no solo, o solo de cada repetição de cada tratamento foi homogeneizado e retirados 30 gramas, os quais foram homogeneizados em 30 mL de tampão (¼) Ringer a 90 rpm e 30°C por 1 hora. Após esse período, uma alíquota de 100 µL foi retirada para realização das diluições seriadas, sendo que posteriormente, 100 µL de cada diluição foram utilizados para a realização da técnica de “spread plate” sob placas contendo meio sólido CPG visando a determinação da densidade de bactérias (UFC/mL). Já para análise da persistência de RS705 na parte aérea das plantas, três caules de cada tratamento com cerca de 4 gramas foram previamente desinfectados com água e sabão em água corrente. Em seguida, fragmentos do interior do caule com cerca de 1 cm foram cortados e macerados junto a 3 gramas de areia lavada em placa de porcelana e então adicionados de 9 mL de tampão (¼) Ringer sob condições assépticas. A partir desse conteúdo, foram retirados 100 µL e realizada diluição seriada. Para a contagem de células (UFC/mL) também foi utilizada a técnica de “spread plate” sob placas contendo meio sólido CPG. Ambos os experimentos foram realizados em triplicata (Adaptado de MAGAR *et al.,* 2022). Para avaliar a significância da diminuição de UFC/mL em relação ao controle “CB”, os resultados foram submetidos aos testes estatísticos descritos no item 6.

5.13.4 Análise quantitativa da persistência do fago B3 após os tratamentos

Para essa análise, utilizou-se extratos brutos dos solos (20 mL) e caules (5 mL) produzidos na etapa anterior, centrifugados e filtrados em membrana PVDF com 0,22 µm de tamanho de poro (Millipore, Darmstadt, Alemanha). A partir de cada filtrado, foram realizadas diluições seriadas e em seguida, utilizada a técnica de “spot” para a detecção e quantificação do fago B3 remanescente nas plantas. O experimento foi realizado em triplicata (Adaptado de MAGAR *et al.,* 2022). Para avaliar a diferença

significativa dos títulos dos fagos em relação ao controle “CF”, os resultados foram submetidos a análise estatística descrita no item 6.

6. Análises estatísticas

Os resultados dos testes de estabilidade (pH, temperatura, luz-UV e tempo de estocagem) foram analisados por métodos estatísticos no intuito de avaliar a diferença significativa nos títulos dos fagos (UFP/mL) em resposta a esses fatores de variação. Foram utilizados os testes Two-way e One-way ANOVA e realizado o teste de comparações de média de Tukey ($p \leq 0,05$). Já nos testes *in vivo* para avaliar a progressão da doença pelo murchamento foliar, os resultados foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Levene). Como os dados não atenderam os pressupostos de distribuição normal, os mesmos foram submetidos ao teste não paramétrico de Friedman para verificar se houve efeito dos tratamentos e o teste post-hoc de Dunn para avaliar quais tratamentos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p \leq 0,05$). Para a análise quantitativa da persistência do fago B3 após os tratamentos, utilizou-se o teste One-way ANOVA e o teste de comparação de médias de Tukey ($p \leq 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism v.8 (GraphPad Prism, versão 8.0 San Diego, CA, EUA).

7 RESULTADOS

7.1 Obtenção e identificação das bactérias isoladas da folha, caule e solo rizosférico

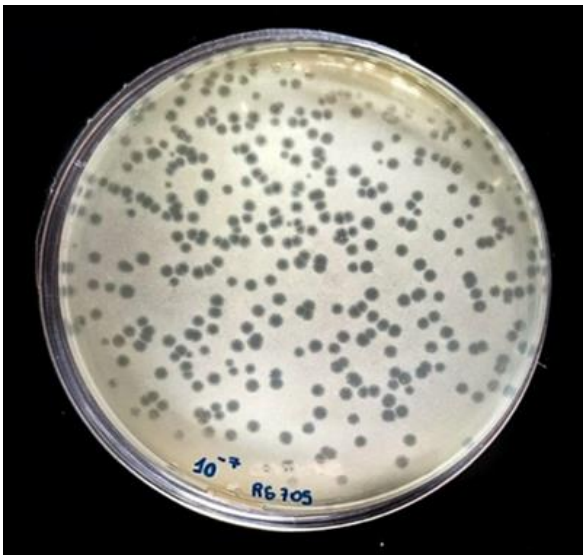
Foram isolados 5 morfotipos das folhas sintomáticas para mancha bacteriana (IS1FMA a IS5FMA), 4 morfotipos dos caules de plantas sintomáticas para murcha (IS1CMU a IS3CMU) e 10 morfotipos do solo rizosférico de plantas sintomáticas para murcha (BAC1 a BAC10). Em termos de macromorfologia, todos os isolados das folhas e dos caules apresentaram colônias de aspecto similar a dos patógenos de interesse (*Xanthomonas sp*. e *Ralstonia sp.*). Já os isolados do solo rizosférico apresentaram morfologias variadas, sendo que apenas as colônias dos isolados BAC 4 e BAC 9 se aproximaram do aspecto fluido e esbranquiçado que são características de *Ralstonia sp.* Todos os morfotipos isolados foram purificados e integrados no estudo com a finalidade de não apenas se obter fitopatógenos hospedeiros causadores da murcha e mancha bacteriana, mas também de bactérias residentes do mesmo ambiente, para que mais tarde, pudessem ser utilizadas no teste de espectro de hospedeiros dos fagos. O uso da técnica de Maldi-TOF Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI (Bruker, Alemanha) possibilitou a identificação como altamente provável ao nível de espécie dos isolados *Xanthomonas perforans* DSM 18975T (IS3FMA) e *Pseudomonas putida* ATCC 49128 THL (IS3CMU) e de 4 isolados no nível de gênero (*Pseudomonas sp.* IS1FMA, *Pseudomonas sp.* IS5FMA, *Ralstonia sp.* IS1CMU e *Ralstonia sp.* IS1.1CMU. Aqueles que não apresentaram classificação segura do gênero foram juntamente com os outros 10 isolados do solo (BAC1 a BAC10) submetidos ao sequenciamento da região do gene RNAr 16S, ainda em andamento.

7.2 Isolamento de bacteriófagos

No isolamento para recuperação de fagos, foram detectadas duas placas de lise com macromorfologias distintas junto a sobrecamada contendo a bactéria *Ralstonia solanacearum* (RS705) e quatro placas de lise com diferentes características na sobrecamada composta pela bactéria *Xanthomonas perforans* DSM 18975T (IS3FMA). No caso dos fagos isolados de RS705, foi observado que durante o processo de purificação, as placas de lise convergiram para uma única morfologia mantendo uniformidade em sua característica a partir da 3° passagem de reinfecção.

Tal placa de lise foi caracterizada como grande, regular e com um halo opaco circundando seu interior translúcido sendo o fago nomeado como “B3” (FIGURA 5). Já no caso das placas de lise observadas para IS3FMA, as diferenças macromorfológicas se mantiveram até o final da sexta passagem de purificação sendo os bacteriófagos nomeados e caracterizados como: “X1”, o qual apresentou placas de lise grandes, com bordas levemente irregulares e translúcidas, “X2” com placas de lise pequenas, com bordas regulares e opaca, “X3” com placas pequenas, bordas irregulares e opaca e “X4” sendo grandes, com bordas bastante irregulares e opaca (FIGURA 6).

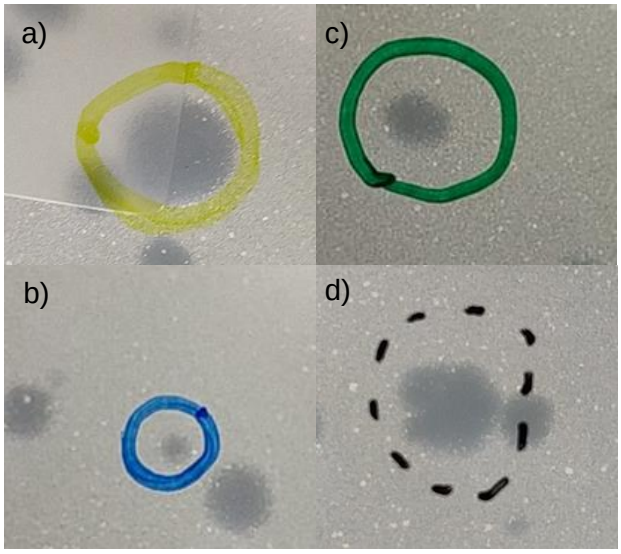
Figura 5 - Placa de Petri com o cultivo bacteriano de RS705 juntamente com seu fago hospedeiro “B3”



Legenda: As placas de lise geradas pelos vírus são identificadas pelas áreas claras, livres de multiplicação bacteriana.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Morfologia das diferentes placas de lise dos fagos hospedeiros de IS3FMA.



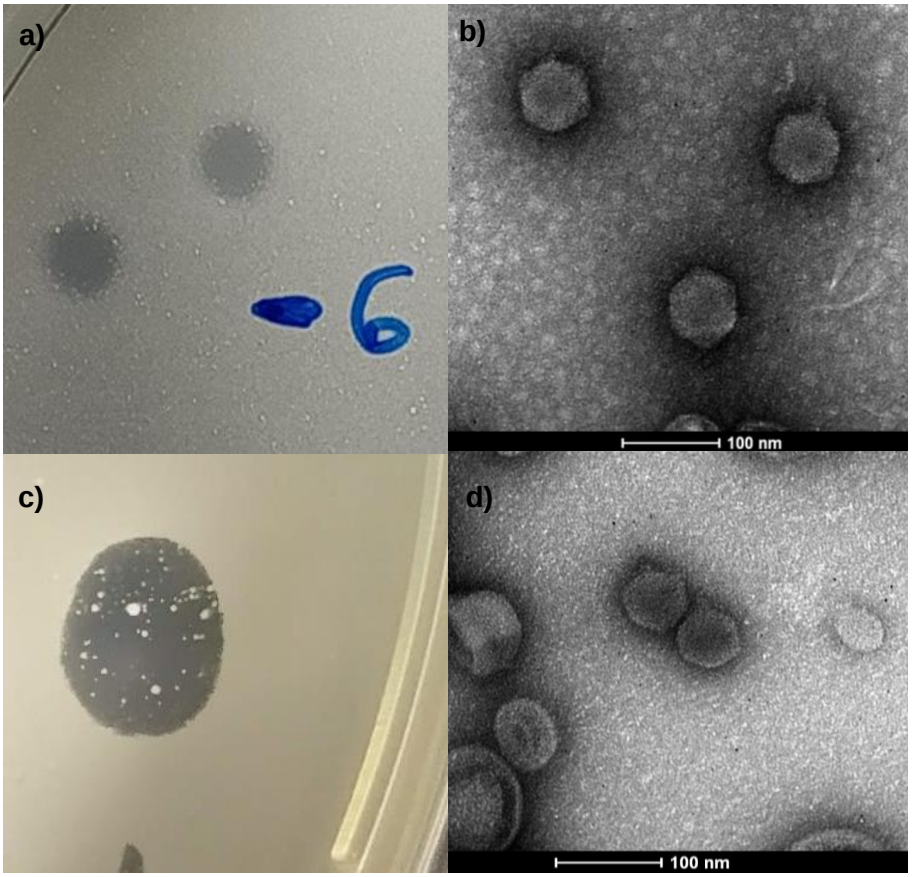
Legenda: a) Fago “X1” apresentando placas de lise grandes com bordas levemente irregulares e translúcidas; b) fago “X2” apresentando placas de lise pequenas, com bordas regulares e opaca; c) fago “X3” apresentando placas pequenas, bordas irregulares e opaca; d) fago “X4”com placas de lise grandes, com bordas bastante irregulares e opaca.

FONTE: Elaborado pelo autor.

7.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise por MET das suspensões de bacteriófagos permitiu o enquadramento preditivo das partículas nas classes que mais se aproximaram da morfologia visualizada, sujeitos ainda, à caracterização genômica. Os fagos X1, X2, X3 e X4 de *X. perforans* apresentaram um único padrão de morfologia. O fago B3 apresenta capsídeo icosaédrico de aproximadamente 60 ± 5 nm de diâmetro e uma cauda curta com 15 ± 0,2 nm de comprimento (FIGURA 7-b). Já o fago X1, apresenta capsídeo icosaédrico de aproximadamente 45 ± 5 nm de diâmetro e uma cauda curta com 9 ± 0,2 nm de comprimento (FIGURA 7-d). Essas características os enquadram pela taxonomia antiga na ordem *Caudovirales* e família *Podoviridae* e pela taxonomia mais recente (ICTV, 2022) na classe *Caudoviricetes* (KRUPOVIC *et al.,* 2021).

Figura 7 - a) Macromorfologia da placa de lise do fago B3 sendo caracterizadas como grandes, regulares e com um halo opaco circundando seu interior translúcido. b) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do fago B3. Observe as três partículas virais caudas curtas. c) Macromorfologia da placa de lise do fago X1 sendo caracterizada como grande, com bordas levemente irregulares e translúcida. d) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do fago X1. Observe as duas partículas virais no centro da imagem caracterizadas por um capsídeo icosaédrico e caudas curtas.



.

FONTE: Micrografia: Autor.

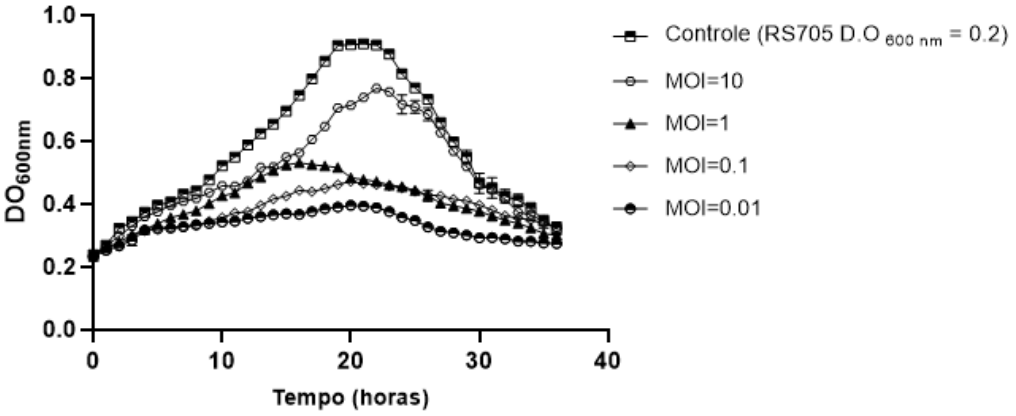
7.4 Caracterização molecular

Após o tratamento com as enzimas RNAse A e DNAse I e extração do material genético dos fagos B3 e X1, seus rendimentos foram mensurados em Nanodrop (Lite da Thermo Scientific) resultando em 1075,4 ng/µL e 1009,0 ng/µL, respectivamente. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior sequenciamento e identificação (etapa em andamento).

7.5 Avaliação da atividade bacteriolítica por diferentes multiplicidades de infecção (MOI'S)

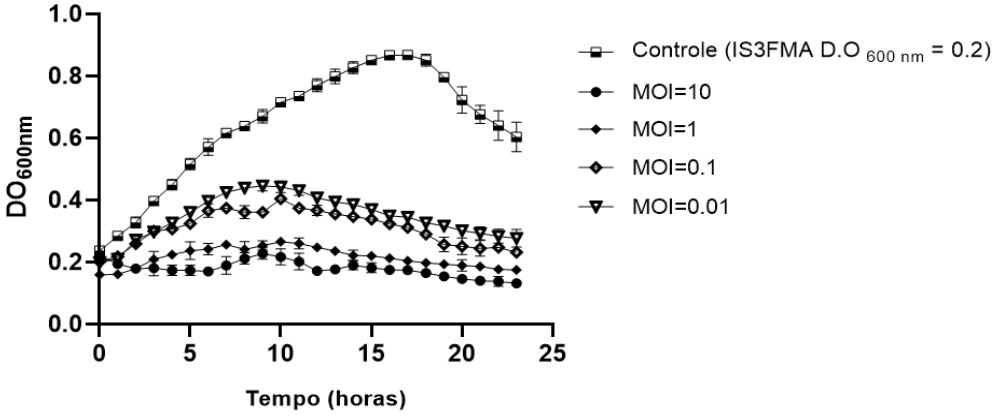
Os efeitos da inoculação dos fagos, em diferentes multiplicidades de infecção (MOI's), nas densidades das bactérias RS705 e IS3FMA, em cultivos de até 36 h em placas de poliestireno de 96 poços, estão apresentados nas figuras 8 e 9. Foram observadas reduções nas densidades ao longo das curvas de crescimento em todas as combinações testadas. Para o fago B3, a MOI de 0,01 foi a que resultou em maior inibição do crescimento da bactéria RS705, com redução máxima da D.O. a 600 nm de 56,66% em relação ao controle após 21 horas de ensaio (FIGURA 8). Um efeito contrário foi observado para o fago X1, que foi mais eficaz na redução da D.O.600 nm de IS3FMA na infecção com a MOI= 10, resultando em redução máxima da D.O 600 nm de 79,93% em relação ao controle após 18 horas de ensaio (FIGURA 9).

Figura 8 - Gráfico apresentando as curvas de crescimento (D.O 600 nm) da bactéria hospedeira RS705 associada a diferentes concentrações dos fagos resultando em diferentes multiplicidades de infecção (MOI's).



FONTE: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Gráfico apresentando as curvas de crescimento (D.O 600 nm) da bactéria hospedeira IS3FMA associada a diferentes concentrações dos fagos resultando em diferentes multiplicidades de infecção (MOI's).

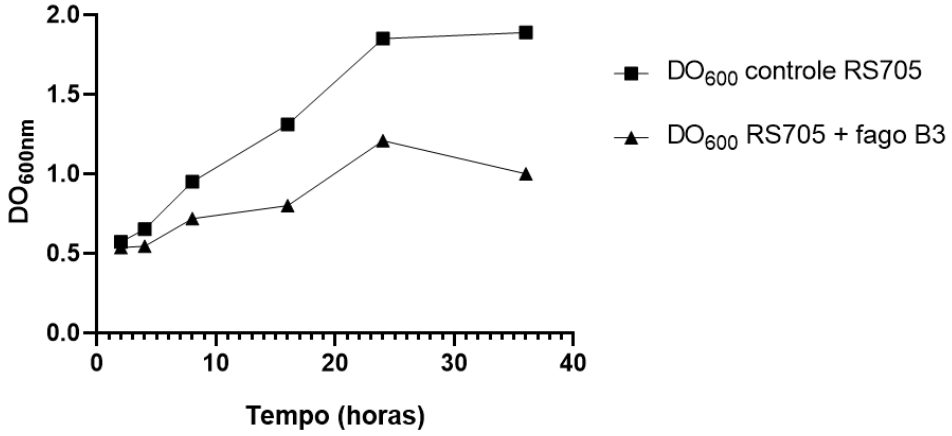


FONTE: Elaborado pelo autor.

