

Mestrado

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - PRÓ-REITORIA DE PESQUISA,
PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM OLERICULTURA

Dayane Maria de Sousa

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTERIÓFAGOS COM FOCO NA SUA UTILIZAÇÃO
PARA O CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO
TOMATEIRO

Autor: Dayane Maria de Sousa
Orientador: Dr. Nadson de Carvalho Pontes

2020

MORRINHOS-GO
2020

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS MORRINHOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OLERICULTURA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTERIÓFAGOS COM FOCO NA SUA UTILIZAÇÃO
PARA O CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO
TOMATEIRO

Autor: Dayane Maria de Sousa
Orientador: Dr. Nadson de Carvalho Pontes

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM OLERICULTURA, ao Programa de Pós-Graduação em Olericultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Morrinhos - Área de Concentração Olericultura.

MORRINHOS-GO
2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Si Sousa, Dayane Maria

 Isolamento e Caracterização de Bacteriófagos com
 foco na sua utilização para o controle da Mancha
 Bacteriana do Tomateiro / Dayane Maria
 Sousa; orientador Nadson Carvalho Pontes. --
 Morrinhos, 2020.

 Dissertação (em MESTRADO PROFISSIONAL EM
 OLERICULTURA) -- Instituto Federal Goiano,
 Campus Morrinhos, 2020. 37 p.

 1. Solanum lycopersicum L.,. 2. Xanthomonas
 spp.,. 3. controle biológico. 4. vírus. I. Carvalho
 Pontes, Nadson, orient. II. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO
IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Dayane Maria de Sousa

Matrícula: 2018104330410076

Título do Trabalho:

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS COM FOCO NA SUA UTILIZAÇÃO PARA O CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: ____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: //

- | | | |
|--|------------------------------|------------------------------|
| O documento está sujeito a registro de patente? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| O documento pode vir a ser publicado como livro? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Morrinhos, 24 de agosto de 2020.

Dayane Maria de Sousa
Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Assinado eletronicamente

Nadson de Carvalho Pontes
Assinatura do(a) orientador(a)

Documento assinado eletronicamente por:

- Nadson de Carvalho Pontes, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 24/08/2020 18:30:54.
- Dayane Maria de Sousa , 201810433040076 - Discente, em 24/08/2020 18:30:12.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 24/08/2020. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 178548
Código de Autenticação: 8482663994



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Morrinhos
Rodovia BR-153, Km 633, Zona Rural, None, MORRINHOS / GO, CEP 75650-000
(64) 3413-7900



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
CAMPUS MORRINHOS - GO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM OLERICULTURA

ATANº/73
BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos doze dias do mês de março do ano de dois mil e vinte, às 8:00h (oito horas), reuniram-se os componentes da Banca Examinadora Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes (orientador), Prof. Dr. Rodrigo Vieira da Silva (avaliador interno) e Prof. Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque (avaliador externo), sob a presidência do primeiro, em sessão pública realizada IF Goiano – Campus Morrinhos, para procederem à avaliação da defesa de Dissertação, em nível de mestrado, de autoria de **Dayane Maria de Sousa**, discente do Programa de Pós-Graduação em Olericultura do Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida a autora da Dissertação para, em 40 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Olericultura, e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM OLERICULTURA**, na Área de Manejo Fitossanitário em Olerícolas, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGOL da versão definitiva da Dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, esta ata perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60** (sessenta) dias da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa Dissertação em periódicos de circulação nacional e/ou internacional, após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, o presidente da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado, e a presente Ata, após lida e achada conforme, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em quatro vias de igual teor.

Nadson de C. Pontes

Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes
Presidente da Banca
IF Goiano – Campus Morrinhos

Rodrigo Vieira da Silva

Prof. Dr. Rodrigo Vieira da Silva
Avaliador Interno
IF Goiano – Campus Morrinhos

Leonardo Cunha de Albuquerque

Prof. Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque
Avaliador Externo
IF Goiano – Campus Morrinhos

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OLERICULTURA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTERIÓFAGOS COM FOCO NA SUA UTILIZAÇÃO
PARA O CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO
TOMATEIRO.