7.6 Avaliação da atividade bacteriolítica contra células planctônicas

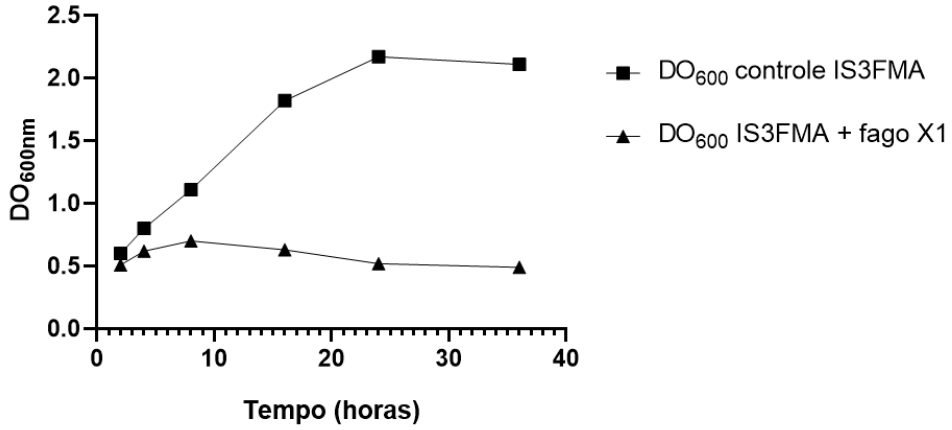
Nos ensaios de análise da atividade bacteriolítica dos fagos em uma escala maior, foram realizados cultivos em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo de 200 mL de meio líquido (CPG ou Caldo Nutriente) junto as bactérias hospedeiras e seus respectivos fagos. Foi observado que as alterações na curva de crescimento e nos percentuais de inibição do crescimento das bactérias hospedeiras se mantiveram de acordo com os ensaios em microplacas (item 7.5). No teste de atividade bacteriolítica do fago B3 contra a bactéria hospedeira RS705, a redução máxima de crescimento (D.O 600 nm) observada ocorreu após 36 horas de cultivo e foi de 49,23% (FIGURA 10). Já nos ensaios com a bactéria hospedeira IS3FMA, o tratamento IS3FMA + fago X1 apresentou uma redução máxima de 76,2% quando comparada ao controle após 24 horas de cultivo (FIGURA 11).

Figura 10 - Gráfico da curva da atividade bacteriolítica do fago B3 em meio CPG líquido avaliada por meio de comparações entre as densidades ópticas (D.O 600 nm) do controle (apenas bactéria) e da bactéria junto ao fago em uma MOI final de 0,01.



FONTE: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Gráfico da curva da atividade bacteriolítica do fago X1 em Caldo Nutriente (HiMedia, EUA) avaliada por meio de comparações entre as densidades ópticas (D.O 600 nm) do controle (apenas bactéria) e da bactéria junto ao fago X1 em uma MOI final de 10.



FONTE: Elaborado pelo autor.

7.7 Espectro de hospedeiros

O fago B3 foi efetivo apenas contra as espécies do Complexo *Ralstonia sp.*, uma vez que nenhum outro gênero apresentou qualquer tipo de sensibilidade ao fago. Logo, através da técnica de “spot”, as espécies bacterianas que apresentaram placas de lise em sua sobrecamada foram: IS1CMU (*Ralstonia sp*.); IS1.1CMU; (*Ralstonia sp*.); RS639 (*Ralstonia pseudosolanacearum*); RS672 (*Ralstonia*

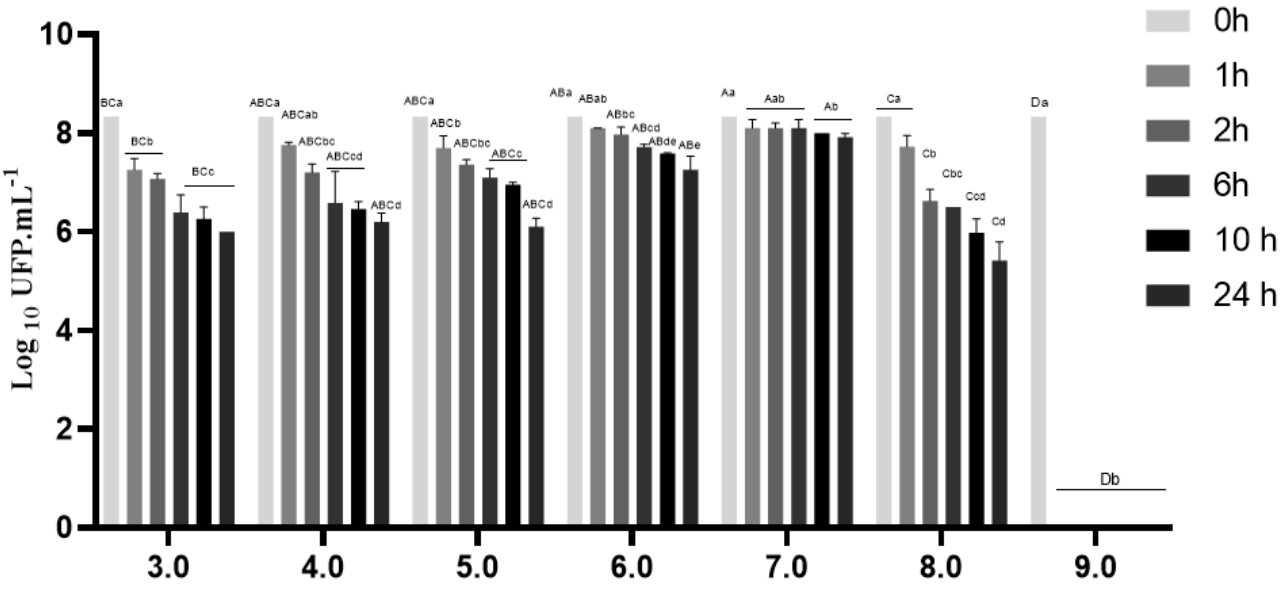
pseudosolanacearum) e RS683 (*Ralstonia solanacearum*). Já o fago X1 apresentou atividade lítica somente contra *Xanthomonas perforans* DSM 18975T (IS3FMA) (IS3FMA), espécie usada como hospedeira na etapa de isolamento dos fagos. As tabelas completas dos resultados se encontram no anexo B.

7.8 Testes de estabilidade

7.8.1 Estabilidade dos fagos em diferentes valores de pH

Os fagos foram testados quanto sua estabilidade frente a ampla faixa de pH, com valores variando entre o pH 3,0 (valor mais ácido) e 9,0 (valor mais básico). Para verificar o efeito da interação dos fatores pH e tempo nos títulos dos fagos, foi realizada uma análise ANOVA two-way. Tanto para o fago B3 quanto para o fago X1, a interação dos dois fatores foi significativa ($p \leq 0,05$) e está representada pelas letras maiúsculas. Em seguida, foi realizada uma análise de comparações múltiplas pelo teste de Tukey para verificar o efeito no título dos fagos pela exposição ao longo do tempo, dentro de cada faixa de pH analisada (representado pelas letras minúsculas). Com relação ao fago B3 foi possível observar que houve redução significativa do título ($p \leq 0,05$) nos valores de pH 8,0 e 9,0 sendo que nesse último, o fago já não apresentou viabilidade a partir da primeira hora de exposição. A variação do pH de 6,0 para 7,0 não afetou significativamente o título do fago e nesses valores de pH, foram observados os maiores títulos comparativamente com os outros valores de pH analisados. O que provocou redução significativa no título do fago B3 foi a exposição ao longo do tempo em cada um desses valores de pH, analisados independentemente. A exposição ao pH 6 por 2, 6, 10 e 24 horas, afetaram negativamente o título do fago quando comparados com 0h de exposição. Já no pH 7,0, o título do fago apresentou diminuição significativa quando exposto por tempo maior que 10h, comparativamente com o 0h de exposição (FIGURA 12). Do tempo zero até o final das 24 horas de exposição, as reduções das unidades formadoras de placas de lise por mililitro (UFP/mL) em cada faixa de pH foram as seguintes: 26,71% (pH= 3,0); 24,09% (pH= 4,0); 23,91% (pH= 5,0); 13,25% (pH= 6,0); 6,02% (pH= 7,0), 33,73% (pH=8,0) e 100% (pH=9,0) (FIGURA 12).

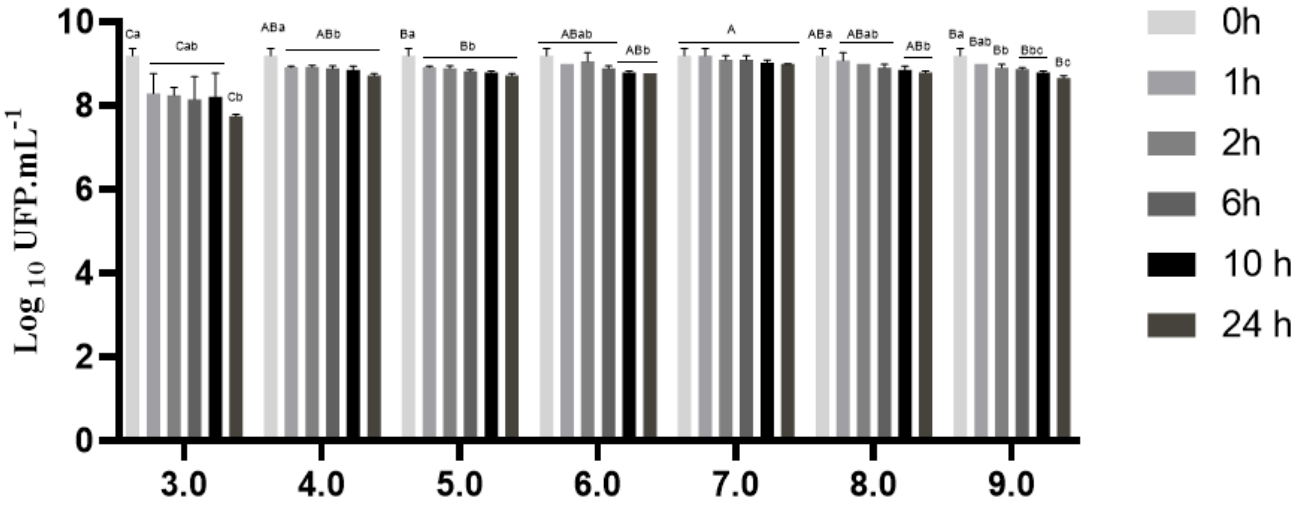
Figura 12 - Estabilidade do fago B3 frente a variações de pH entre 3,0 e 9,0 ao longo do tempo mantido a 4°C em tampão SM. Foi realizada a análise ANOVA Two-way por comparações múltiplas usando o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



FONTE: Elaborado pelo autor.

Já com relação ao fago X1, o mesmo manteve estabilidade em todas as faixas de pH (3,0 a 9,0) sendo possível observar a maior redução significativa do título ($p \leq 0,05$) quando exposto ao pH 3,0. O maior título foi observado no pH 7,0. Interessantemente, a exposição ao longo do tempo nesse pH, não afetou o título do fago X1. Do tempo zero até o final das 24 horas de exposição, as reduções das unidades formadoras de placas de lise por mililitro (UFP/mL) em cada faixa de pH foram as seguintes: 17,2% (pH= 3,0); 6,55% (pH= 4,0); 6,43% (pH= 5,0); 5,19% (pH= 6,0); 4,58% (pH= 7,0); 5,02% (pH=8,0) e 5,44% (pH=9,0) (FIGURA 13). As análises estatísticas encontram-se disponíveis nas tabelas 7 e 8 (ANEXO C).

Figura 13 - Estabilidade do fago X1 frente a variações de pH entre 3,0 e 9,0 ao longo do tempo mantido a 4°C em tampão SM. Foi realizada a análise ANOVA Two-way por comparações múltiplas usando o teste de Tukey. ($p \leq 0,05$).

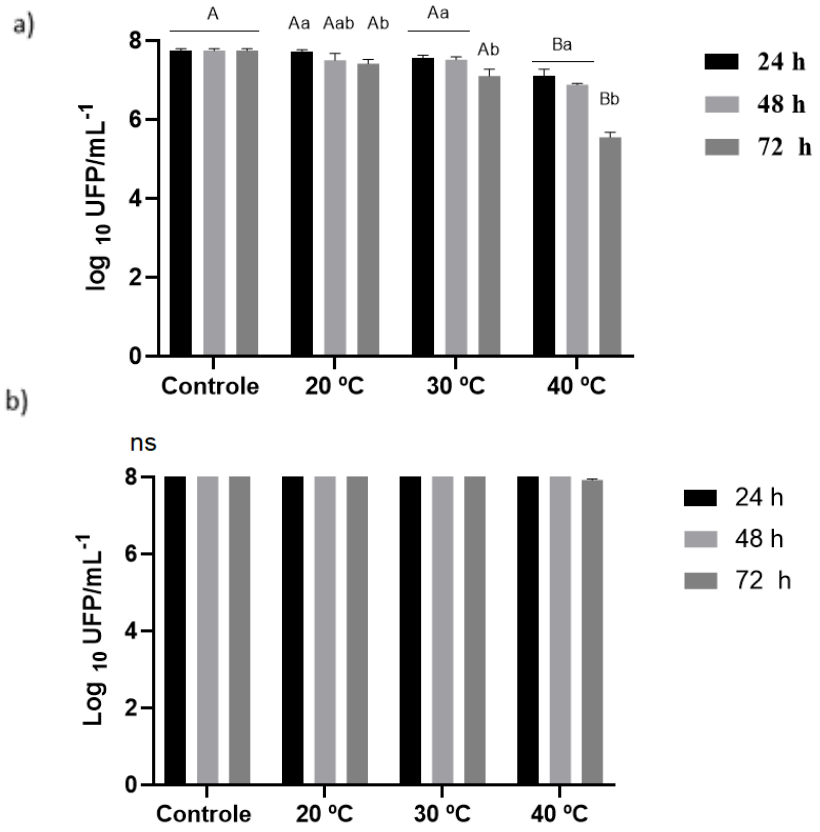


FONTE: Elaborado pelo autor.

7.8.2 Estabilidade dos fagos sob diferentes temperaturas

Para a verificação da estabilidade das partículas virais frente a diferentes temperaturas, testou-se a viabilidade dos fagos B3 e X1 a 20°C, 30°C e 40°C nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Semelhante às comparações em diferentes valores de pH, o efeito da interação dos fatores temperatura e tempo nos títulos dos fagos foi verificado pela análise ANOVA two-way. Para o fago B3, a interação entre os dois fatores foi significativa ($p \leq 0,05$, representado pelas letras maiúsculas). Assim, foi realizada em seguida, análise de comparações múltiplas pelo teste de Tukey para verificar o efeito no título dos fagos pela exposição ao longo do tempo, dentro de cada temperatura analisada (representado pelas letras minúsculas). Com relação ao fago B3, foi possível observar diminuição significativa ($p \leq 0,05$) sobre o título (UFP/mL) apenas na temperatura de 40°C quando comparado ao controle, no qual o fago era mantido a 4°C. Nessa temperatura, na exposição por 24 e 48 horas não foram observadas diferenças significativas no título do fago, sendo que a exposição por 72 horas culminou em uma diminuição no título (FIGURA 14-a). Entre o controle e o final do período de exposição (72h) a 40°C, houve uma queda percentual de 25,53% no título do fago (FIGURA 14-a). No caso do fago X1, não foi observado nenhum efeito significativo ($p \leq 0,05$) sobre o título pela interação dos fatores temperatura e tempo (FIGURA 14-b). As análises estatísticas encontram-se disponíveis nas tabelas 9 e 10 (ANEXO C).

Figura 14 - Estabilidade dos fagos B3 (a) e X1 (b) frente a variações de temperatura (20°C a 40°C) ao longo de 72 horas. Foi realizada a análise ANOVA Two-way por comparações múltiplas usando o teste de Tukey. ($p \leq 0,05$). O termo “ns” indica que não foi observado

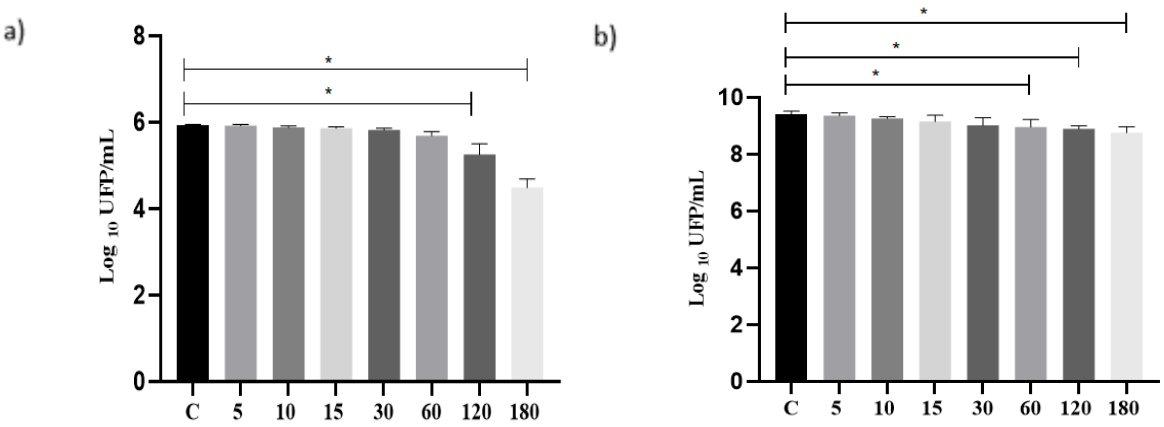


FONTE: Elaborado pelo autor.

7.8.3 Estabilidade dos fagos frente a exposição à luz UV-A

Os fagos isolados também foram submetidos a irradiação por luz UV-A para verificação da estabilidade das partículas virais ao longo do tempo. Foi observado efeito negativo e significativo ($p \leq 0,05$) da exposição sobre o título (UFP/mL) do fago B3 entre o controle e o tempo de 120 minutos e entre o controle e 180 minutos de exposição (FIGURA 15-a). A máxima redução (UFP/mL) observada foi entre o controle e o maior tempo de exposição (21,73%). Já no caso do fago X1, o efeito negativo e significativo ($p \leq 0,05$) foi observado a partir de 60 minutos de exposição (FIGURA 15-b), mas as reduções foram bem menores, inferiores a 5,83%, sob as mesmas condições.

Figura 15 - Estabilidade dos fagos frente a exposição a luz UV-A.



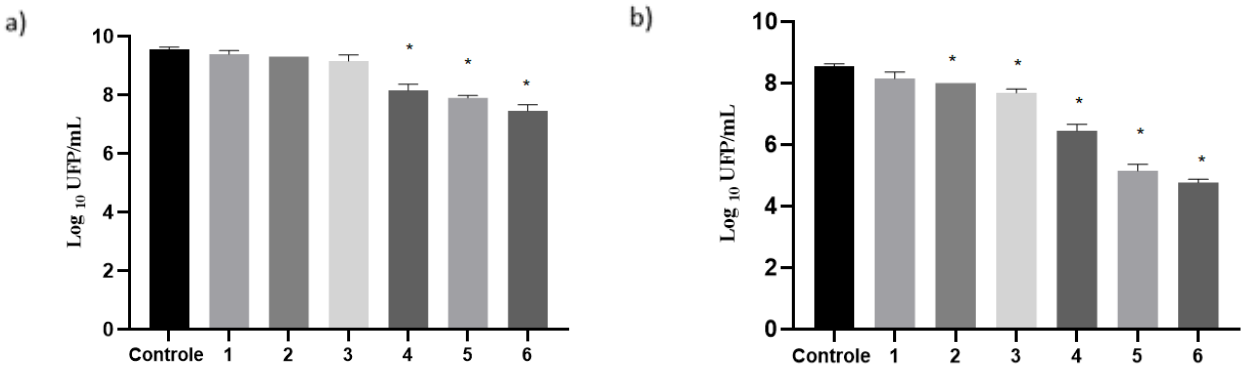
Legenda: a) Estabilidade do fago B3 frente a exposição a luz UV-A ao longo de 180 minutos. b) estabilidade do fago X1 frente a exposição a luz UV-A ao longo de 180 minutos. Foi utilizado o teste ANOVA One-way com p valor ($p \leq 0,05$) e o asterisco indica diferença significativa entre cada tempo comparado ao controle.

FONTE: Elaborado pelo autor.

7.8.4 Estabilidade do fago B3 ao longo do tempo de estocagem

Os títulos de extratos de fagos em tampão SM e meio líquido BHB (Bushnell Haas Broth, HiMedia, PA, USA.) estocados a temperatura de 4°C por um período de até 6 meses estão apresentados na figura 21. Em tampão SM, houve um efeito negativo e significativo ($p \leq 0,05$) entre o título inicial do fago (controle) e o título mensurado nos tempos de estocagens igual e superior a 4 meses. Ao final de 6 meses, o título (UFP/mL) caiu 19,62% em relação ao título inicial (FIGURA 16-a). Já quando o fago B3 foi mantido em meio BHB, foi observada uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) de UFP/mL já no 2° mês de estocagem, atingindo redução de 39,72% em relação ao controle ao final do 6° mês (FIGURA 16-b).

Figura 16 - a) Estabilidade do fago B3 mantido a 4°C em tampão SM ao longo de 6 meses. Os resultados relacionam o log10 UFP/mL com o tempo e o controle representa o título inicial dos fagos antes do período de estocagem. b) Estabilidade do fago B3 mantido a 4°C em meio mineral BHB ao longo de 6 meses. Os resultados relacionam o log_{10} UFP/mL com o tempo e o controle representa o título inicial dos fagos antes do período de estocagem. Em ambos os gráficos foi utilizado o teste ANOVA One-way e o asterisco indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre cada tempo quando comparado ao controle.



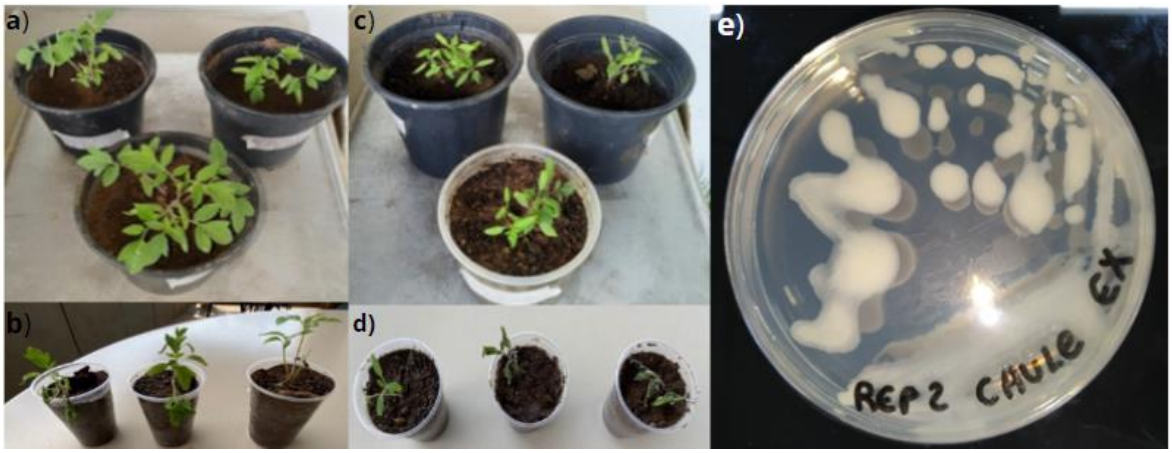
FONTE: Elaborado pelo autor.

7.9 Avaliação da atividade bacteriolítica *in vivo*

7.9.1 Teste de desenvolvimento da doença *in vivo* associada ao patógeno RS705

Nesses ensaios, mudas das duas variedades de tomateiros estudadas (“caqui” e “grape"), as quais foram infectadas com a linhagem RS705 no momento do replante (controle positivo), começaram a apresentar sintomas de murchamento das folhas no 5° dia após a inoculação (FIGURA 17-b,d). As plantas não infectadas (controle negativo) não apresentaram sintomas de murchamento (FIGURA 17-a,c). Após a morte das plantas infectadas, o patógeno foi reisolado dos caules das plantas utilizando a mesma metodologia descrita no item 5.3.2, no intuito de inferir que a doença foi causada pelo mesmo patógeno.

Figura 17 - Teste de susceptibilidade das duas variedades de tomateiros ao patógeno RS705.



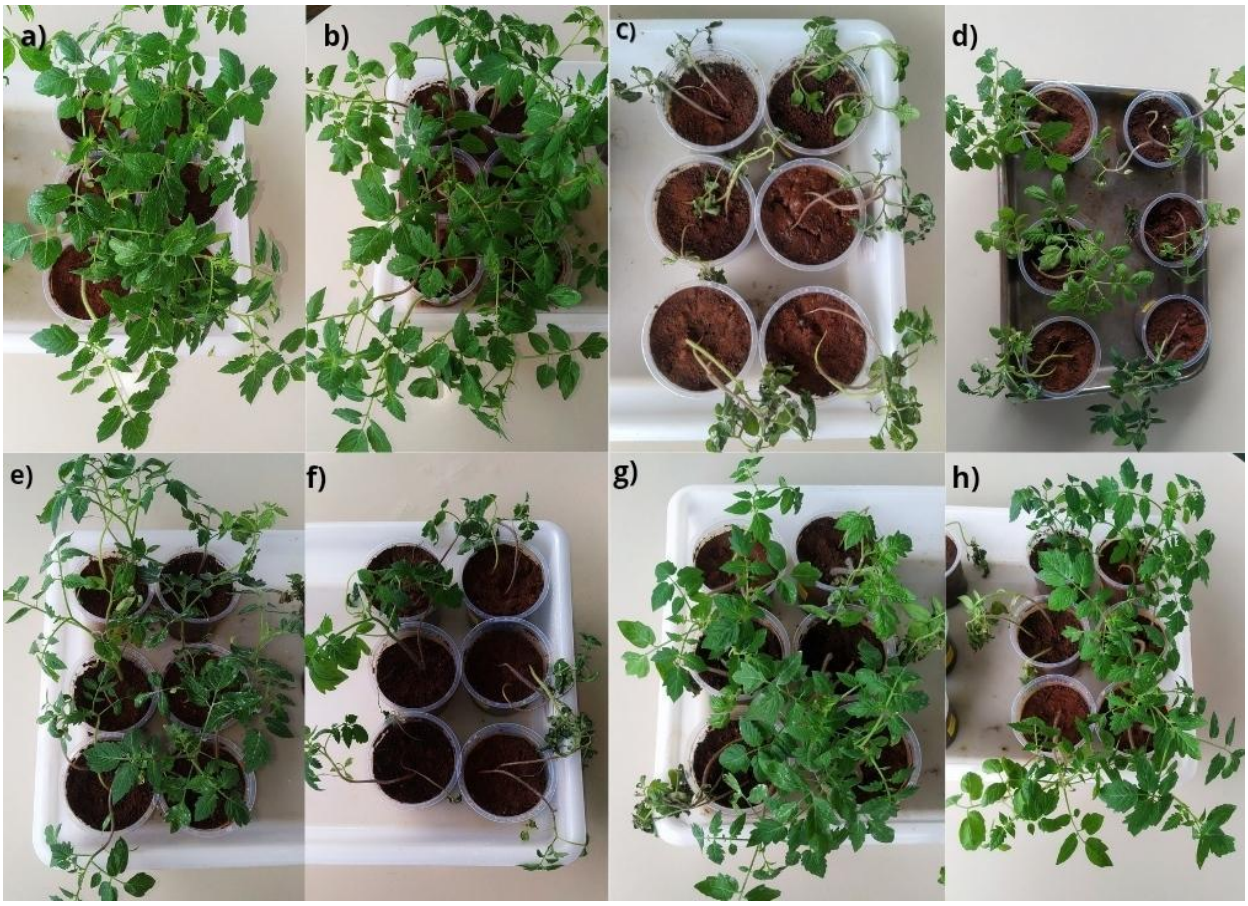
Legenda: a) Plantas do tomateiro da variedade do tipo “caqui” não infectadas com RS705 (controle negativo) b) plantas do tomateiro do tipo “caqui” infectadas com RS705 (controle positivo) c) plantas do tomateiro do tipo “grape” não infectadas com RS705 (controle negativo) d) plantas do tomateiro do tipo “grape” infectadas com RS705 (controle positivo) e) reisolamento do patógeno RS705 utilizando o meio CPG de Kado & Heskett (1970). Observe a macromorfologia típica da espécie apresentando colônias de aspecto liso, fluido e com bordas brancas após 48 horas de incubação.

FONTE: Elaborado pelo autor.

7.9.2 Avaliação da progressão da doença

A progressão da doença avaliada pela murcha de folhas nas plantas infectadas com o patógeno RS705, tratadas e não tratadas com o fago, até que se observasse a morte das plantas controle (CB) é apresentada na figura 18. Os primeiros sintomas da murcha bacteriana foram observados nos vasos controle após o 6° dia de inoculação. Por sua vez, o aparecimento de sintomas da doença nos tratamentos que receberam o fago B3 foi observado somente nos grupos B1F3 e B1FA a partir do 8° dia de inoculação. Nesses períodos, procedeu-se o cálculo e comparação das médias da porcentagem de folhas murchas (%) entre os tratamentos pelo teste não paramétrico de Friedman ($p \leq 0,05$). Foi observada uma diminuição significativa das folhas murchas entre o controle CB e os tratamentos B1F0, B1F0D3 e B1F0D8. Ao final do experimento, a porcentagem de folhas murchas em cada tratamento foi de: 100% (CB); 72,5% (B1F3); 60,29% (B1FA) e 24,35% (B1F0). Os controles SS (sem patógeno e sem fago) e CF (apenas fago), bem como os tratamentos B1F0D3 e B1F0D8 não apresentaram sintomas de murcha e folhas (FIGURA 19).

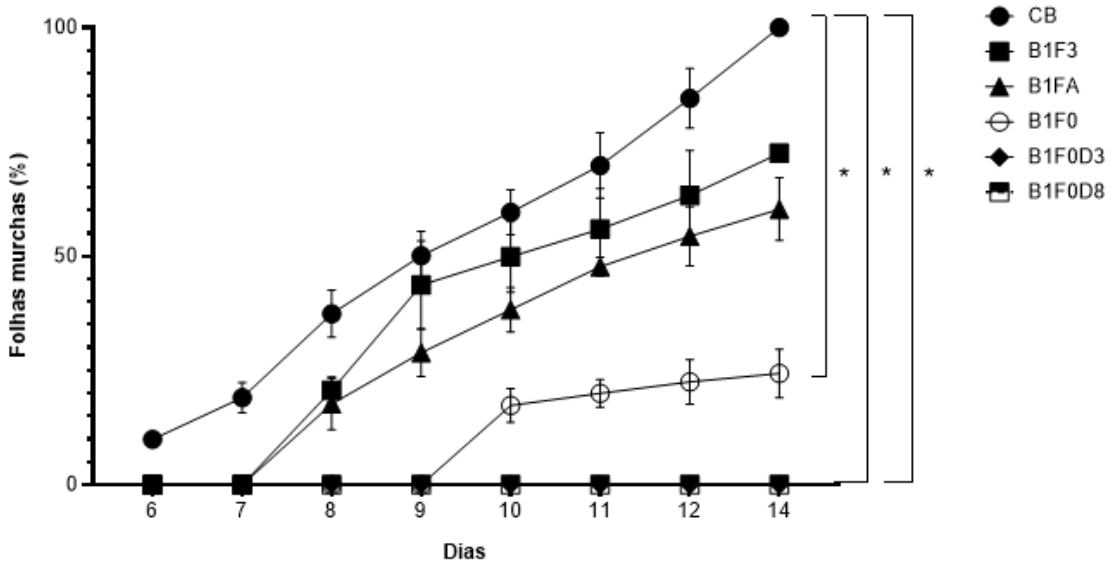
Figura 18 - Controles e tratamentos após 14 dias de experimento.



Legenda: a) “SS” é o controle negativo, no qual não foram inoculados nem a bactéria (RS705) nem o fago B3; b) “CF” é o controle no qual somente foi inoculado o fago B3; c) “CB” é o controle no qual somente foi inoculada a bactéria RS705; d) “B1FA”, no qual houve a inoculação do fago B3 três dias depois da infecção com RS705; e) “B1F0”, em que houve a inoculação do fago B3 no mesmo momento da infecção com RS705; f) “B1F3”, no qual houve a inoculação do fago B3 três dias antes da infecção com RS705; g) “B1F0D3” em que houve a inoculação do fago B3 no mesmo momento da infecção com RS705 e outra aplicação do fago três dias depois e h) “B1F0D8” em que houve a inoculação do fago B3 no mesmo momento da infecção com RS705 e mais duas aplicações, uma três dias depois e outra oito dias depois. Observe que todas as plantas do tratamento “CB” morreram após 14 dias e os grupos controle “SS” e “CF” mantiveram-se saudáveis.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Gráfico da porcentagem de folhas murchas de cada tratamento ao longo de 14 dias de experimento.

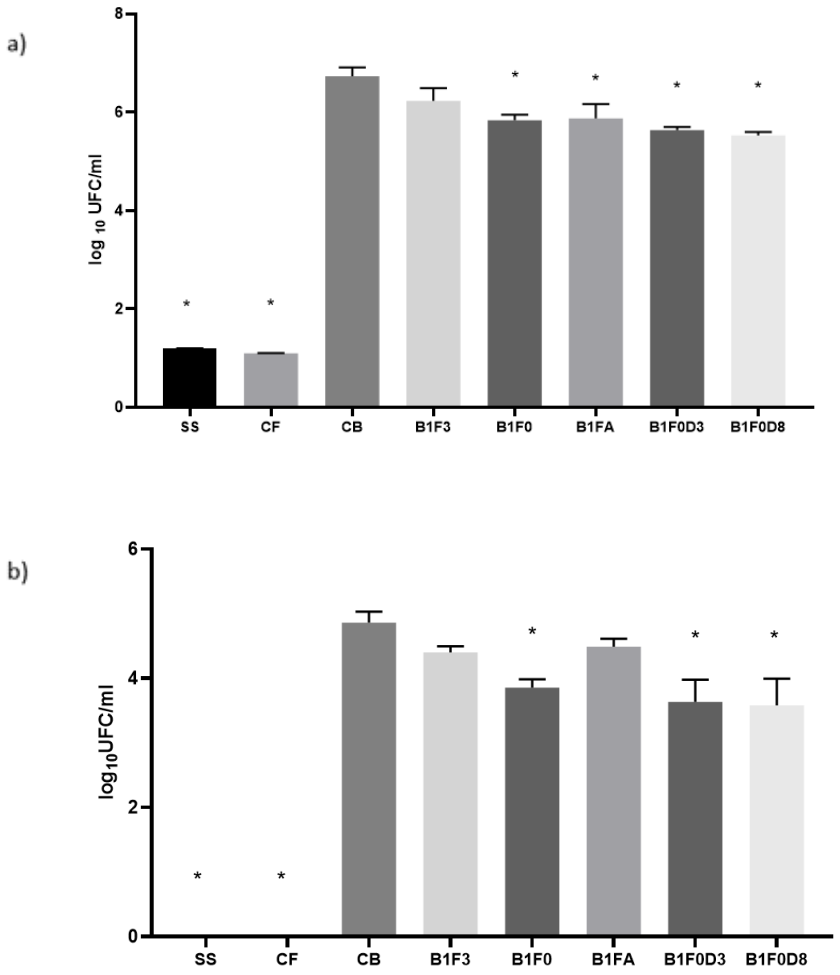


Legenda: Gráfico do murchamento de folhas (%) ao longo de 14 dias. Ao final do experimento, todas as folhas do controle CB murcharam (100%). Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre CB e os tratamentos B1F0, B1F0D3 e B1F0D8 sendo que os dois últimos não apresentaram murchamento em nenhuma das replicatas após 14 dias de experimento. Os controles SS e CF não foram incluídos na análise por não apresentarem nenhum grau de murchamento.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Além disso, avaliou-se a persistência do patógeno RS705 (UFC/mL) no solo e nos caules ao término do experimento. Na análise do solo, foi possível observar uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o controle CB e todos os tratamentos com exceção de B1F3. Foi possível constatar que dentre todos os tratamentos o maior valor quantitativo (UFC/mL) de RS705 foi encontrado em CB. A diferença do UFC/mL encontrado para CB perante aos outros tratamentos foi de: 6,69% (B1F3), 11,97% (B1F0), 11,86% (B1FA), 12,63% (B1F0D3) e 13,1% (B1F0D8). (FIGURA 20-a). Já na avaliação da persistência de RS705 nos caules, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre CB e os tratamentos B1F0, B1F0D3 e B1F0D8, enquanto que em B1F3 e B1FA não houve variação significativa ($p \leq 0,05$). Da mesma forma que no solo, o controle CB também apresentou o maior valor quantitativo (UFC/mL) de RS705, enquanto nos tratamentos B1F0D8 e B1F0D3 foram encontrados os menores valores. A diminuição entre o UFC/mL encontrado para CB para os tratamentos foi de 21,4% em B1F0; 22,77% para B1F0D8 e de 23,34% para B1F0D3 (FIGURA 20-b).