Autora: Dayane Maria de Sousa
Orientador: Nadson de Carvalho Pontes

TITULAÇÃO: Mestre em Olericultura-Área de Concentração em Manejo
Fitossanitário em Olerícolas.

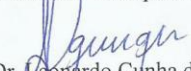
APROVADA em 12 de Março de 2020



Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes
Presidente da Banca
IF Goiano – Campus Morrinhos



Prof. Dr. Rodrigo Vieira da Silva
Avaliador Interno
IF Goiano – Campus Morrinhos



Prof. Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque
Avaliador Externo
IF Goiano – Campus Morrinhos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, depois ao meu amigo Agnaldo Bezerra, que me incentivou e me ajudou na elaboração do projeto para que eu pudesse entrar no mestrado.

Agradeço também aos meus familiares, que me apoiaram, e pela paciência que sempre tiveram comigo.

Também agradeço aos professores, meu orientador, Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes, e a Dr^a. Jaqueline Kiyomi Yamada, por toda a contribuição e paciência, por acompanhar todas as etapas do trabalho e por serem exemplos de dedicação.

E por fim agradeço aos estagiários Raphael, Thaynara, Vinicius e Priscilla, que me auxiliaram nas atividades do Laboratório de Fitopatologia e na casa de vegetação.

Serei eternamente grata aos professores e a todos os colaboradores do Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Dayane Maria de Sousa nasceu em Morrinhos (GO), em 09 de junho de 1986, filha de Ademir Cândido de Sousa e Maria do Carmo Dias Sousa. Irmã de Ademir de Sousa Júnior e Joice Cândida de Sousa.

Em 2007, concluiu o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na UNICALDAS-Faculdade de Caldas Novas. Em 2010, ingressou no concurso público para professor do ensino básico no município de Buriti Alegre. Em 2012, graduou-se em Pedagogia pela Universidade Estadual Vale do Acaraú – Sobral – CE. Também se especializou em Gênero e Diversidade na Escola, pela Universidade Federal de Goiás – Campus Catalão. Em 2019, iniciou o programa de Mestrado Profissional em Olericultura no IF Goiano, Campus Morrinhos.

RESUMO

SOUSA, DAYANE MARIA. Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos, março de 2020. **Isolamento e Caracterização de bacteriófagos com foco na sua utilização para o controle da mancha bacteriana do tomateiro.** Orientador: Dr. Nadson de Carvalho Pontes.

A mancha bacteriana do tomateiro é uma das doenças mais importantes desta cultura em todo o mundo. Os bacteriófagos, vírus que infectam bactérias, vêm sendo explorados nos últimos anos como agentes de biocontrole de doenças bacterianas em plantas. O objetivo desse estudo foi ajustar a metodologia para isolamento de fagos de amostras de folha e solo, visando à prospecção de bacteriófagos que possam ser utilizados no controle da mancha bacteriana do tomateiro. Foram coletadas amostras de folhas, sintomáticas e assintomáticas, e de solo em áreas de produção de tomate. Destas amostras, foi possível isolar 14 bacteriófagos, que foram submetidos ao teste de gama de hospedeiro e, a partir desse teste, foram selecionados 3 fagos (GF2, PL4 e S4) para avaliação do controle da mancha bacteriana. Em casa de vegetação, avaliou-se o efeito de 6 tratamentos (controle água, hidróxido de cobre, PL4, S4, GF2 e misturas dos 3 fagos) em relação à inoculação com dois isolados de *Xanthomonas* spp. (IFGO-X9 e IFGO-X5). Os tratamentos foram aplicados 24 horas antes da inoculação. Cada tratamento teve 4 repetições, sendo a parcela experimental constituída de um vaso de 1 L contendo uma planta. Houve diferenças entre estes quanto à gama de hospedeiros. No experimento *in vivo*, fagos que tinham a capacidade de formar placas de lise em colônias de isolados do patógeno também proporcionaram redução na severidade da mancha bacteriana ocasionada por estes isolados. Não se observou redução da severidade pelo uso de fagos quando o isolado do patógeno não lhe era suscetível, casos de GF2 e IFGO-X9. A mistura de fagos foi eficiente na redução da severidade, desde que ao menos um dos fagos fosse capaz de infectar o isolado do patógeno.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L., *Xanthomonas* spp., controle biológico, vírus

ABSTRACT

SOUSA, DAYANE MARIA. Instituto Federal Goiano (Goiano Federal Institute), Morrinhos Campus, March 2020. **Isolation and characterization of bacteriophages focusing their use for the control of tomato bacterial spot.** Advisor: Dr. Pontes, Nadson de Carvalho.