Figura 20 - a) Contagem (log_{10} UFP/mL) do patógeno RS705 no solo das plantas dos controles e de cada tratamento. b) Contagem (log_{10} UFP/mL) do patógeno RS705 no caule das plantas dos controles e também de cada tratamento. Em ambos foi utilizado o teste ANOVA One-way e o asterisco indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle CB.



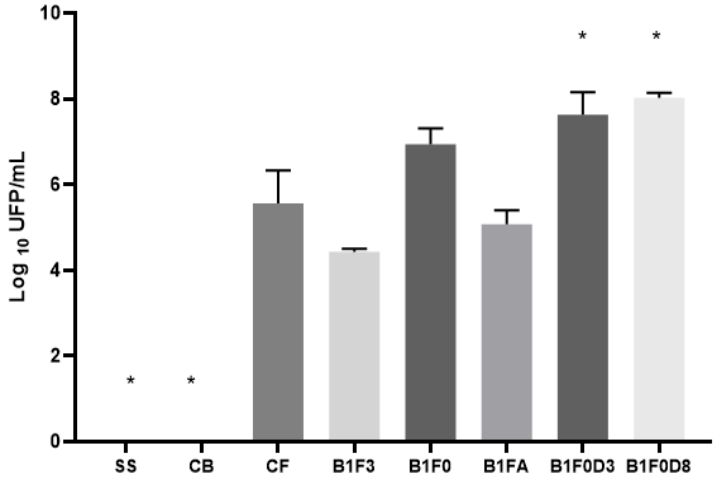
FONTE: Elaborado pelo autor.

7.9.3 Análise quantitativa da persistência do fago B3 após os tratamentos

Ao final dos 14 dias de experimento, também foi avaliada a persistência do fago B3 nos solos dos vasos, bem como se o mesmo poderia ser transportado pelos vasos condutores da planta e ser encontrado na parte aérea, mais especificamente nos caules. Em relação ao solo, não foram encontradas placas de lise nas amostras dos controles SS e CB, o que já era esperado, uma vez que tais tratamentos não receberam o fago B3. Contudo, foi possível detectar e quantificar B3 nas amostras de solos de todos os outros tratamentos. Não houve diferença significativa no título ($p \leq 0,05$) quando comparado o controle CF, o qual recebeu somente o fago B3 com

os tratamentos B1F3, B1F0 e B1FA, mas houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) do UFP/mL entre CF e os tratamentos SS, CB, B1F0D3 e B1F0D8. Nos tratamentos B1F0D3 e B1F0D8 foram encontrados valores de UFP/mL que foram 24,4% e 27,6% maiores respectivamente do que no controle CF. Já nos grupos B1F3 e B1FA, os valores encontrados foram menores do que em CF, apesar de não serem significativos (FIGURA 21). Não foram encontradas partículas virais nos caules de nenhum dos tratamentos.

Figura 21 -Avaliação da persistência do fago B3 no solo dos tratamentos após 14 dias. Foi utilizado o teste ANOVA One-way. O asterisco indica se houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) dos tratamentos em relação ao controle CF



FONTE: Elaborado pelo autor.

8 DISCUSSÃO

Os fagos do presente estudo, nomeados como B3 e X1 foram isolados utilizando como hospedeiros os fitopatógenos *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas perforans*, causadores da murcha e mancha bacteriana, respectivamente. No caso do Complexo de Espécies de *Ralstonia solanacearum,* vários bacteriófagos já foram isolados e caracterizados, sendo a maior parte pertencente a antiga ordem *Caudovirales* e famílias *Myoviridae, Inoviridae, Siphoviridae* e *Podoviridae,* todas distribuídas em novas famílias dentro da classe *Caudoviricetes* na classificação mais recente (TROTEREAU *et al.*, 2021). O fago B3 foi classificado como um podovírus, com base na sua morfologia vista pela microscopia eletrônica de transmissão (MET). Este pertencia a antiga família

Podoviridae e atualmente é classificado como membro da classe *Caudoviricetes.* Contudo, para a definição de sua família, análises moleculares ainda são necessárias, uma vez que somente pela simetria, tamanho do capsídeo e tamanho da cauda não é possível definir sua classificação em categorias taxonômicas inferiores. Já para *Xanthomonas sp.*, a maior parte dos fagos já caracterizados pertencem às antigas famílias *Myoviridae, Siphoviridae* e *Podoviridae* (Nazir *et al.*, 2021). Assim como o fago B3, o fago X1 é um podovírus, pertencente à antiga família *Podoviridae* e atualmente está dentro da classe *Caudoviricetes*, também necessitando de análises moleculares para a definição de sua família. Uma particularidade no caso do fago B3, foi a morfologia da placa de lise que o mesmo gera sob o tapete de sua bactéria hospedeira. Elas apresentam um halo opaco circundando um interior translúcido, padrão considerado indicador de fagos produtores de enzimas depolimerases a capacidade de degradação de polissacarídeos (RICE *et al*., 2021). Durante o processo de infecção, o fago produz algumas depolimerases que são proteínas fágicas associadas à superfície do vírion, mais frequentemente como parte das fibras da cauda e outras proteínas estruturais (RICE *et al*., 2021). Fato é que essas depolimerases podem ser de fundamental importância do processo de infecção, já que elas clivam polissacarídeos capsulares (CPS), exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS) da bactéria hospedeira fazendo com que os receptores de superfície celular da mesma necessários à adsorção fiquem expostos, o que facilitaria a infecção pelo fago (Rice *et al*., 2021). Devido ao importante papel desempenhado por CPS, EPS e LPS na formação de biofilmes, as enzimas depolimerases também estão sendo investigadas em termos de prevenção e combate a formação desse conjunto diversificado de biopolímeros composto por polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, glicolipídios e que também pode conter DNA extracelular (Rice *et al*., 2021). As pectinas/pectato liases estão entre as depolimerases mais comuns produzidas por fagos (Oliveira *et al.,* 2016) e são conhecidas por degradar substratos não metilados e pouco esterificados carregados negativamente, agindo sobre o α-1, 4 ligações entre os resíduos de galacturonosil (Shang *et al.,* 2019). A presença de um domínio de pectato liase implica que a enzima é capaz de degradar o ácido poligalacturônico, um dos principais componentes dos polissacarídeos bacterianos (Rice *et al*., 2021). O ácido galacturônico e seus derivados por sua vez podem estar presentes em antígenos O de lipopolissacarídeos (LPS), os quais podem ser o alvo da atividade pelo pico da cauda dos bacteriófagos (Rice *et al*., 2021).

Com relação aos testes *in vitro*, foram primeiramente realizados os testes de multiplicidade de infecção (MOI). Foi observado que o fago B3 apresentou a melhor efetividade na inibição do crescimento de RS705 no menor valor de MOI testado que foi de 0,01. Já o fago X1, apresentou resultado oposto, sendo que a maior taxa de inibição do crescimento de IS3FMA ocorreu no maior valor (MOI= 10). De forma geral, a multiplicidade de infecção (MOI) é a proporção de partículas virais adsorvidas, ligadas ou infectantes para alvos suscetíveis (ABEDON *et al.*, 2016). Essa proporção pode ser controlada ajustando aproximadamente a concentração relativa das partículas infecciosas e de seu hospedeiro. Esse ajuste é muito importante para avaliação da atividade bacteriolítica de fagos, no sentido de garantir que praticamente todas as células hospedeiras sejam infectadas e a partir disso, predizer em quais concentrações as partículas virais são mais efetivas no processo de infecção e morte celular bacteriana (ABEDON *et al.*, 2016).

No caso dos fagos de *Ralstonia sp.,* os valores de MOI's mais efetivos variaram muito nos estudos consultados. Elhalag e colaboradores (2018) observaram que dos três valores de MOI's testados (0,1; 0,5 e 1,0) em infecções da linhagem *R. solanacearum* (filotipo II) pelo fago RsPod1EGY R (antiga família *Podoviridae*), o valor intermediário (0,5) foi o mais eficaz na inibição da multiplicação bacteriana, mensurada indiretamente por meio da quantificação de polissacarídeos de superfície, considerado um importante fator de virulência da espécie. Em outro estudo, Addy e colaboradores (2019) isolaram o fago RsoM1USA pertencente à antiga família *Myoviridae* utilizando a linhagem hospedeira *R. solanacearum* RUN302. Os pesquisadores testaram MOI's variando de 0,001 a 10 e constataram que a maior diminuição da D.0 a 600 nm de RUN302 ocorreu na MOI= 1, mesmo observando que as curvas entre as MOI's de 0,1 a 10 ficaram bem próximas.

Os fagos de *Xanthomonas sp.* também apresentam grande variação nos valores de MOI's. Gašić e colaboradores (2011) isolaram um fago utilizando a hospedeira *Xanthomonas euvesicatoria* linhagem KFB, classificado como pertencente à antiga família *Myoviridae.* O fago K0 foi testado nas MOI's de 0,01 a 10, apresentando maior efetividade contra KFB na MOI= 0,1. Já em uma completa revisão de literatura, Nakayinga e colaboradores (2021) descreveram uma ampla variação na efetividade das MOI's testadas, variando de 0,001 até 1,0, para vários fagos isolados das espécies *X. euvesicatoria*, *X. campestris* pv. campestris, *X. arboricola* pv. juglandis*, X. axonopodis, X. oryzae* pv. oryzae, *X. citri* e *X. perforans, e* identificados como

pertencentes as antigas famílias *Myoviridae, Podoviridae, Siphoviridae, Autographiviridae* e *Inoviridae.* Em todos esses trabalhos, o crescimento bacteriano foi avaliado pelo mesmo método utilizado em nosso estudo que foi a variação da densidade óptica ao longo do tempo (D.O.600nm).

Nesse sentido, a determinação das multiplicidades de infecção do fago de interesse perante sua bactéria hospedeira é uma grande ferramenta, principalmente em termos de utilização de produtos e aplicações tecnológicas, uma vez que a efetividade dos tratamentos a base de fagos pode variar dependendo da proporção de vírions adicionada a uma densidade específica de células bacterianas (Addy *et al.,* 2019). Assim, esses testes são importantes nas etapas de desenvolvimento produtos à base de fagos, por exemplo.

No intuito de se avaliar os resultados da MOI ideal e efetividade obtida nos experimentos realizados em placas de 96 poços, foi realizada uma avaliação da atividade bacteriolítica dos fagos contra células planctônicas também em escalas maiores utilizando volumes de 200 mL. As reduções observadas corresponderam a 49,23% na combinação fago B3 e a hospedeira RS705 e de 76,2% para a combinação fago X1 e IS3FMA em relação aos seus controles sem a adição dos fagos. Apesar de significativas, essas diminuições podem na realidade ser ainda maiores, considerando que alguns autores já descreveram a possibilidade de ocorrer um aumento da resistência bacteriana em culturas líquidas (TOPKA *et. al*., 2019). Isso pode explicar em partes o aumento da D.O. a 600 nm de RS705 + B3 mesmo sendo menor do que de seu controle até as 24 horas de cultivo. Outro fator são as diferentes formas e o tempo que cada fago pode levar para adsorver a célula hospedeira fazendo com que a diminuição da densidade celular leve um período de tempo maior para ser observada (ABEDON *et al.*, 2013).

No teste de espectro de hospedeiros, tanto o fago B3 quanto o fago X1 mostraram alta especificidade ao seu respectivo gênero (no caso de B3) e restrita a sua linhagem (no caso de X1). Dessa forma, através da detecção de placas de lise, foi possível observar que apenas as espécies de *Ralstonia solanacearum e Ralstonia pseudosolanacearum* apresentaram sensibilidade ao fago B3. Esse mesmo aspecto já foi observado em outros trabalhos. Addy e colaboradores (2019), por exemplo, testaram o fago RsoM1USA contra diversas linhagens de *Ralstonia solanacearum e R. pseudosolanacearum* provenientes de várias localidades do mundo e observaram que mesmo pertencendo ao mesmo gênero, várias cepas apresentaram resistência

contra RsoM1USA, apesar do mesmo infectar todas aquelas provenientes no mesmo local onde o fago foi isolado. Kawasaki e colaboradores (2009) também observaram que o fago RSB1, isolado do solo de tomateiros doentes, infectou 13 das 15 linhagens de *Ralstonia sp*., e sem ação lítica contra os outros gêneros testados. Já para fagos isolados de *Xanthomonas sp.,* Nakayinga e colaboradores (2021) realizaram uma revisão de literatura que listou um total de 148 fagos isolados de diversas espécies de *Xanthomonas sp.* incluindo *X. euvesicatoria*, *X. campestris* pv. campestris e *X. perforans.* Destes, 52 apresentaram uma gama estreita de hospedeiros, 88 uma ampla gama e apenas 8 uma variedade de hospedeiros polivalentes. No caso dos bacteriófagos, aqueles que apresentam uma gama estreita de hospedeiros infectam uma ou poucas cepas da mesma espécie bacteriana, fagos de ampla gama de hospedeiros infectam múltiplas cepas da mesma espécie e fagos polivalentes infectam várias espécies ou gêneros bacterianos não relacionados (HAND, *el al.,* 2017). Assim, esses resultados corroboram para o fato de que o fago B3 apresenta uma ampla gama de hospedeiros, já que infecta diferentes espécies de *Ralstonia sp.* isoladas de diferentes lugares, enquanto o fago X1 mostrou uma estreita gama não infectando nenhuma das espécies testadas. Nesse contexto, é imprescindível destacar o fato do fago B3 não apresentar atividade bacteriolítica contra os isolados do caule de outros gêneros e contra nenhuma das bactérias do solo rizosférico de onde o mesmo foi isolado. Isso é importante, pois existem muitas bactérias que são benéficas ao desenvolvimento da planta como as promotoras de crescimento e aquelas capazes de apresentar diversos mecanismos envolvidos na supressão fitopatógenos (AYOMIDE *et al.,* 2020). Logo, o fato de B3 não apresentar atividade lítica contra o isolado *Pseudomonas putida* (IS3CMU), por exemplo, é um bom indicativo para seu uso em campo, uma vez que tal bactéria já foi destacada em estudos pelo seu potencial de aplicação no meio ambiente, tanto como biorremediador, como agente promotor de crescimento e de controle de pragas e doenças (JONSSON *et al.,* 2011; SIVARAMAKRISHNA, *et al.,* 2014; ZUO, Z *et al.,* 2015). Nesse contexto, é possível inferir que os fagos do presente estudo não apresentam polivalência sendo que B3 tem como alvo apenas os fitopatógenos causadores da doença, no caso a murcha bacteriana, enquanto X1 infecta especificamente a espécie *Xanthomonas perforans*, causadora da mancha bacteriana em tomateiros, implicando na possibilidade de seu uso causar menor impacto na microbiota endofítica e rizosférica presentes no mesmo local.

Outro parâmetro abordado no presente trabalho foi a estabilidade dos fagos, os quais podem ser afetados por fatores físicos e químicos externos como temperatura, pH e luz ultravioleta, que são importantes determinantes na escolha de métodos para armazenamento dos bacteriófagos, predição de estabilidade e eficácia nas condições ambientais das áreas onde serão aplicados (ACKERMANN *et al*. 2004). Tais fatores podem influenciar na inativação da partícula viral por meio de danos em sua estrutura, principalmente na desorganização de proteínas ou danos nas bases nitrogenadas de seu material genético (ACKERMANN *et al*. 2004). Um exemplo é o caso da radiação UV, a qual pode gerar uma perda da infecciosidade viral podendo estar associada à formação de fotoprodutos no DNA como dímeros de pirimidina de ciclobutano ou hidratos de pirimidina (ACKERMANN *et al*. 2004). Em relação ao impacto no capsídeo, a luz ultravioleta também pode afetar a integridade ou a conformação das proteínas quebrando ligações dissulfuradas (S-S) ou criando ligações cruzadas entre as proteínas e o genoma, por exemplo (ACKERMANN *et al*. 2004).

Os fagos B3 e X1 foram primeiramente testados quanto à estabilidade em diferentes valores de pH. Para B3, foi observado que o fago manteve a viabilidade entre os pH's 3,0 e 8,0 somente havendo perda total da mesma quando o fago foi exposto ao pH 9,0. Além disso, os valores de pH 6,0 e 7,0 não apresentaram diferença significativa, sendo que ambos mantiveram os maiores títulos durante todo período de exposição. Tais pH's apresentaram as menores reduções de UFP/mL entre 0h e 24 horas de exposição que foram de 13,25% e 6,02% respectivamente. Já o fago X1 manteve estabilidade em todas as faixas de pH (3,0 a 9,0) e somente apresentou efeito negativo significativo ($p \leq 0,05$) no pH 3,0 sem considerar o tempo de exposição, sendo que as maiores reduções de UFP/mL entre 0h e 24 horas de exposição foram apenas de 6,58% no pH= 3,0 e de 4,44% no pH= 9,0. Apesar das maiores reduções no título do fago B3 (principalmente nos pH's 8,0 e 9,0) quando comparado a X1, de forma geral não houve grandes variações significativas dos títulos nos diferentes pH's, um dado importante, sobretudo ao se considerar o longo período de tempo utilizado nos testes. Elhalag e colaboradores (2018), por exemplo, expuseram o fago RsPod1EGY isolado de *R solanacearum* aos pH's variando de 2,0 a 11,0 por um período de 3 horas a 28 °C. O fago manteve a viabilidade entre os pH's 5,0 e 9,0, mas apresentou decréscimos significativos no título, sendo que sua máxima estabilidade ocorreu em pH 7,0. Já Umrao e colaboradores (2021) expuseram o fago ϕsp aos pH's

de 3,0 a 9,0 por 20 minutos e apesar do mesmo manter a viabilidade em todas as faixas, apresentou um decréscimo significativo do título em pH's mais baixos (3,0 e 4,0), mantendo o seu ótimo no pH 7,0. Nesse sentido, é importante salientar que em termos de aplicação dos fagos em campo, o pH do solo em que o tomate é normalmente cultivado fica entre entre 6,0 e 7,0 sendo essa escolha definida pelo efeito que o pH da solução tem sobre a disponibilidade de micronutrientes. Quando o pH cai para valores menores que 5,5, a disponibilidade de magnésio e molibdênio diminui e em valores maiores do que 7,5 pode ocorrer deficiência em zinco, manganês e ferro (MOURA, 2014). Assim, o fago B3 apresentou resultados compatíveis para sua aplicação, pois manteve os maiores títulos na faixa de pH mais neutra, similar à do solo onde este seria aplicado. A mesma análise se aplica para o fago X1, já que os pH's nas superfícies foliares em que o fago seria pulverizado, considerando o padrão da doença causada por *Xanthomonas perforans* variam entre 5,5 e 7,5, faixas em que também se mantiveram altos títulos.