Tomato bacterial spot is one of the most important diseases of this crop worldwide. Bacteriophages, viruses that infect bacteria, have been exploited in recent years as biocontrol agents for plant bacterial diseases. This study aimed to adjust the methodology for isolating phages from leaf and soil samples, aiming at prospecting for bacteriophages that can be used to control tomato bacterial spot. Samples of symptomatic and asymptomatic tomato leaves and soils near the plant were collected, and fourteen bacteriophages were isolated, and subjected to the host gamma test; from this sample, three phages (GF2, PL4 and S4) were selected to assess bacterial spot control. In the greenhouse, the effect of six treatments (water-control, copper hydroxide, PL4, S4, GF2, and mixtures of the 3 phages) was evaluated in relation to inoculation with two *Xanthomonas* spp. isolates (IFGO-X9 and IFGO-X5). The treatments were applied twenty-four hours before inoculation. Each treatment had four replicates, and the experimental plot consisted of a 1 L pot with a plant. There were differences among them in terms of host range. In the *in vivo* experiment, phages that had the ability to form lysis plates on pathogen isolates colonies also provided a reduction in the bacterial spot severity caused by these isolates. There was no severity reduction in the phage use when the pathogen isolate was not susceptible to it, as in the case of GF2 and IFGO-X9. The phage mixture was efficient in reducing the severity, since at least one of the phages is able to infect the pathogen isolate.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., *Xanthomonas* spp., biological control, virus

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Isolados de <i>Xanthomonas</i> spp. provenientes de plantas de tomateiro com sintomas de mancha bacteriana..... 25
Tabela 2	Bacteriófagos obtidos de amostras de folhas e solo coletadas em áreas de cultivo de tomateiro com ocorrência de mancha bacteriana..... 26
Tabela 3	Sensibilidade de isolados de <i>Xanthomonas</i> spp. a bacteriófagos encontrados em amostras de folhas e solo coletadas em áreas de produção de tomate com ocorrência da mancha bacteriana..... 27
Tabela 4	Severidade (%) da mancha bacteriana do tomateiro em plantas tratadas com bacteriófagos e inoculadas com dois diferentes isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> no primeiro experimento..... 28
Tabela 5	Severidade (%) da mancha bacteriana do tomateiro em plantas tratadas com bacteriófagos e inoculadas com dois diferentes isolados de <i>Xanthomonas perforans</i> no segundo experimento..... 28

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO GERAL	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 A mancha bacteriana do tomateiro	11
2.2 Bacteriófagos: vírus que infectam bactérias	12
2.3 Bacteriófagos visando ao controle biológico de doenças de plantas	14
2.4 Referências	15
3 CAPÍTULO I	17
3.1 Introdução	18
3.2 Materiais e Métodos	20
3.2.1 Obtenção das amostras	20
3.2.2 Isolamento do patógeno	20
3.2.3 Identificação dos isolados bacterianos	21
3.2.4 Isolamento e purificação dos bacteriófagos das amostras de folhas e de solo	21
3.2.5 Teste de gama de hospedeiros	23
3.2.6 Eficiência de bacteriófagos no controle da mancha bacteriana no tomateiro	24
3.3 Resultados	25
3.4 Discussão	29
3.5 Conclusão	30
3.6 Referências	31

1 INTRODUÇÃO GERAL

A mancha bacteriana do tomateiro é uma das doenças mais importantes da cultura, sendo responsável por grandes perdas. Causada por quatro espécies de *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans*), a doença é favorecida por alta umidade e altas temperaturas em condições de campo (Quezado-Duval e Lopes 2010). O difícil controle da doença está relacionado a vários fatores, como rápida disseminação do patógeno em condições ambientes favoráveis, transmissão por sementes, eficiência variável do controle químico e indisponibilidade de cultivares com resistência adequada (Nascimento *et al.* 2013).

O controle químico da mancha bacteriana tem por base fungicidas cúpricos e antibiótico. Em função do crescente aumento de cepas bacterianas resistentes a estes químicos e pela busca por produtos ambientalmente corretos, têm sido intensificados os estudos sobre os bacteriófagos (Romero-Suarez *et al.* 2012). Os bacteriófagos, conhecidos também como fagos, são vírus que infectam bactérias e não atacam células de eucariotos. Os bacteriófagos estão presentes no ambiente em número superior às bactérias (Whitman *et al.* 1998; Wommack e Colwell, 2000) e podem ser isolados de diferentes fontes ambientais, como solos, água, folhas, entre outras (Buttimer *et al.* 2017).

Os fagos são considerados uma alternativa para o controle de infecções bacterianas, uma vez que se distinguem dos produtos químicos em função de sua capacidade de se multiplicar no local da infecção e serem específicos em nível de espécie e até de cepa bacteriana. Além de não infectarem eucariotos, os fagos não persistem no ambiente na ausência do hospedeiro. Existe uma enorme diversidade e quantidade de bacteriófagos no ambiente, os quais podem ser usados contra as bactérias resistentes aos fagos anteriores (Debarbieux *et al.* 2010). Sendo assim, o presente

trabalho teve por finalidade prospectar bacteriófagos com potencial para o controle da mancha bacteriana do tomateiro bem como estudar sua aplicabilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A mancha bacteriana do tomateiro

A mancha bacteriana do tomateiro é responsável por grandes perdas na produção de tomate, tanto para consumo *in natura* quanto para processamento industrial. Quatro espécies do gênero *Xanthomonas* causam a doença: *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* e *X. vesicatoria* (Quezado-Duval *et al.* 2004). Levantamentos recentes demonstram a prevalência das espécies *X. gardneri* e *X. perforans* nas lavouras de tomate no Brasil (Quezado-Duval e Inoue-Nagata 2009). A bactéria pode ser encontrada em sementes contaminadas, restos culturais, plantas voluntárias, o que torna difícil impedir a disseminação da doença e a eliminação das fontes de inóculo (Quezado-Duval e Lopes 2010).

As perdas significativas na produção de tomate causadas pela mancha bacteriana do tomateiro e os prejuízos são em decorrência direta dos sintomas da doença e do aumento do custo com produtos químicos utilizados no controle. Os sintomas ocorrem em toda a parte aérea da planta e podem se manifestar em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura. Nas folhas, as lesões começam pequenas e evoluem no tamanho, coalescendo. Essas manchas apresentam aspecto encharcado e são conhecidas como anasarca. Com o passar do tempo, o tecido lesionado se torna necrosado até a queda das folhas. Os sintomas nos frutos se iniciam como pequenas lesões encharcadas, que evoluem para lesões deprimidas ou levemente salientes, de aspecto corticoso (Quezado-Duval e Lopes 2010).

Para o controle da doença, uma das principais medidas de controle é a aplicações de defensivos químicos e o uso de variedades resistentes. O controle químico da mancha bacteriana tem por base fungicidas cúpricos e antibióticos. Esses produtos nem sempre apresentam a eficiência desejada devido, principalmente, à

presença de estirpes resistentes (Pontes *et al.* 2012). Além disso, há uma consciência crescente de que seu uso é ambientalmente hostil (Buttimer *et al.* 2017). O controle de doenças de plantas com o uso de cultivares resistentes, seja pela praticidade ou pela boa relação custo/benefício para o produtor, seria uma alternativa (Pontes *et al.* 2012). Porém, não há materiais disponíveis com bons níveis de resistência.

Em geral, o controle químico da doença baseia-se na aplicação de fungicidas cúpricos, como o hidróxido de cobre. Entretanto, frequentemente produtores e técnicos relatam ineficiência no controle da mancha bacteriana do tomateiro (Pontes e Fujinawa 2017). Outra opção são os produtos indutores de resistência, como, por exemplo, o acibenzolar-S-metil (ASM). Esse princípio ativo é um análogo do ácido salicílico, que induz resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas. Por ser sistêmico, o ASM poderia ser empregado em baixos volumes de calda, integrado como uma alternativa viável aos bactericidas à base de cobre para o manejo de campo de mancha bacteriana do tomateiro, particularmente onde predominam populações resistentes ao cobre (Louws *et al.* 2001). Porém, pode haver um comprometimento da produtividade em função do gasto energético associado ao processo de indução de resistência.