Com relação a estabilidade frente a temperatura, ambos os fagos mostraram boa estabilidade entre as temperaturas de 20°C a 40°C sendo que o fago B3 não apresentou redução significativa ($p \leq 0,05$) em seu título (UFP/mL) nas temperaturas de 20 e 30°C quando comparadas ao controle e o fago X1 não apresentou redução significativa ($p \leq 0,05$) em nenhuma das temperaturas testadas também quando comparadas aos controles. Esse padrão de estabilidade em temperaturas superiores a temperatura ambiente já foi relatada em outros estudos. Addy e colaboradores (2019), por exemplo, expuseram o fago RsoM1USA isolado de *Ralstonia solanacearum,* a temperaturas variando de 4°C a 90°C durante 1 hora. O fago manteve a estabilidade sem variações significativas até os 50°C, decaindo pela metade (UFP/mL) aos 60°C e sendo inativados totalmente na faixa de 70°C a 90°C. Já no trabalho de Kizheva e colaboradores (2021), os pesquisadores isolaram três fagos utilizando as linhagens hospedeiras *Xanthomonas euvesicatoria* NBIMCC 8731, *Xanthomonas perforans* NBIMCC 8729 e *Xanthomonas vesicatoria* NBIMCC 2427. A inativação térmica completa dos três fagos testados ocorreu após 10 minutos de incubação a 95°C, não havendo mais detecção de placas de lise após este tempo. Contudo, eles se mantiveram viáveis após a incubação a 55°C e 75°C por 10 e 30 minutos. Dessa forma, considerando os locais de uso, infere-se que fagos B3 e X1 são promissores no que diz respeito à aplicação em campo, isso porque a temperatura ótima para germinação das sementes do tomateiro situa-se na faixa dos 15 a 25ºC e

para seu desenvolvimento e produção, as plantas suportam uma variação de temperatura (entre 15 e 33ºC), sendo o seu ótimo em torno de 21ºC (MOURA, 2014).

Além disso, foi realizado o teste de estabilidade dos fagos frente a incidência de luz UV-A (315 nm – 400 nm). No geral, quase 99% dos raios ultravioletas que efetivamente chegam à superfície terrestre são do tipo UV-A. A radiação UV-B (280 nm – 315 nm) é parcialmente absorvida pela camada de ozônio da atmosfera e a radiação UV-C (100 nm – 280 nm) é totalmente absorvida pelo oxigênio e o ozônio da atmosfera (XING, 2014). Por isso, a luz UV-A foi escolhida para os testes, já que é a que mais se assemelha às condições naturais de exposição à luz solar em que os fagos serão submetidos quando aplicados em campo. Nos testes do presente trabalho, não houve efeito negativo e significativo sobre o título (UFP/mL) de ambos os fagos durante a 1ª hora de exposição, configurando uma estabilidade maior do que a de outros fagos encontrados na literatura. Kizheva e colaboradores (2021), por exemplo, mostraram que os fagos SFXV124/3, SFXV124T/1 e SFXV124T/2 isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* apresentaram estabilidade variada à exposição a UV (A + B) quando mantidos em uma caixa fechada com cerca de 30 cm de distância entre as amostras e a irradiação. Os fagos apresentaram estabilidade até os tempos de 50, 30 e 10 minutos, respectivamente. Já Umrao e colaboradores (2021) não detectaram placas de lise do fago ϕsp1, isolado de *R. solanacearum* já no 5° minuto de exposição à luz UV-C (254 nm) em condições próximas ao estudo anterior.

Outro parâmetro de grande importância diz respeito à determinação do tempo de estocagem dos bacteriófagos. Investigações sobre a estabilidade e sobrevivência dos fagos sob várias condições de armazenamento já foram conduzidas em diversos experimentos, sendo que as partículas virais se mantiveram estáveis desde 1 ou 2 semanas a até 5 anos (Mendez *et al.*, 2002). Ackermann e colaboradores (2004) foram além e investigaram tendências gerais em relação à viabilidade de centenas de fagos liofilizados em coleções armazenadas por até 20 anos. Os mesmos relataram fagos como os da série T e grupo λ apresentando estabilidade por períodos de 10 a 12 anos, assim como os fagos dos grupos T4 e T7, com perfil de alta estabilidade. No presente estudo, a estabilidade do fago B3, foi avaliada ao longo de 6 meses em tampão SM e meio de cultura mineral BHB, ambos estocados a 4°C. Essas escolhas se deram para chegar o mais próximo da formulação de um produto pronto para aplicação em campo e que pudesse ser mantido em temperatura de geladeira, o que facilitaria o transporte e armazenamento. Nesse sentido, B3 mostrou uma boa estabilidade de

armazenamento em tampão SM, sendo que ao final de 6 meses, seu título caiu cerca de apenas ⅕ em comparação ao controle. Já a estabilidade em meio BHB não seguiu a mesma linha, já que o título decaiu quase pela metade em comparação ao valor inicial. Esse resultado era esperado, uma vez que o tampão SM é amplamente utilizado na estocagem de bacteriófagos diferentemente de meios de cultura. Um resultado similar foi observado por Addy e colaboradores (2019) em que o fago RsoM1USA decaiu significativamente seu título (UFP/mL) em meio CPG de Kado & Heskett (1970) quando comparado ao tampão SM durante 12 meses de estocagem. Isso reforça a necessidade da escolha adequada do diluente usado nas formulações de fago e definição da necessidade de se usar etapas como a de filtração tangencial no preparo de formulações fágicas visando trocar o meio usado na propagação dos fagos por soluções tamponadas que propiciem uma maior estabilidade das partículas virais (Mendez *et al.*, 2002).

Após a realização dos testes *in vitro,* a atividade bacteriolítica do fago B3 foi testada contra a linhagem de *Ralstonia solanacearum* RS705 também *in vivo*. Geralmente doenças em plantas são quantificadas por métodos diretos de avaliação dos sintomas como a incidência, severidade ou intensidade ou métodos indiretos, como a determinação da população do patógeno, sua distribuição espacial ou os efeitos causados na produção (danos e/ou perdas) (BAE *et al.,* 2012). Em nosso estudo, foi utilizado o método direto caracterizado pela quantificação de folhas murchas nas plantas tratadas e não tratadas com o fago B3, bem como o método indireto de determinação da população do patógeno após o término do experimento. Foi observado que todos os tratamentos que receberam o fago B3 tiveram uma proporção menor de murchamento foliar (%) em relação ao controle CB (patógeno RS705 / sem fago), e até mesmo ausência de sintomas no período avaliado nas plantas dos tratamentos B1F0D3 e B1F0D8, as quais receberam duas (momento da infecção com RS705 e 3 dias depois) e três aplicações do fago (momento da infecção com RS705, 3 dias e 8 dias depois), respectivamente. Isso sugere, que quanto maior o número de aplicações do fago, maior foi a efetividade no controle da doença. Além do número de aplicações, o momento em que essas são realizadas também parece influenciar no encontro (fago-hospedeiro) e consequentemente na atividade bacteriolítica do fago, isso porque ao final do experimento, o tratamento B1F0 (patógeno e fago inoculados no mesmo instante) apresentou uma média de 24,35% de folhas murchas, enquanto B1FA (inoculação do fago três dias depois da infecção

com RS705) resultou em uma média de 60,29% e em B1F3 (inoculação do fago três dias antes da infecção com RS705) o índice foi de 72,50%. Com relação a persistência da bactéria no solo ao final do experimento, foi possível observar que a população de *Ralstonia solanacearum* (RS705) diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) em todos os tratamentos em que o fago B3 foi aplicado (com exceção de B1F3) apresentando a maior redução em UFC/mL de 13,1% no tratamento B1F0D8. Já na avaliação da persistência de RS705 nos caules, houve diminuição significativa ($p \leq 0,05$) nos tratamentos B1F0, B1F0D3 e B1F0D8 sendo a maior redução observada de 23,34% no tratamento B1F0D3.

Por último, na análise quantitativa da persistência do fago B3 nos solos e caules, observou-se uma diferença significativa no título do fago ($p \leq 0,05$) quando comparado o controle CF com os tratamentos B1F0D3 e B1F0D8 sendo que nesses foram encontrados valores 24,4% e 27,6% maiores respectivamente do que em CF. Nessa mesma análise quantitativa da persistência de B3 após os tratamentos, não foram detectadas partículas virais nos caules das plantas.

Dessa forma, a partir dos resultados observados foi possível presumir uma relação direta de que os tratamentos com as menores taxas de progressão da doença pela contagem de folhas murchas (%) também apresentaram menor presença do patógeno tanto no solo quanto nos caules (UFC/mL) e maiores taxas do fago B3 (UFP/mL) no solo. Em diversos trabalhos da literatura já foram observados resultados bastante satisfatórios no que diz respeito ao controle da doença, mas com variações no que diz respeito ao tempo e quantidade de aplicações. No estudo de Elhalag e colaboradores (2018), foi observado que o fago RsPod1EGY, também isolado de *R. solanacearum,* foi capaz de suprimir os sintomas da murcha bacteriana em tomate em condições de casa de vegetação, quando aplicado um dia antes da infecção. Já Magar e colaboradores (2022) testaram dois bacteriófagos (RpT1 e RpY2) contra *R. pseudosolanacearum*. Os fagos foram testados separadamente sendo inoculados 1 dia antes do patógeno, no mesmo dia da inoculação de *R. pseudosolanacearum* e 1, 2, 3 e 5 dias após a inoculação da bactéria. No caso do tratamento com fago RpT1, a doença foi significativamente reduzida em plantas que foram tratadas com o fago 3 e 5 dias após a inoculação de *R. pseudosolanacearum*. Já o tratamento com o fago RpY2 foi capaz de reduzir a doença nos tratamentos de 3 dias, 5 e 2 dias depois sendo que os tratamentos de 1 dia antes, mesmo dia da infecção e 1 dia depois da infecção não suprimiram significativamente a doença, resultados que se assemelharam

bastante ao presente estudo. Além disso, eles também avaliaram a persistência do patógeno e dos fagos no solo e na parte aérea das plantas e observaram a tendência de que quanto menos sintomas a planta apresentou menos bactéria persistiu em ambas as localidades, o que também pudemos observar em nosso trabalho. Com relação a detecção dos fagos nas plantas, Álvarez e colaboradores (2022) conseguiram reisolar os fagos hospedeiros de *R. solanacearum* utilizados em seu estudo somente pelo método de enriquecimento, em que parte dos caules das plantas tratadas com o patógeno e o fago foi adicionado ao meio de cultura específico da bactéria. Esse resultado é um indicativo de que além de impedir a colonização da planta eliminando as bactérias do solo rizosférico, os fagos poderiam translocar para as partes aéreas da planta, constituindo uma forma de controle a mais, pois o fago poderia não só ser usado profilaticamente, mas também após o início da doença (ÁLVAREZ *et al.,* 2022).

Nos últimos anos, diversos determinantes genéticos detectados em fagos foram relacionados a ciclos líticos de curta duração como é o caso da associação de genes de fosfoesterases putativas e de ORFs relacionadas as atividades de replicação, reparo e recombinação do DNA resultando em processos de infecção precoce dos fagos (MAGAR *et al.*, 2022). Além disso, outro determinante no processo infeccioso diz respeito as diferentes linhagens dos patógenos que podem variar quanto ao tempo requerido para se tornarem metabolicamente ativas e atingir densidades necessárias a infecção pelo fago ou até mesmo para causar doença nas plantas (MAGAR *et al.*, 2022). Tal fato somado à densidade e padrão de distribuição espacial dos fagos no solo, poderia, portanto, ser o ponto chave para o sucesso do encontro fago-hospedeiro e por consequência retardar ou suprimir o estabelecimento da doença (PIMCHAN *et al.* 2018). Nesse sentido, estudos sobre como aumentar a eficiência de retenção de bacteriófagos no solo, bem como compreender os mecanismos envolvidos nos ciclos de multiplicação bacteriana e infecção viral incluindo os fatores genéticos e estruturais do fago e da bactéria hospedeira são de fundamental importância no intuito de se alcançar resultados ainda mais satisfatórios (MAGAR *et al.*, 2022). Informações que estão sendo buscadas por meio da caracterização genômica dos fagos em estudo.

9 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O uso de defensivos agrícolas está se tornando limitado devido à resistência que os fitopatógenos vêm apresentando, assim como a utilização de pesticidas que podem gerar riscos ao meio ambiente e à saúde humana. Logo, o uso da fagoterapia mostra-se uma alternativa muito promissora para o controle de patógenos bacterianos que acometem várias culturas de importância econômica do agronegócio brasileiro.

No presente estudo foi possível isolar e caracterizar fagos líticos que atacam patógenos de interesse causadores de doenças responsáveis por grandes perdas nas safras de tomate do país, a murcha e a mancha bacteriana. Apresentamos resultados da eficácia bacteriolítica *in vitro* de dois bacteriófagos (B3, isolado de uma linhagem de *Ralstonia solanacearum* e X1 isolado de uma linhagem de *Xanthomonas perforans),* os quais diminuíram significativamente o crescimento de seus respectivos hospedeiros nos testes de multiplicidade de infecção (MOI) e atividade bacteriolítica. Para mais, os fagos não apresentaram polivalência mostrando serem específicos ao gênero *Ralstonia sp.* (fago B3) e a linhagem hospedeira *Xanthomonas perforans* (fago X1), o que é importante visando a aplicação em campo onde outras bactérias benéficas ao crescimento da planta estarão presentes.

Nos testes de estabilidade visando simular condições adversas em que os fagos seriam submetidos em campo como variações de pH, temperatura e luz UV-A, os fagos apresentaram bons resultados, não havendo grandes variações de título nos pH’s entre 3,0 e 8,0 e nas temperaturas entre 20 a 40°C, assim como quando submetidos a radiação UV-A por até uma hora sem apresentarem diminuições significativas em seus títulos. No caso da estabilidade ao longo do tempo, o fago B3 manteve altos títulos em tampão SM a 4° C por cerca de 4 meses até que a primeira diminuição significativa pudesse ser detectada.

Por fim, o fago B3 mostrou ter um alto potencial contra o estabelecimento da murcha bacteriana causada por *R. solanacearum* no teste *in vivo*, utilizando plantas do tomateiro. O fago impediu o adoecimento das plantas em 100% nos tratamentos em que o mesmo foi aplicado duas vezes ou mais em um intervalo de 14 dias. Nesse sentido, os próximos passos são testar a capacidade do fago X1 no controle da mancha bacteriana e expandir os testes do fago B3 em campo para avaliar sua efetividade em escalas maiores e condições ambientais ainda mais adversas.

10 REFERÊNCIAS

ABEDON, S. T. (2016). Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). Bacteriophage, 6(3), e1220348. doi:10.1080/21597081.2016.1220348

ABEDON, S.T. (2006) The bacteriophages 2 edn. Oxford, New York: Oxford University Press.

Abedon, S.T. (2013). *Brenner's Encyclopedia of Genetics* || *Multiplicity of Infection. , (), 509–510.* doi:10.1016/b978-0-12-374984-0.00989-x

ABREU, C. L. M. Controle de Alternaria solani em tomateiro (Lycopersicon esculentum) com óleos essenciais. 2006. 71 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade Paulista de Ciências Agrárias, Botucatu, 2006.

ACKERMANN, H. W. 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch. Virol. 152, 227–243 (2007)

ACKERMANN, H. W. Phage classification and characterization. Methods Mol. Biol. 501, 127–140 (2009).

ACKERMANN, H. W. Phage classification and characterization. Methods Mol. Biol. 501, 127–140 (2012).

ACKERMANN, H.-W. Classification of bacteriophages. In The Bacteriophages; Calendar, R., Ed.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 2006; pp. 8–17.

ACKERMANN, H.-W., DuBow, M. S., Jarvis, A. W., Jones, L. A., Krylov, V. N., Maniloff, J., Winsche, L. (1992). The species concept and its application to tailed phages. Archives of Virology, 124(1-2), 69–82. doi:10.1007/bf01314626

Ackermann, H.-W., Tremblay, D., and Moineau, S. (2004) Long-term bacteriophage preservation. World Federation for Culture Collections Newsletter. 38, 35–40.

ACKERMANN, H.-W.; Eisenstark, A. The Present State of Phage Taxonomy. Intervirology 1974.

ADAMS MH. Bacteriophages. New York: InterScience, 1959.

Addy, Hardian Susilo; Ahmad, Abdelmonim Ali; Huang, Qi (2019). *Molecular and Biological Characterization of Ralstonia Phage RsoM1USA, a New Species of P2virus, Isolated in the United States. Frontiers in Microbiology, 10(), 267–.* doi:10.3389/fmicb.2019.00267

ADRIAENSSENS, E. M. et al. Environmental drivers of viral community composition in Antarctic soils identified by viromics. Microbiome 5, 83 (2017).

ADRIAENSSENS, E. M., Wittmann, J., Kuhn, J. H., Turner, D., Sullivan, M. B., Dutilh, B. E., Rodney Brister, J. (2018). Taxonomy of prokaryotic viruses: 2017 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. Archives of Virology, 163(4), 1125–1129. doi:10.1007/s00705-018-3723-z

AIEWSAKUN, P., Adriaenssens, E. M., Lavigne, R., Kropinski, A. M., & Simmonds, P. (2018). Evaluation of the genomic diversity of viruses infecting bacteria, archaea and eukaryotes using a common bioinformatic platform: steps towards a unified taxonomy. Journal of General Virology, 99(9), 1331–1343. doi:10.1099/jgv.0.001110

AJUEBOR, J., MCAULIFFE, O., O'MAHONY, J., ROSS, P., HILL, C., COFFEY, A. Bacteriophage endolysins and their applications. Science Progress, 99(2), 183 – 199, 2016

ALICE M. Quezado-Duval; Carlos A. Lopes. Mancha bacteriana: uma atualização para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. Circular Técnica 84 - 25-05-2010.

ALMEIDA, G. M. de F., & Sundberg, L.-R. (2020). The forgotten tale of Brazilian phage therapy. The Lancet Infectious Diseases. doi:10.1016/s1473-3099(20)30060-8

Álvarez B, Gadea-Pallás L, Rodríguez A, Vicedo B, Figàs-Segura À, Biosca EG. Viability, Stability and Biocontrol Activity *in Planta* of Specific *Ralstonia solanacearum* Bacteriophages after Their Conservation Prior to Commercialization and Use. Viruses. 2022 Jan 19;14(2):183. doi: 10.3390/v14020183. PMID: 35215777; PMCID: PMC8876693.

AMARILLAS L, RUBÍ-RANGEL L, Chaidez C, González-Robles A, Lightbourn-Rojas L and León-Félix J (2017) Isolation and Characterization of phiLLS, a Novel Phage with Potential Biocontrol Agent against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. Front. Microbiol. 8:1355. doi: 10.3389/fmicb.2017.01355

ARÊDES, A. F.; DE OLIVEIRA, B. do V.; RODRIGUES, R. M. Viabilidade econômica da tomaticultura em Campos dos Goytacazes. Perspectivas OnLine 2007-2010, v. 4, n. 16, 2014.

AYOMIDE F. Mohammed, Adejare R. Oloyede & Adebola O. Odeseye (2020) Biological control of bacterial wilt of tomato caused by Ralstonia solanacearum using Pseudomonas species isolated from the rhizosphere of tomato plants, Archives of Phytopathology and Plant Protection, 53:1-2, 1-16, DOI: 10.1080/03235408.2020.1715756.

BAE JY, Wu J, Lee HJ, Jo EJ, Murugaiyan S, Chung E (2012) Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. Journal Microbiology Biotechnology 22:613-1620. doi:10.4014/jmb.1208.08072

BAI, J., KIM, Y., RYU, S. LEE, J. Biocontrol and Rapid Detection of Food-Borne Pathogens Using Bacteriophages and Endolysins. Frontiers in Microbiology, 7: 474, 2016

BALOGH, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A., King, P., & Jackson, L. E. (2003). Improved Efficacy of Newly Formulated Bacteriophages for Management of Bacterial Spot on Tomato. Plant Disease, 87(8), 949–954. doi:10.1094/pdis.2003.87.8.949

BALOGH, B., Jones, J.B., Iriarte, F.B. and Momol, M.T. (2010) Phage therapy for plant disease control. Curr Pharm Biotechnol, 11, 48-57.

BALOGH, B.; Nga, N.T.T.; Jones, J.B. Relative Level of Bacteriophage Multiplication in vitro or in Phyllosphere May Not Predict in planta Efficacy for Controlling Bacterial

BALTRUS DA, McCann HC, Guttman DS. Evolution, genomics and epidemiology of Pseudomonas syringae: challenges in bacterial molecular plant pathology. Mol Plant Pathol 2017;18:152–168.

BÁRDY, P., PANTUCEK, R., BENESÍK, M., DOSKAR, J. Genetically modified bacteriophages in applied microbiology. Journal of Applied Microbiology 121, 618—633, 2016.

BARYLSKI, J. et al. Analysis of Spounaviruses as a case study for the overdue reclassification of tailed phages. Syst. Biol. 69, 110–123 (2019).

BECKER, W.F.; WAMSER, A.F.; FELTRIM, A.L.; SUZUKI, A.; SANTOS, J.P.; VALMORBIDA, J.; HAHN, L.; MARCUZZO, L.L.; MUELLER, S.; Sistema de produção integrada para o tomate tutorado em Santa Catarina. Florianópolis, SC: Epagri, 2016.

Bhunchoth, A.; Phironrit, N.; Leksomboon, C.; Chatchawankanphanich, O.; Kotera, S.; Narulita, E.; Kawasaki, T.; Fujie, M.; Yamada, T. (2015). Isolation of Ralstonia solanacearum -infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents. Journal of Applied Microbiology, 118(4), 1023–1033. doi:10.1111/jam.12763Leaf Spot on Tomato Caused by Xanthomonas perforans. Front. Microbiol. 2018, 9, 2176.

BORDET, J., & Ciuca, M. (1921). Remarques sur l’historique des recherches concernant la lyse microbienne transmissible. Comptes Rendus Seances Societe Biologie Paris, 84, 745–747.

BOUZAR, H.; JONES, J.B.; STALL, R.E.; LOUWS, F.J.; SCHNEIDER, M.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J.; JACKSON, L.E. 1999. Multiphasic analysis of Xanthomonas causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Canbbean and Central America: Evidence for common lineages within and between countries. Phytopathology 89:28- 335.

BRADBURY, J. F. Guide of Plant Pathogenic Bacteria. Slough: C.A.B. International, 1986. 332 p.

BRADLEY, D.E. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. Bacteriol. Rev. 1967, 31, 230–314.

BUTTIMER C, Macauliffe RPR, Hill C, O’Mahony J, Coffey A (2017) Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. Frontiers Microbiology

CALDWELL, D; KIM, BS; IYER-PASCUZZI, AS. 2017. Ralstonia solanacearum differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. Phytopathology 107: 528-536.

CAMPOY, S, Herv` as, A, Busquets, N, Erill, I, Teixido, L, Barb´e, J., 2006. Induction of the SOS response by bacteriophage lytic development in Salmonella enterica. Virology 351, 360–367. https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.04.001.

CARMO, M.G.F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L.A.; CARVALHO, A.O. 1996. Progresso da pústula bacteriana do pimentão, causada por Xanthomonas campestris pv. vesicatoria, em condições de viveiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília 21:(1):62-70.

CARMO, M.G.F.; MACAGNAN, D.; CARVALHO, A.D. 2001. Progresso da manchabacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inóculo e do emprego ou não do controle com oxicloreto de cobre. Horticultura Brasileira, Brasília 19(3):210-215

CASJENS SR, Hendrix RW. (2015). Bacteriophage lambda: early pioneer and still relevant. Virology 479: 310.

ÇEMEN, A. Possibilities of using bacteriophages for biological control of tomato bacterial speck disease (Pseudomonas syringae pv. tomato). 2017.

CENENS, W, Makumi, A, Mebrhatu, MT, Lavigne, R, Aertsen, A., 2013. Phage–host interactions during pseudolysogeny. Bacteriophage 3, e25029. https://doi.org/ 10.4161/bact.25029.

CHAERANI R., Voorrips R.E. (2006) Tomato early blight (Alternaria solani): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. Journal of General Plant Pathology, 72, 335–347.

CHANISHVILI N. Phage therapy—history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. Adv Virus Res 2012; 83: 3–40

CHAUDHR Z, Rashid H. 2011. Isolation and Characterization of Ralstonia solanacearum from Infected Tomato Plants of Soan Skesar Valley of Punjab. Pak j Bot. 43(6): 2979–2985.

CHEVRETTE, M.G.; Currie, C.R. Emerging evolutionary paradigms in antibiotic discovery. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2019, 46, 257–271

CONDIT. C.R Principles of Virology In: Fields Virology, 6th Edition Edited by David M. Knipe and Peter M. Howley. Philadelphia, PA, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

COONS, G., and Kotila, J. (1925). The transmissible lytic principle (bacteriophage) in relation to plant pathogens. Phytopathology 15, 357–370.

COX, S. I say tomayto, you say tomahto. 2000. Disponível em: http://www.landscapeimagery.com/tomato.html. Acesso em: 26 fevereiro 2013

CZAJKOWSKI, R., Ozymko, Z., & Lojkowska, E. (2015). Application of zinc chloride precipitation method for rapid isolation and concentration of infectious Pectobacterium spp. and Dickeya spp. lytic bacteriophages from surface water and plant and soil extracts. Folia Microbiologica, 61(1), *29–33.* doi:10.1007/s12223-015-0411-1

DAVIS, R. M., Miyao, G., Subbarao, K. V., Stapleton, J. J., and Aegerter, A. B. J. (2013). UC IPM: UCManagement Guidelines - TOMATO: Diseases. Available at: http://ipm.ucanr.edu/PMG/r783101611.html

DEBARBIEUX L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, Balloy V, Touqui L (2010) Bacteriophages Can Treat and Prevent Pseudomonas aeruginosa Lung Infections. The Journal of Infectious Diseases, by the Infectious Diseases Society of America

DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Endereço eletrônico: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/portaria-no-24-2016-ret-automatico. Acesso em: dezembro de 2021)

DEVOTO, A. E. et al. Megaphages infect Prevotella and variants are widespread in gut microbiomes. Nat. Microbiol. 4, 693–700 (2019).

DIGONNET, C., Martinez, Y., Denance, N., Chasseray, M., Dabos, P., Ranocha,P., Marco, Y., Jauneau, A., and Goffner, D. 2012. Deciphering the route ofRalstonia solanacearumcolonization inArabidopsis thaliana roots during acompatible interaction: Focus at the plant cell wall. Planta 236:1419-143.

DION, M.B., Oechslin, F. & Moineau, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol* 18, 125–138 (2020). https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5

DOLGIN, E., 2019. The secret social lives of viruses. Nature 570, 290–292. https://doi.org/ 10.1038/D41586-019-01880-6.

DOU, C., Xiong, J., Gu, Y. *et al.* Structural and functional insights into the regulation of the lysis–lysogeny decision in viral communities. *Nat Microbiol* 3, 1285–1294 (2018). https://doi.org/10.1038/s41564-018-0259-7

DUBLANCHET A, BOURNE S. The epic of phage therapy. Can J Infect Dis Med Microbiol 2007; 18: 15–18.

DY, R. L., Rigano, L. A. and Fineran, P. C. 2018. Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture. Biochem. Soc. Trans. 46:1605-1613.

EFSA. Scientic opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notied to EFSA (2017–2019). EFSA J. 2020, 18, 56

EHLERS, R.U. Regulation of Biological Control Agents; Springer: Dresden, Germany, 2011.

Elhalag, K., Nasr-Eldin, M., Hussien, A., and Ahmad, A. A. (2018). Potential use of soilborne lytic Podoviridae phage as a biocontrol agent against Ralstonia solanacearum. J. Basic Microbiol. 58, 658–669. doi: 10.1002/jobm.201800039

EL-HENDAWY, H. H., Osman, M. E., & Sorour, N. M. (2005). Biological control of bacterial spot of tomato caused by Xanthomonas campestris pv. vesicatoria by Rahnella aquatilis. Microbiological Research, 160(4), 343–352. doi:10.1016/j.micres.2005.02.008

ELLIS EL, Delbruck M. The growth of bacteriophage. J Gen Physiol 1939;22:365–384

EL-SHIBINY, A.; El-Sahhar, S. Bacteriophages: The possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. Can. J. Microbiol. 2017, 63, 865–879.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. A cultura do tomate. Brasília: Embrapa Hortaliças, [2018]. Disponível em: https://www.embrapa.br/hortalicas/tomate-de-mesa/cultivares2. Acesso em: 03/08/2021

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. A cultura do tomate. Brasília: Embrapa Hortaliças, [2018]. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/91511/1/Manejo-integrado-de-pragas-hortalicas.pdf

FAO. 2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Italy. FAOSTAT. Available http://www.fao.org/faostat/en/#data/ QC/visualize. Accessed September 14, 2020.

FAOSTAT. Roma: FAO, 2019. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#home. Acesso em Agosto de 2021.

FELIPE, V., Romero, A. M., Montecchia, M. S., Vojnov, A. A., Bianco, M. I., & Yaryura, P. M. (2018). Xanthomonas vesicatoria virulence factors involved in early stages of bacterial spot development in tomato. Plant Pathology. doi:10.1111/ppa.12905

FILIPIAK, M, Ło´s, JM, Ło´s, M., 2020. Efficiency of induction of Shiga-toxin lambdoid prophages in Escherichia coli due to oxidative and antibiotic stress depends on the combination of prophage and the bacterial strain. J. Appl. Genet. 61, 131–140.

FOGG PCM, Colloms S, Rosser S, Stark M, Smith MCM. (2014). New applications for phage integrases. J Mol Biol 426: 2703.

FORTIER, L.-C. and Sekulovic, O. 2013. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. Virulence 4:354-365.

FRAMPTON, R.A., Taylor, C., HolguÃn Moreno, A.V., Visnovsky, S.B., Petty, N.K., Pitman, A.R. and Fineran, P.C. (2014) Identification of bacteriophages for the biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen Pseudomonas syringae pv. actinidiae.

FUJIWARA A, Fujisawa M, Hamasaki R, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T (2011) Biocontrol of Ralstonia solanacearum by treatment with lytic bacteriophages. Applied and Environmental Microbiology 77:4155-4162. doi: 10.1128/AEM. 02847-10

GARRITY, G.M., Winters, M., and Searles, D.B. (2001) Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera, Release 1.0. New York: Springer.

Gašić, K., M.M. Ivanović, M. Ignjatov, A. Calić, and A. Obradović. “ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF XANTHOMONAS EUVESICATORIA BACTERIOPHAGES.” *Journal of Plant Pathology* 93, no. 2 (2011): 415–23. http://www.jstor.org/stable/41999013.

GAUR, R.B.; SHARMAM, R.N. Biocontrol of root rot in cotton and compatibility of potential bioagents with fungicides. Indian Journal of Plant Protection, v.38, p.176-182, 2010.

GILL, J.J., Svircev, A.M., Smith, R. and Castle, A.J. (2003) Bacteriophages of Erwinia amylovora. Appl. Environ. Microbiol., 69, 2133.

Greenfield, J.; Shang, X.; Luo, H.; Zhou, Y.; Heselpoth, R.D.; Nelson, D.C.; Herzberg, O. Structure and tailspike glycosidase machinery of ORF212 from E. coli O157:H7 phage CBA120 (TSP3). Sci. Rep. 2019, 9, 7349.

GRIFFIN K, Gambley C, Brown P, Li Y, 2017. Copper-tolerance in Pseudomonas syringae pv. tomato and Xanthomonas spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper. A systematic literature review. Crop Protection 96, 144-50.

GRIFFIN, K., Gambley, C., Brown, P., and Li, Y. (2017). Copper-tolerance in Pseudomonas syringae pv. tomato and Xanthomonas spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper. A systematic literature review. Crop Protoc. 96, 144–150. doi: 10.1016/j.cropro.2017.02.008

GRIMAULT V; ANAIS G; PRIOR P. 1994. Distribution of Pseudomonas solanacearum in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. Plant Pathology 43: 663-668.

GROVER A; AZMI W; GADEWAR AV; PATTANAYAK D; NAIK PS; SHEKHAWAT GS; CHAKRABARTI SK. 2006. Genotypic diversity in a localized population of Ralstonia solanacearum as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. Journal of Applied Microbiology 101: 798-806.

GUDESBLAT, G. E. Torres, P. S., and Vojnov, A. A. (2009). Xanthomonas campestris overcomes Arabidopsis stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. Plant Physiol. 149, 1017–1027. doi: 10.1104/ pp.108.126870.

GUTTMAN, B., Raya, R., & Kutter, E. (2004). Basic Phage Biology. Bacteriophages. doi:10.1201/9780203491751.ch3

HAAS D, Défago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology 3:307-319.

HAMDI, S., Rousseau, G., Labrie, S. *et al.* Characterization of two polyvalent phages infecting *Enterobacteriaceae*. *Sci Rep* **7**, 40349 (2017). https://doi.org/10.1038/srep40349

HERNANDEZ, C.A.; Salazar, A.J.; Koskella, B. Bacteriophage-Mediated Reduction of Bacterial Speck on Tomato Seedlings. PHAGE 2020, 1, 205–212. [CrossRef] [PubMed]

HOLTAPPELS, D., Fortuna, K., Lavigne, R., & Wagemans, J. (2021). The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production. Current Opinion in Biotechnology, 68, 60–71. doi:10.1016/j.copbio.2020.08.016

HOLTAPPELS, D., Lavigne, R., Huys, I., & Wagemans, J. (2019). Protection of Phage Applications in Crop Production: A Patent Landscape. Viruses, 11(3), 277. doi:10.3390/v11030277

HOLTAPPELS, D.; Fortuna, K.; Lavigne, R.; Wagemans, J. The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production. Curr. Opin. Biotechnol. 2020, 68, 60–71.

HORITA, M., and K. Tsuchiya. 2002. Causal agent of bacterial wilt disease Ralstonia solanacearum, p. 5–8. In National Institute of Agricultural Sciences (ed.), MAFF microorganism genetic resources manual no. 12. National Institute of Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan

HORTIFRUTI BRASIL. Anuário 2018/2019. Disponível em: https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-2018-2019.aspx

HOUSBY, J. N., & Mann, N. H. (2009). Phage therapy. Drug Discovery Today, 14(11-12), 536–540.

HOWARD-Varona, C, Hargreaves, KR, Abedon, ST, Sullivan, MB., 2017. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. ISME J. 11, 1511–1520. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16.

HUA, J. et al. Capsids and genomes of jumbo-sized bacteriophages reveal the evolutionary reach of the HK97 fold. mBio 8, e01579-17 (2017).

HUNGARO H.M.; LOPEZ M.E.S.; ALBINO L.A.A. & MENDONÇA R.C.S, Bacteriophage: The Viruses Infecting Bacteria and Their Multiple Applications, Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-409548-9.09039-4. 2014.

HYMAN P, Abedon ST. Bacteriophage host range and bacterial resistance. Adv Appl Microbiol 2010; 70:217-48; PMID:20359459; http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA). Sistema de contas nacionais. Disponível em: https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas.https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2020_set.pdf Acesso em Agosto Novembro de 2021.