Estudos sobre os bacteriófagos, vírus que infectam bactérias, e sua prospecção vêm sendo explorados nos últimos anos para controlar doenças bacterianas de plantas. Um exemplo de produto à base de fagos de uso agrícola é o AgriPhage™, produzido pela empresa OmniLytics, registrado nos Estados Unidos para o controle de doenças causadas por bactérias fitopatogênicas, como a pinta e a mancha bacteriana do tomateiro (Chae *et al.* 2014). Porém, no Brasil não há nenhum produto disponível, e a importação dos produtos comercializados no exterior não é viável, principalmente pela especificidade do produto a populações do patógeno que não sejam aquelas encontradas aqui. No Brasil, já há trabalhos com esta linha de pesquisa em outros patossistemas. Santos *et al.* (2008) caracterizaram um bacteriófago que infecta *X. campestris* pv. *campestris*, causadora da podridão negra das crucíferas, que, no futuro, pode vir a se tornar a base de algum produto para controle biológico da podridão negra das crucíferas.

2.2 Bacteriófagos: vírus que infectam bactérias

A descoberta dos bacteriófagos se deu por volta de 1916, com os trabalhos do

bacteriologista Frederick Twort, na Inglaterra, e do microbiologista Felix d'Herelle, no Instituto Pasteur, na França (Sulakvelidze *et al.* 2001). Felix d'Herelle (1919 apud Buttimer *et al.* 2017) demonstrou a capacidade dos fagos para tratar pacientes com disenteria em Paris, França. Após este trabalho, muitos estudos e tentativas iniciais foram feitos para usar fagos para tratamentos de infecções, como a cólera em seres humanos. Esta abordagem pré-antibiótico tornou-se conhecida como fagoterapia (Buttimer *et al.* 2017). Em plantas, Mallmann e Hemstreet (1924 apud Buttimer *et al.* 2017) mostraram que a filtragem do repolho em decomposição poderia ser usada para inibir *X. campestris* pv. *campestris* em repolho. Houve diversos trabalhos nessa época sobre fagos. No entanto, esta modalidade de pesquisa foi negligenciada em favor dos antibióticos (Debarbieux *et al.* 2010)

Os fagos são considerados os micro-organismos mais abundantes na Terra, capazes de existir em todos os ambientes onde o hospedeiro estiver presente (Whitman *et al.* 1998; Wommack e Colwell 2000). Têm partículas virais de diferentes formas, com tamanho também bastante variável, podendo medir de 24-500 nm de diâmetro, e o genoma pode ser constituído por DNA ou RNA. Podem apresentar capsídeo com simetria icosaédrica, filamentosa ou pleomórfica (Ackermann 2005). O capsídeo protege o genoma de enzimas que degradam ácidos nucleicos e faz o reconhecimento extracelular para efetuar a adsorção do bacteriófago, ou seja, fazer a ligação do fago à superfície de uma célula bacteriana suscetível.

No ciclo de infecção, os bacteriófagos difundem-se em meio aquoso na busca de uma célula hospedeira suscetível. A multiplicação viral se dá basicamente pelo ciclo lítico e/ou lisogênico (Abedon 2006). No ciclo lítico, o vírus se liga a receptores, como carboidratos, lipídeos e proteínas localizados na superfície bacteriana, sendo essa fase conhecida como adsorção. As funções normais da bactéria são interrompidas na presença de ácido nucleico do vírus (DNA ou RNA). Esse ácido, ao mesmo tempo em que é replicado, comanda a síntese das proteínas do capsídeo. Os capsídeos organizam-se e envolvem as moléculas de ácido nucleico. São produzidos, então, novos vírus. Ocorre a lise, ou seja, a célula infectada se rompe e os novos bacteriófagos são liberados. Os fagos que adotam o ciclo lítico podem ser utilizados como agentes de controle biológico de doenças bacterianas.