Immunologiae Et Therapiae Experimentalis-English Edition- 51(4), 237-244, 2003.

INAL, J. M. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. Archivum

IRIARTE FB, Balogh B, Momol MT, et al. Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. Appl Environ Microbiol. 2007;73(6):1704–1711.

JACKSON, L.E. Bacteriophage Prevention and Control of Harmful Plant Bacteria. U.S. Patent 4828999, 9 May 1989.

Jakočiūnė, Džiuginta; Moodley, Arshnee (2018). A Rapid Bacteriophage DNA Extraction Method. Methods and Protocols, 1(3), 27−. doi:10.3390/mps1030027

JIAYU Shang, Jingzhe Jiang, and Yanni Sun. Bacteriophage classification for assembled contigs using Graph Convolutional Network. arXiv preprint arXiv:2102.03746, 2021.

JONES, J. B.; Pohronezny, K. L.; Stall, R. E.;Jones, J. P. Survival of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. Phytopathology, Saint Paul, v. 76, n. 4, p. 430-434, 1986.

JONES, J. B.; SOMODI, G. C.; SCOTT, J. W. Increased ELISA sensitivity using a modified extraction buffer for detection of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria in leaf tissue. Journal of Applied Microbiology, Daners, v. 83, p. 397-401, 1997.

JONES, J.B., Vallad, G.E., Iriarte, F.B., ObradoviÄ‡, A., Wernsing, M.H., Jackson, L.E., Balogh, B., Hong, J.C. and Momol, M. (2012) Considerations for using bacteriophages for plant disease control. Bacteriophage, 2, 208-214.

JONES, J.B.; BOUZAR, H.; STALL, R.E.; ALMIRA, E.C.; ROBERTS, P.D.; BOWEN, B.W.; SUDBERRY, J.; STRICKLER, P.M.; CHUN, J. Systematic analysis of xanthomonads (Xanthomonas spp.) associated with pepper and tomato lesions. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.50, p.1211-1219, 2000.

JONES, J.B.; Jackson, L.E.; Balogh, B.; Obradovic, A.; Iriarte, F.B.; Momol, M.T. Bacteriophages for plant disease control. Annu. Rev. Phytopathol. 2007, 45, 245–262.

JONES, R. A. (1986). THE DEVELOPMENT OF SALT-TOLERANT TOMATOES: BREEDING STRATEGIES. Acta Horticulturae, (190), 101–114. doi:10.17660/actahortic.1986.190.8

JONSSON, C. M.; CASTRO, V. L. S. S. de; SILVA, C. M. M.; MAIA, A. de H. N.Avaliação da segurança da introdução de Pseudomonas putida no ambiente: testes ecotoxicológicos da Fase 1 e perspectivas de implementação de novos estudos. Embrapa Meio Ambiente. ISSN 11516 - 4675 Novembro, 2011.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. Phytopathology, v.60, p.96-97, 1970.

Kawasaki, T.; Shimizu, M.; Satsuma, H.; Fujiwara, A.; Fujie, M.; Usami, S.; Yamada, T. (2009). *Genomic Characterization of Ralstonia solanacearum Phage RSB1, a T7-Like Wide-Host-Range Phage. Journal of Bacteriology, 191(1), 422–427.* doi:10.1128/JB.01263-08

KEEN, E. C. (2014). A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. BioEssays, 37(1), 6–9. doi:10.1002/bies.201400152

KELMAN, A. 1954. The relationship of pathogenicity in Pseudomonas solanacearum to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44: 693-695.

KENNELLY, M. M., Cazorla, F. M., de Vicente, A., Ramos, C., and Sundin, G. W. (2007). Pseudomonas syringae diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. Plant Dis. 91, 4–17. doi: 10.1094/pd-91-0004

KERING, K.K.; Kibii, B.J.; Wei, H. Biocontrol of phytobacteria with bacteriophage cocktails. Pest. Manag. Sci. 2019, 75, 1775–1781.

Kim SH, Adeyemi DE, Park MK. Characterization of a New and Efficient Polyvalent Phage Infecting *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Shigella sonnei*. Microorganisms. 2021 Oct 6;9(10):2105. doi: 10.3390/microorganisms9102105. PMID: 34683426; PMCID: PMC8540833.

KIMURA, O. 1984. Melhoramento do pimentão visando à resistência à "pústula bacteriana". Informe Agropecuário 10(113):41-44.

KIZHEVA, Y., Eftimova, M., Rangelov, R., Micheva, N., Urshev, Z., Rasheva, I., & Hristova, P. (2021). Broad host range bacteriophages found in rhizosphere soil of a healthy tomato plant in Bulgaria. Heliyon, 7(5), e07084. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07084

KOTILA, J.E.; Coons, G.H. Investigations on the Blackleg Disease of Potato; Michigan State University. Agricultural Experiment Station: Urbana, IL, USA, 1925; pp. 3–29.

KROPINSKI, A. M. (2017). Practical Advice on the One-Step Growth Curve. Bacteriophages, 41–47. doi:10.1007/978-1-4939-7343-9_3

KRUPOVIC, M. & ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Plasmaviridae. J. Gen. Virol. 99, 617–618 (2018). Available at: (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases). Acesso em agosto de 2021.

Krupovic, M., Turner, D., Morozova, V. *et al.* Bacterial Viruses Subcommittee and Archaeal Viruses Subcommittee of the ICTV: update of taxonomy changes in 2021. *Arch Virol* 166, 3239–3244 (2021). https://doi.org/10.1007/s00705-021-05205-9

KUMAR, J. S., Umesha, S., Prasad, K. S., & Niranjana, P. (2015). *Detection of Quorum Sensing Molecules and Biofilm Formation in Ralstonia solanacearum. Current Microbiology.* doi:10.1007/s00284-015-0953-0.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do Tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) Manual de fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v.2. p.607-626. 2005.

KURYLOWICZ, W. 1981. Antibióticos – Uma revisão crítica. Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 341p.

LABRIE, Simon J., Julie E. Samson, Sylvain Moineau. Bacteriophage resistance mechanisms. Nature Reviews | Microbiology, Vol. 8, March, 2010.

Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola, LSPA- IBGE, 2021.

LINS JUNIOR, J. C. MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS NA CULTURA DO TOMATE: UMA ESTRATÉGIA PARA A REDUÇÃO DO USO DE AGROTÓXICOS. Extensão em Foco (ISSN: 2317-9791), [S. l.], v. 7, n. 1, p. 6-22, 2019. Disponível em:

https://45.238.172.12/index.php/extensao/article/view/2070. Acesso em: 15 ago. 2021.

LOC-CARRILLO C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. Bacteriophage. 2011;1(2):111–114

LOPES, C. A. et al, 2005Doenças do tomateiro / organizadores. Carlos Alberto Lopes. Antônio Carlos de Ávila: autores. Carlos Alberto Lopes let al .J. - Brasilia Embrapa Hortaliças. 2005.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A.M. Doenças bacterianas. In: LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. Doenças do tomateiro. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p.53-74.

LOPES, C.A.; REIS, A.; ÁVILA, A.C. Principais doenças do tomate para a mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. Informe Agropecuário, v.24, n.219, p.66-78, 2003).

LOPES, CA; BOITEUX, LS; ESCHEMBACK, V. 2015. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. Horticultura Brasileira 33: 125-130.

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 9:1228. doi: 10.3389/ fmicb.2018.01228.

ŁOŚ, M., & WĘGRZYN, G. (2012). Pseudolysogeny. Advances in Virus Research, 339–349. doi:10.1016/b978-0-12-394621-8.00019-4

M, TULIO Pardini G, Silva, B L, Aguiar, A LA Elisa Soto, L M, 2017. Bacteriophage genome sequencing: a new alternative to understand biochemical interactions between prokaryotic cells and phages. J. Microb. Biochem. Technol. https://doi.org/ 10.4172/1948-5948.1000362

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAKKY, S., Dawoud, A., Safwat, A., Abdelsattar, A. S., Rezk, N., & Shibiny, A. E. (2021). The Bacteriophage Decides Own tracks: When They are with or Against The Bacteria. Current Research in Microbial Sciences, 100050. doi:10.1016/j.crmicr.2021.100050

MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; RODRIGUES NETO, J. Controle de doenças causadas por bactérias em tomateiro. In: CATELLANE, P.D.; BRAS, L.T.;CHURATA-MASCA, M.G.C. (Coords.). ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DE TOMATE, Anais.Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.165.

MALLMANN, W., and Hemstreet, C. (1924). Isolation of an inhibitory substance from plants. Agric. Res. 28, 599–602

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2007). Agrofit – Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/agrofit. Acesso em 13 de maio de 2021.

MARCO, G. M.; STALL, R. E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria that differ in sensitivity to copper. Plant Disease 67(7):779-781

MASSEY, R.E. Studies on blackarm disease of cotton III. Empire Cotton Grow. Rev. 1934, 11, 188–193

MATES, A. K. ; PONTES, N. C.; Halfeld-Vieira, Bernardo de Almeida . Bacillus velezensis GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. BIOLOGICAL CONTROL, v. 137, p. 104013, 2019.

MAYER G**.** Bacteriologia – Capítulo sete. Bacteriófago**.** Microbiologia e imunologia online. Escola de medicina da Universidade da Carolina do Sul. Disponível em: https://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter_7_bp.htm Acesso em 29 /10/2021.

MEADEN, S.; Koskella, B. Exploring the risks of phage application in the environment. Front. Microbiol. 2013, 4, 358.

MEDEIROS, R. F; CAVALCANTE, L.F.; MESQUITA, O.F. et al. Crescimento inicial do tomateiro-cereja sob irrigação com águas salinas em solo com biofertilizantes bovino. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 15, n. 5, p. 505-511, 2011.

Mendez, J., Jofre, J., Lucena, F., Contreras, N., Mooijman, K., and Araujo, R. (2002) Conservation of phage reference materials and water samples containing bacteriophages of enteric bacteria. J. Virol. Methods 106, 215–224.

MERABISHVILI, M.; Pirnay, J.P.; De Vos, D. Guidelines to Compose an Ideal Bacteriophage Cocktail. Methods Mol. Biol. 2018, 1693, 99–110.

MORELLA NM, Gomez AL, Wang G, Leung MS, Koskella B: The impact of bacteriophages on phyllosphere bacterial abundance and composition. Mol Ecol 2018, 27:2025-2038

MOURA, A.B.; OLIVEIRA, J.R. Doenças causadas por bactérias em tomateiro. InformeAgropecuário, v.18, n.184, p.15-18, 1996.

MOURA, A.P.; MICHEREFF FILHO, M.; GUIMARÃES, J.A. et al. Manejo integrado de pragas do tomateiro para processamento industrial. Brasília: Embrapa Hortaliças. Circular Técnica 129, 24p. 2014.

Muller-Xing, Ralf; Xing, Qian; Goodrich, Justin (2014). *Footprints of the sun: memory of UV and light stress in plants. Frontiers in Plant Science, 5(), –.* doi:10.3389/fpls.2014.00474

MUNIESA, M.; Colomer-Lluch, M.; Jofre, J. Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. Future Microbiol. 2013, 8, 739–751

NAGY, J., Király, L., & Schwarczinger, I. (2012). Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. Open Life Sciences, 7(1), 1–12. doi:10.2478/s11535-011-0093-x

NAKAHO, K; INOUE, H; TAKAYAMA, T; MIYAGAWA, H. 2004. Distribution and multiplication of Ralstonia solanacearum in tomato plants with resistance derived from different origins. Journal of General Plant Pathology 70: 115-119.

Nakayinga, R., Makumi, A., Tumuhaise, V. *et al. Xanthomonas* bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. *BMC Microbiol* 21, 291 (2021). https://doi.org/10.1186/s12866-021-02351-7

Nazir, A., Dong, Z., Liu, J. *et al.* Genomic analysis of bacteriophage Xoo-sp13 infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Arch Virol* 166, 1263–1265 (2021). https://doi.org/10.1007/s00705-021-04985-4

NGUYEN MT, Ranamukhaarachchi SL. 2010. Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by Ralstonia solanacearum in tomato and pepper. J Plant Path. 92(2):395–406.

NINOVE, L., NOUGAIREDE, A., GAZIN, C., THIRION, L., DELOGU, I., ZANDOTTI, C., CHARREL, R. N., DE LAMBALLERIE, X. RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests. PLoS One, 6(2), e16142, 2011.

OBRADOVIC A, Jones J, Momol M, Balogh B, Olson S, 2004. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. Plant Disease 88, 736-40.

ODEGARD, I. Y. R., & van der Voet, E. (2014). The future of food — Scenarios and the effect on natural resource use in agriculture in 2050. Ecological Economics, 97, 51–59. doi:10.1016/j.ecolecon.2013.10.00

OKABE, N.; Goto, M. Bacteriophages of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 1963, 1, 397–418. [CrossRef].

PAN, Z.C.; Xu, J.S.; Prior, P.; Zhang, H.; Chen, K.Y.; Tian, Q.; Zhang, L.Q.; Liu, L.; He, L.Y.; Feng, J. Development of a specific molecular tool for the detection of epidemiologically active mulberry causingdisease strains of Ralstonia solanacearum phylotype I (historically race 5-biovar 5) in China. Eur. J. Plant Pathol. 2013, 137, 377–391, doi:10.1007/s10658-013-0249-9.

PAPAIANNI, M., Paris, D., Woo, S. L., Fulgione, A., Rigano, M. M., Parrilli, E., … Capparelli, R. (2020). Plant Dynamic Metabolic Response to Bacteriophage Treatment After Xanthomonas campestris pv. campestris Infection. Frontiers in Microbiology, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.00732

PAUDEL, S., Dobhal, S., Alvarez, A. M., & Arif, M. (2020). Taxonomy and Phylogenetic Research on Ralstonia solanacearum Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. Pathogens, 9(11), 886. doi:10.3390/pathogens9110886

Peter Abrahamian;Jeannie M. Klein-Gordon;Jeffrey B. Jones;Gary E. Vallad; (2021). *Epidemiology, diversity, and management of bacterial spot of tomato caused by Xanthomonas perforans . Applied Microbiology and Biotechnology, (), –.* doi:10.1007/s00253-021-11459-9

PONTES NC, Moita AW, Quezado-Duval AM (2012) Estabilidade da resistência de 'Ohio 8245' e 'Heinz 9553' à mancha bacteriana do tomateiro. - Horticultura Brasileira 30:99- 105

POTNIS N, Timilsina S, Strayer A*, et al.*, 2015. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse Xanthomonas species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Mol Plant Pathol* **16**, 907-20.

PRAGAS: Hortaliças. Goiânia: UFG; Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007. p. 349-362.

Pramila Devi Umrao;Vineet Kumar;Shilpa Deshpande Kaistha; (2021). Biocontrol potential of bacteriophage ϕsp1 against bacterial wilt-causing Ralstonia solanacearum in Solanaceae crops . Egyptian Journal of Biological Pest Control, (), –. doi:10.1186/s41938-021-00408-3

PRÍNCIPE, A., Fernandez, M., Torasso, M., Godino, A., & Fischer, S. (2018). Effectiveness of tailocins produced by Pseudomonas fluorescens SF4c in controlling the bacterial-spot disease in tomatoes caused by Xanthomonas vesicatoria. Microbiological Research, *212-213, 94–102.* doi:10.1016/j.micres.2018.05.010

QUEZADO-DUVAL AM, Lopes CA (2010) Mancha bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. Circular Técnica (Embrapa Hortaliças) 84:1-24

QUEZADO-DUVAL, A. M;Lopes, C. A;Leite Júnior, R. P.; Lima, M. F.;Camargo, L. E. A. Diversity of Xanthomonas spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. Acta Horticulturae, The Hague, n. 695, p. 101- 108, 2004a.

QUEZADO-DUVAL, A.M; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R.P.; CAMARGO, L.E.A. 2003. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em Xanthomonas spp. Associadas à mancha bacteriana do tomate para processamento industrial. Horticultura Brasileira 21(4):670-675.

RAMÍREZ, M., Neuman, B. W. Ramírez, C. A. (2020). Bacteriophages as promising agents for the biological control of Moko disease (Ralstonia solanacearum) *of banana. Biological Control, 149, 104238.* doi:10.1016/j.biocontrol.2020.104

RAMKISSOON, A., Francis, J., Bowrin, V., Ramjegathesh, R., Ramsubhag, A., & Jayaraman, J. (2016). Bio-efficacy of a chitosan based elicitor onAlternaria solaniandXanthomonas vesicatoriainfections in tomato under tropical conditions. Annals of Applied Biology, 169(2), 274–283. doi:10.1111/aab.12299.

REGO, Erica & Pinheiro, Tatiana & Antonino, José & Alves, Gabriel & Cotta, Michelle & Fonseca, Fernando & Miller, Robert. (2019). Stable reference genes for RT-qPCR analysis of gene expression in the Musa acuminata-Pseudocercospora musae interaction. Scientific Reports. 9. 14592. 10.1038/s41598-019-51040-z.

Rice, C., Kelly, S.A., O'Brien, S.C., Melaugh, E.M., Ganacias, J.C., Chai, Z., Gilmore, B.F., & Skvortsov, T.A. (2021). Novel Phage-Derived Depolymerase with Activity against Proteus mirabilis Biofilms. *Microorganisms, 9*.

RICK, C.M. The potencial of exotic germplasm for tomato improvement. In: VASIL, I.K.; SCOWCROFT, W.R.; FREY, H.J. (Eds.) Plant improvement and somatic cell genetics. New York: Acad. Press, p. 478-495, 1982.

ROACH R, Mann R, Gambley C, Shivas R, Rodoni B, 2017. Identification of Xanthomonas species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 1-14.

ROSSI, L.P.R. and Almeida, R.C.C. (2010) Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 69, 151-156.

SAHIN, F. Detection, identification and characterization of strains of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria by traditional and molecular methods, and resistance in Capsicum species to Xanthomonas campestris pv. vesicatoria pepper race 6. Columbus, 20071997. 182 f. Thesis (Ph.D.) - The Ohio State University.

SAMBROOK J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. (3rd ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

SAMUEL, M.S., Sivaramakrishna, A. & Mehta, A. Bioremediation of p-Nitrophenol by *Pseudomonas putida* 1274 strain. *J Environ Health Sci Engineer* **12**, 53 (2014). https://doi.org/10.1186/2052-336X-12-53

SANTOS, J.P. Principais pragas e seu controle. In: BECKER, W.F.; WAMSER, A.F.; FELTRIM, A.L.; SUZUKI, A.; SANTOS, J.P.; VALMORBIDA, J.; HAHN, L.; MARCUZZO, L.L; MUELLER, S. Sistema de produção integrada para o tomate tutorado em Santa Catarina. Florianópolis: Epagri, p. 105-124, 2016.

SANTOS, M. A. (1991). An improved method for the small scale preparation of bacteriophage DNA based on phage precipitation by zinc chloride. Nucleic Acids Research, 19(19), 5442–5442. doi:10.1093/nar/19.19.5442

SCHWARCZINGER, I., Kolozsváriné Nagy, J., Künstler, A. et al. Characterization of Myoviridae and Podoviridae family bacteriophages of Erwinia amylovora from Hungary - potential of application in biological control of fire blight. Eur J Plant Pathol 149, 639–652 (2017). https://doi.org/10.1007/s10658-017-1214-9

SILVA VL, Lopes CA (1995) Populações epifíticas de Pseudomonas syringae pv. tomato em cultivo comercial de tomateiro industrial. Fitopatologia Brasileira 20:179-183.

Silva, Débora AG da; Rocha, Mariella C; Carvalho, Aldir de O de; Fernandes, Maria do Carmo A; Carmo, Margarida Goréte F do (2006). *Efeito de produtos químicos e biológicos sobre a mancha bacteriana, flora microbiana no filoplano e produtividade de pimentão. Horticultura Brasileira, 24(2), 134–140.* doi:10.1590/s0102-05362006000200002

SILVA, MAS, Carmo MGF, Olivares FL, Pereira AJ (2002) Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de Xanthomonas campestris pv. vesicatoria e efeitos sobre a semente. Fitopatologia Brasileira 27:586-593

SILVA-LOBO, V.L.; LOPES, C.A.; GIORDANO, L.B. 2005. Componentes da resistência à mancha bacteriana e crescimento de Xanthomonas campestris pv. vesicatoria, raça T2, em genótipos de tomateiro. Fitopatologia Brasileira 30:17-20.

SIMS, W.L. History of tomato production for industry around the world. Acta Horticulturae, Leuven, v.100, p.25-26, 1980.

STALL RE, 1995. Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. *RPS US Singh and K. Kohmoto,* Editors, Pathogenesis and host–parasite specificity in plant diseases. Prokaryotes **1**, 167-84.

STALL, R. E.;Gottwald, T. R.; Koizumi, M.;Schaad, N. C. Ecology of plant pathogenic xanthomonads. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.). Xanthomonas. London: Chapman & Hall, 1993. p. 265-299.

STEFANI, E. Biosafety and agro-environmental concerns related to the use of bacterial biocontrol agents in crop protection. J. Plant. Pathol. 2016, 98 (Suppl. 4), 31–32.

STEFANI, E., Obradović, A., Gašić, K., Altin, I., Nagy, I. K. & Kovács, T. (2021). Bacteriophage-Mediated Control of Phytopathogenic Xanthomonads: A Promising Green Solution for the Future. Microorganisms, 9(5), 1056. doi:10.3390/microorganisms9051056

STOCKINGER EJ, Walling LL (1994) Pto3 and Pto 4: Novel genes from Lycopersicon hirsutum var. glabrattum that confer resistance to Pseudomonas syringae pv. tomato. Theoretical and Applied Genetics 89:879-994.

STOREY, M.V.; Ashbolt, N.J. Persistence of two model enteric viruses (B40-8 and MS-2 bacteriophages) in water distribution pipe biofilms. Water Sci. Technol. 2001, 43, 133–138.

STRAYER AL, Jeyaprakash A, Minsavage GV*, et al.*, 2016. A Multiplex Real-Time PCR Assay Differentiates Four Xanthomonas Species Associated with Bacterial Spot of Tomato. *Plant Disease* **100**, 1660-8.

SULAKVELIDZE A, Alavidze Z, Morris JG (2001) Bacteriophage therapy. - Antimicrob Agents Chemotherapy, 45:649-659

SUNDIN GW, Castiblanco LF, Yuan X, et al. Bacterial disease management: Challenges, experience, innovation and future prospects. Mol Plant Pathol. 2016; 17(9):1506– 1518

SUNDIN, G.W.; Wang, N. Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 2018, 56, 161–180. [CrossRef]

TAYLOR, M. W. (2014). The Discovery of Bacteriophage and the d'Herelle Controversy. Viruses and Man: A History of Interactions, 53–61. doi:10.1007/978-3-319-07758-1_4

Thapa Magar, R., Lee, S.Y., Kim, H. *et al.* Biocontrol of bacterial wilt in tomato with a cocktail of lytic bacteriophages. *Appl Microbiol Biotechnol* 106, 3837–3848 (2022). https://doi.org/10.1007/s00253-022-11962-7

THOMAS, R. (1935). A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn. Phytopathology 25, 371–372.

TONG, Y.; Brister, J.R.; et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018–2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. Arch. Virol. 2020, 165, 1253–1260.

TOPKA G, BLOCH S, NEJMAN-FALENCZYK B, G ˛asior T, Jurczak-Kurek A, Necel A, Dydecka A, Richert M, W ˛egrzyn G and W ˛egrzyn A (2019). Characterization of Bacteriophage vB-EcoS-95, Isolated From Urban Sewage and Revealing Extremely Rapid Lytic Development. Front. Microbiol. 9:3326. doi: 10.3389/fmicb.2018.03326

Trotereau, A., Boyer, C., Bornard, I. *et al.* High genomic diversity of novel phages infecting the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*, isolated in Mauritius and Reunion islands. *Sci Rep* 11, 5382 (2021). https://doi.org/10.1038/s41598-021-84305-7

TURNER, M., Jauneau, A., Genin, S., Tavella, M. J., Vailleau, F., Gentzbittel, L.,and Jardinaud, M. F. 2009. Dissection of bacterial wilt onMedicagotruncatularevealed two type III secretion system effectors acting on rootinfection process and disease development. Plant Physiol. 150:1713-1722.

TWORT, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. Lancet, 2, 1241–1243

Umrao, P.D., Kumar, V. & Kaistha, S.D. Biocontrol potential of bacteriophage ϕsp1 against bacterial wilt-causing *Ralstonia solanacearum* in Solanaceae crops. *Egypt J Biol Pest Control* 31, 61 (2021). https://doi.org/10.1186/s41938-021-00408-3

US LABEL Agriphage. United States Environmental Protection Agency Washington, D.C. 20460.

VASSE, J., Frey, P., and Trigalet, A. (1995). Microscopic Studies of Intercellular Infection and Protoxylem Invasion of Tomato Roots by Pseudomonas Solanacearum. Available at: https://pubag.nal.usda.gov/catalog/1443867

VASSE, J., Frey, P., and Trigalet, A. 1995. Microscopic studies of intercellularinfection and protoxylem invasion of tomato roots byPseudomonas Sol-anacearum. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:241-25.

VILLAS BÔAS, G.L.; MELO, P.E.; CASTELO BRANCO, M.; GIORDANO, L.B.; MELO, W.F. Desenvolvimento de um modelo de produção integrada de tomate indústria – PITI. In: Zambolim, L.; Lopes, C. A.; Picanço, M. C.; Costa, H. (Ed.). Manejo Integrado de Doenças

VON MAGNUS P. Incomplete forms of inluenza virus. Adv Virus Research 1954;2:59–78. Fields Virology, 6th Edition Edited by David M. Knipe and Peter M. Howley. Philadelphia, PA, USA. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 2384 pp

Walker, P.J., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J. *et al.* Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Arch Virol* **167**, 2429–2440 (2022). https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5

WANG, X., Wei, Z., Yang, K., Wang, J., Jousset, A., Xu, Y., … Friman, V.-P. (2019). Phage combination therapies for bacterial wilt disease in tomato. Nature Biotechnology. doi:10.1038/s41587-019-0328-3

WATTS, G. (2017). Phage therapy: revival of the bygone antimicrobial. The Lancet, 390(10112), 2539–2540. doi:10.1016/s0140-6736(17)33249-x

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiol Rev.;28(2):127-81. May, 2004.

WILLIAMS, S.T.; Mortimer, A.M.; Manchester, L. Ecology of soil bacteriophages. In Phage Ecology; Goyal, S.M., Gerba, C.P., Bitton, G., Eds.; John Wiley and Sons: New York, NY, USA, 1987; pp. 157–179.

WILLIAMSON, SJ, Houchin, LA, McDaniel, L, Paul, JH., 2002. Seasonal variation in lysogeny as depicted by prophage induction in Tampa Bay, Florida. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4307–4314. https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4307-4314.2002.

XIN, X.-F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae: what it takes to be a pathogen. Nature Reviews Microbiology, 16(5), 316–328.* doi:10.1038/nrmicro.2018.17

YABUUCHI, Eiko; Kosako, Yoshimasa; Yano, Ikuya; Hotta, Hisako; Nishiuchi, Yukiko (1995-11-01). "Transfer of Two Burkholderia and An Alcaligenes Species to Ralstonia Gen. Nov". Microbiology and Immunology. 39 (11): 897–904. doi:10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x. ISSN 1348-0421. PMID 8657018.

YAMADA, T., Kawasaki, T., Nagata, S., Fujiwara, A., Usami, S., & Fujie, M. (2007). New bacteriophages that infect the phytopathogen Ralstonia solanacearum. Microbiology, 153(8), 2630–2639. doi:10.1099/mic.0.2006/001453-0

YE, M., Sun, M., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, S., … Jiao, W. (2019). A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. Environment International, 129, 488–496. doi:10.1016/j.envint.2019.05.062

Yoana Kizheva; Melani Eftimova;Radoslav Rangelov;Neli Micheva;Zoltan Urshev;Iliyana Rasheva;Petya Hristova; (2021). *Broad host range bacteriophages found in rhizosphere soil of a healthy tomato plant in Bulgaria . Heliyon, (), –.* doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07084

YOUNG, R., 2014. Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. J. Microbiol. https://doi.org/10.1007/s12275-014-4087-z.

YUAN, Y. & Gao, M. Jumbo bacteriophages: an overview. Front. Microbiol. 8, 1–9 (2017).

YULIAR, Nion, Y. A., and Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by Ralstonia solanacearum. Microbes Environ. 30, 1–11. doi: 10.1264/jsme2.me14144.;

Zerbini, F.M., Siddell, S.G., Mushegian, A.R. *et al.* Differentiating between viruses and virus species by writing their names correctly. *Arch Virol* **167**, 1231–1234 (2022). https://doi.org/10.1007/s00705-021-05323-4.

ZUO, Z., Gong, T., Che, Y. *et al.* Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for simultaneous degradation of organophosphates and pyrethroids and its application in bioremediation of soil. *Biodegradation* **26**, 223–233 (2015). https://doi.org/10.1007/s10532-015-9729-2.

ANEXOS

ANEXO A

Figura 22 - Parâmetros de crescimento e viabilidade da bactéria RS705

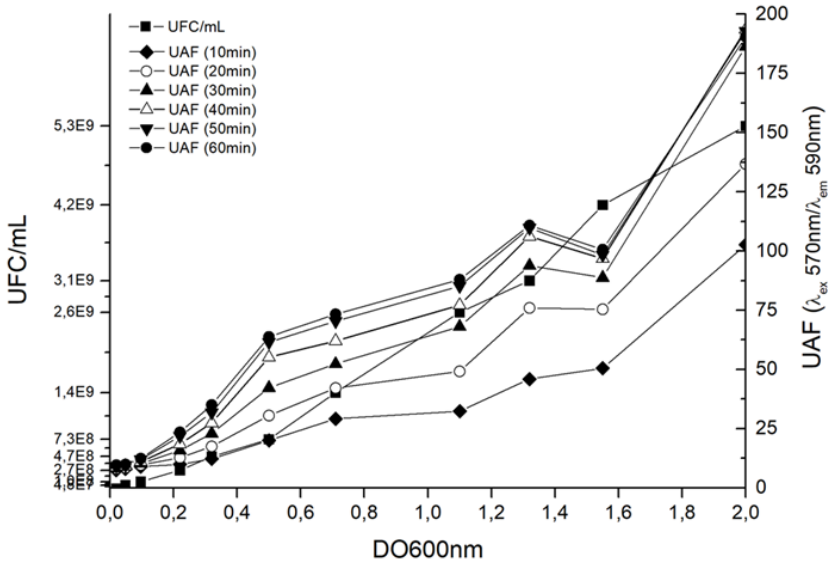
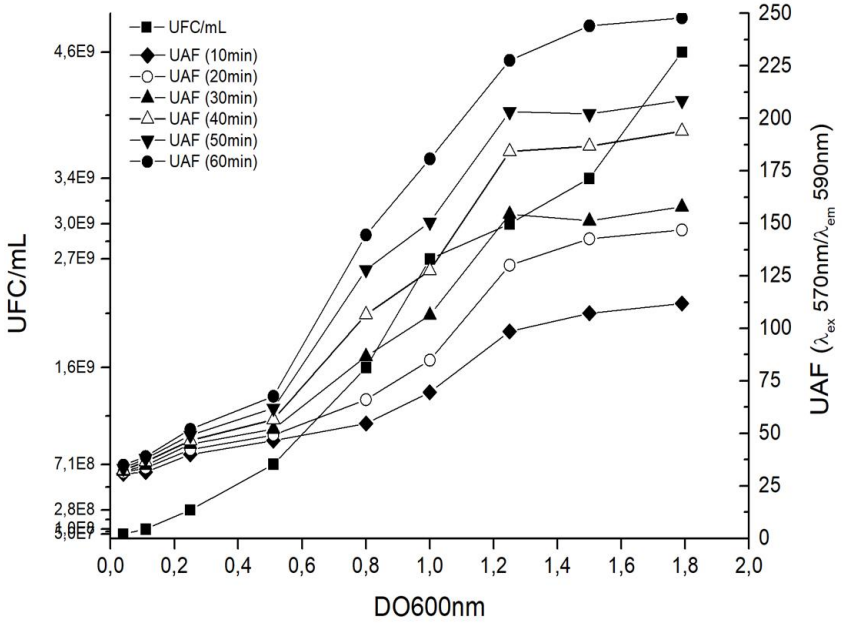


Figura 23 - Parâmetros de crescimento e viabilidade da bactéria IS3FMA.



ANEXO B

Tabela 3 - Espectro de hospedeiros dos fagos B3 e X1 expresso pela formação ou não de placas de lise sobre camada uniforme das espécies bacterianas fornecidas pela EMBRAPA. Os hospedeiros foram sensíveis (+) ou insensíveis (-) aos fagos.

Bactérias (EMBRAPA)	Fago B3	Fago X1
EH_PSD 320	-	-
EH_ 2015-56	-	-
EH_ 2015-90	-	-
RS639	+	-
RS672	+	-
RS683	+	-
RS705	+	-

FONTE: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 -Espectro de hospedeiros dos fagos B3 e X1 expresso pela formação ou não de placas de lise sobre camada uniforme das espécies bacterianas isoladas das coletas. Os hospedeiros foram sensíveis (+) ou insensíveis (-) aos fagos

Isoladas da coleta (caule e folhas)	Fago B3	Fago X1
IS1FMA	-	-
IS2FMA	-	-
IS3FMA	-	-
IS4FMA	-	-
IS5FMA	-	-
IS1CMU	+	-
IS1.1CMU	+	-
IS2CMU	-	-
IS3CMU	-	-

FONTE: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Espectro de hospedeiros dos fagos B3 e X1 expresso pela formação ou não de placas de lise sobre camada uniforme das espécies bacterianas isoladas das coletas. Os hospedeiros foram sensíveis (+) ou insensíveis (-) aos fagos.

Isoladas da coleta (solo)	Fago B3	Fago X1
BAC1	-	-
BAC2	-	-
BAC3	-	-
BAC4	-	-
BAC5	-	-
BAC6	-	-
BAC7	-	-
BAC8	-	-
BAC9	-	-
BAC10	-	-

FONTE: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 - Espectro de hospedeiros dos fagos B3 e X1 expresso pela formação ou não de placas de lise sobre camada uniforme das espécies bacterianas pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA - UFMG). Os hospedeiros foram sensíveis (+) ou insensíveis (-) aos fagos.

Bactérias LMA	Fago B3	Fago X1
Streptomyces griseus	-	-
Serratia marcescens	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-
Ochrobactrum intermedium	-	-
Mycobacterium liquefaciens	-	-

FONTE: Elaborado pelo autor.

ANEXO C

Tabela 7 – Tabela das análises estatísticas (ANOVA Two-way) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para os dados de pH do fago B3.

Fonte	GL	SQ(Aj.)	QM(Aj.)	Valor F	Valor-P
pH	6	567,866	94,644	86,81	0,000
Tempo	5	102,387	20,4775	18,78	0,000
Erro	114	124,282	1,090		
Falta de ajuste	30	121,456	4,0485	120,32	0,000
Erro puro	84	2,826	0,0336		
Total	125	794,536			

Tabela 8 – Tabela das análises estatísticas (ANOVA Two-way) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para os dados de pH do fago X1.

Fonte	GL	SQ(Aj.)	QM(Aj.)	Valor F	Valor-P
pH	5	3,794	0,7587	20,30	0,000
Tempo	6	7,015	1,1691	31,28	0,000
Erro	114	4,260	0,0373		
Falta de ajuste	30	1,730	0,0576	1,91	0,010
Erro puro	84	2,530	0,0301	*	*
Total	125	15,069			

Tabela 9 – Tabela das análises estatísticas (ANOVA Two-way) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para os dados de temperatura do fago B3.

Fonte	GL	SQ(Aj.)	QM(Aj.)	Valor F	Valor-P
Temperatura	2	2,2406	1,1203	12,02	0,000
Tempo	3	8,0630	2,6876	28,83	0,000
Erro	30	2,7968	0,0932		
Falta de ajuste	6	2,5223	0,4203	36,75	0,000
Erro puro	24	0,2745	0,01144	*	*
Total	35	13,1004			

Tabela 10 – Tabela das análises estatísticas (ANOVA Two-way) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para os dados de temperatura do fago X1.

Fonte	GL	SQ(Aj.)	QM(Aj.)	Valor F	Valor-P
Temperatura	2	0,0909	0,0454	2,25	0,000
Tempo	3	0,8448	0,2816	13,92	0,1487
Erro	30	0,6067	0,0202		
Falta de ajuste	6	0,0786	0,0131	0,60	0,7308
Erro puro	24	0,5281	0,0220	*	*
Total	35	1,5425			