No ciclo lisogênico, o vírus injeta seu material genético na bactéria, onde o material genético viral se incorpora ao material genético da bactéria, ou seja, o genoma viral torna-se parte do genoma da bactéria infectada. Uma vez infectada, a bactéria

continua suas operações normais. Nessa forma, o fago é conhecido como um prófago (Wittebole *et al.* 2014). Durante o processo de reprodução da bactéria, ela começará a transmitir o vírus também (Gill e Abedon, 2003). Sob determinadas condições naturais e artificiais como radiações UV, o fago pode iniciar o ciclo lítico (Gill e Abedon, 2003).

2.3 Bacteriófagos visando ao controle biológico de doenças de plantas

Nos últimos anos, vários estudos foram publicados sobre o controle biológico por fagos de importantes doenças de plantas incitadas por bacterianas, com muitos resultados promissores. Balogh *et al.* (2003) usaram formulações com coquetéis de fagos para controle da mancha bacteriana do tomateiro. Resultados promissores foram observados, mesmo em doenças de difícil controle, como a murcha bacteriana do tomateiro. Com base em experimentos em casa de vegetação, Fujiwara *et al.* (2011) trataram plantas de tomate com o fago 8RSL1. Essas plantas não apresentaram sintomas de murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) durante o período experimental, enquanto todas as plantas não tratadas mostraram murcha 18 dias após a infecção. Bae *et al.* (2012) descreveram um fago para *Ralstonia solanacearum* PE204 que inibiu a murcha bacteriana no tomate.

Para aplicação no controle biológico, um fago deve ser exclusivamente lítico e ter uma gama de hospedeiro que permita a infecção produtiva em todas as cepas (gênero/espécie) alvo (Buttimer *et al.* 2017). A grande vantagem de utilizar bacteriófagos no controle de fitobactérias é sua especificidade. Os fagos selecionados para controle da fitobactéria são específicos à espécie da fitobactéria e não interferem em outros microrganismos que estejam no ambiente aplicado (Debarbieux *et al.* 2010).

No entanto, a persistência de curta duração na superfície das folhas vegetais é o principal fator limitante para a aplicação dos bacteriófagos. Radiação solar, altas temperaturas e exposição a certos pesticidas químicos reduzem a eficiência dos fagos (Iriarte *et al.* 2012). Várias estratégias têm sido usadas para aumentar a persistência na planta, como aplicações feitas à noite, formulações com leite desnatado (Balogh *et al.* 2003), misturas de suspensões de fagos (coquetéis) e até aumentar as populações de fagos na filosfera, multiplicando-se em hospedeiros bacterianos que não são patógenos (Balogh *et al.* 2018). No controle biológico, manter altas populações de agentes de biocontrole em relativa proximidade com a bactéria alvo é fundamental para o seu

sucesso. A persistência do fago tem sido uma grande preocupação, uma vez que o controle biológico com fago exige altas densidades dele nas proximidades do patógeno alvo (Balogh *et al.* 2018).

2.4 Referências

- Abedon ST (2006) Bacteriophage Ecology, Population Growth, Evolution and Impact of Bacterial Viruses. Cambridge; pp. 3-5
- Ackermann HW (2005) Bacteriophage classification. Boca Raton, FL: CRC Press 67-90
- 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
- Balogh B, Jones J.B, Momol MT, Olson SM, Obradović A, King P, Jackson LE (2003) Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease*.87:949-954. doi:10.1094/PDIS.2003.87. 8.949
- Balogh B, Nga NTT, Jones JB (2018) Relative Level of Bacteriophage Multiplication *in vitro* or in Phyllosphere May Not Predict *in planta* Efficacy for Controlling Bacterial Leaf Spot on Tomato Caused by *Xanthomonas perforans* Pathology *Frontiers Microbiology*
- Buttimer C, Macauliffe RPR, Hill C, O'Mahony J, Coffey A (2017) Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Frontiers Microbiology*
- Chae JC, Hung NB, Yu SM, Lee HK, Lee YH (2014) Diversity of Bacteriophages Infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Paddy Fields and Its Potential to Control Bacterial Leaf Blight of Rice, *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(6)
- 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
- 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
- Gill J, Abedon ST (2003) Bacteriophage Ecology and Plants. *APSnet Features*, Online. doi: 10.1094/APSnetFeature-1103
- Iriarte FB, Obradović A, Wernsing MH, Jackson LE, Balogh B, Hong JA, Momol MT, Jones JB, Vallad GE (2012) Soil-based systemic delivery and phyllosphere *in vivo* propagation of bacteriophages: Two possible strategies for improving bacteriophage persistence for plant disease control. *Bacteriophage*, 2:215-224

- Louws F.J, Wilson M, Campbell HL, Cuppels DA, Jones JB, Shoemaker PB, Sahin F, Miller SA (2001) Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease* 85:481-488
- Nascimento AR, Fernandes PM, Borges LC, Moita AW, Quezado-Duval AM (2013) Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo - *Horticultura Brasileira*, Goiânia - Go 31:15-24
- Pontes NC, Fujinawa MF (2017) Uso de *Bacillus* spp. no controle da mancha bacteriana do tomateiro. In: Goes, A.; Pereira, F.D.; Poloni, N.M. Tópicos especiais em fitopatologia aplicada. 1. ed. Jaboticabal: Funep. 1:65-74
- 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
- Quezado-Duval AM, Inoue-nagata AK (2009) Mancha bacteriana e geminivirose avançam sobre tomate industrial. *Revista Campo & Negócios HF* 54:44-47
- 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 AM, Leite, RP, Truffi D, Camargo LEA (2004) Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in Central-West Brazil. *Plant Disease* 88:57-161
- Romero-Suarez S, Jordan B, Heinemann JA (2012) Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the causal agent of walnut blight disease. *World Journal Microbiology Biotechnology*
- Santos LA, Bandeira DA, Silva JP, Silveira EB, Gomes AMA, Mariano RLR (2008) Caracterização de isolados de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* de sistemas de produção orgânico e reação de brássicas à podridão-negra. *Horticultura Brasileira* 26:486-491
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG (2001) Bacteriophage therapy. - *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 45:649-659
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Perspective prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 6578–6583. doi: 10.1073/pnas.95.12.6578
- Wittebole X, De Roock S, Opal SM (2014) A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5(1):226-235
- Wommack KE, Colwell RR (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:69-114. doi: 10.1128/MMBR.64.1.69-114

3 CAPÍTULO I

Prospecção de bacteriófagos para o controle da mancha bacteriana do tomateiro

(Normas de acordo com a revista Tropical Plant Pathology)

Resumo

O objetivo desse estudo foi a prospecção de bacteriófagos que possam ser utilizados no controle da mancha bacteriana do tomateiro. Foram coletadas amostras de folhas, sintomáticas e assintomáticas, e solo em áreas de produção de tomate. Destas amostras, foi possível isolar 14 bacteriófagos, que foram caracterizados quanto ao tipo de ácido nucleico e submetidos ao teste de gama de hospedeiro. Foram selecionados 3 fagos (GF2, PL4 e S4) para avaliação do controle da mancha bacteriana. Em casa de vegetação, avaliou-se o efeito de 6 tratamentos (controle-água, hidróxido de cobre, PL4, S4, GF2 e misturas dos 3 fagos) em relação à inoculação com dois isolados de *Xanthomonas* spp. (IFGO-X9 e IFGO-X5). Os tratamentos foram aplicados 24 horas antes da inoculação. Cada tratamento teve 4 repetições, sendo a parcela experimental constituída de um vaso de 1 L contendo uma planta. Todos os fagos prospectados eram vírus de DNA. Houve diferenças entre estes quanto à gama de hospedeiros. No experimento *in vivo*, fagos que tinham a capacidade de formar placas de lise em colônias de isolados do patógeno também proporcionaram redução na severidade da mancha bacteriana ocasionada por estes isolados. Não foi possível redução da severidade pelo uso de fagos quando o isolado do patógeno não lhe era suscetível, casos de GF2 e IFGO-X9. A mistura de fagos foi eficiente na redução da severidade, desde que ao menos um dos fagos fosse capaz de infectar o isolado do patógeno.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L., *Xanthomonas* spp., controle biológico, vírus

Bacteriophages prospection to control the tomato bacterial spot

(Standards according to Tropical Plant Pathology Journal)

Abstract

This paper aimed to study the bacteriophages prospection that can be used to control the tomato bacterial spot. Symptomatic and asymptomatic tomato leaves and soil samples were collected from tomato production areas. From these samples, it was possible to isolate fourteen bacteriophages, which were characterized for the nucleic acid type and submitted to host gamma test. Three phages (GF2, PL4, and S4) were selected to evaluate bacterial spot control. In greenhouse, the effect of six treatments (water control, copper hydroxide, PL4, S4, GF2, and mixtures of the three phages) was evaluated in relation to inoculation with two *Xanthomonas* spp. isolates (IFGO-X9 and IFGO-X5). The treatments were applied twenty-four hours before inoculation. Each treatment had four replicates, and the experimental plot consisted of a 1 L pot with a plant. All the prospected phages were DNA viruses. There were differences among them regarding the host range. In the *in vivo* experiment, phages that had the ability to form lysis plates on pathogen isolates colonies also provided a reduction in the severity of bacterial spot caused by these isolates. It was not possible to reduce severity by using phages when the pathogen isolate was not susceptible to them, as in the case of GF2 and IFGO-X9. The mixture of phages was efficient in reducing severity, provided that at least one of the phages is able to infect the pathogen isolate.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., *Xanthomonas* spp., biological control, virus

3.1 Introdução

A mancha bacteriana do tomateiro é uma das doenças mais importantes da cultura, (Quezado-Duval e Lopes 2010). Associada a quatro espécies de *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans*), a doença é favorecida por condições de alta umidade e temperaturas (Jones *et al.* 2004). O difícil controle está relacionado a vários fatores, tais como rápida disseminação do patógeno em condições ambientes favoráveis, transmissão por sementes, eficiência variável do controle químico

e indisponibilidade de cultivares com resistência adequada (Nascimento *et al.* 2013). O controle biológico por meio de diferentes antagonistas pode ser uma boa opção a ser incorporada ao manejo, haja vista ser um método ambientalmente correto.

Uma opção para uso como agente de controle biológico são os bacteriófagos, conhecidos também como fagos, os quais são vírus que infectam bactérias e não atacam células de eucariotos. Os bacteriófagos estão presentes no ambiente em número superior às bactérias (Whitman *et al.* 1998; Wommack e Colwell, 2000) e podem ser isolados de diferentes fontes ambientais, como solo, água, folhas, entre outros (Buttimer *et al.* 2017). Sua descoberta data do início do século XX (Sulakvelidze *et al.* 2001) e os primeiros relatos de sua utilização no controle de doenças de plantas vieram logo a seguir (Mallmann e Hemstreet 1924 apud Buttimer *et al.* 2017). No entanto, este tipo de pesquisa tornou-se negligenciada em favor dos antibióticos (Debarbieux *et al.* 2010)

Em função do crescente aumento de cepas bacterianas resistentes a produtos químicos, sejam antibióticos ou cúpricos, têm sido intensificados os estudos sobre os bacteriófagos como agentes de biocontrole de doenças de plantas (Romero-Suarez *et al.* 2012). Resultados promissores foram observados, mesmo em doenças de difícil controle, como a murcha bacteriana do tomateiro. Em experimentos em casa de vegetação, Fujiwara *et al.* (2011) não observaram sintomas da doença em plantas de tomateiro tratadas com o fago 8RSL1 e inoculadas com *Ralstonia solanacearum*. Resultado similar foi obtido por Bae *et al.* (2012), que também conseguiram isolar um fago capaz de infectar *Ralstonia solanacearum* e inibir a murcha bacteriana em tomateiro.

Em relação à mancha bacteriana do tomateiro, há diversos trabalhos que destacam o potencial de uso dos bacteriófagos para o controle da doença (Flaherty *et al.* 2000; Balogh *et al.* 2003; Obradović *et al.* 2004). Entretanto, a especificidade que estes vírus podem apresentar para determinadas espécies e isolados do patógeno (Klement 1959) fazem com que a busca deva considerar a população local do patógeno e fagos capazes de infectá-la. Assim, mesmo havendo produtos desenvolvidos em outros países, há necessidade de buscar fagos que sejam infecciosos aos isolados do patógeno encontrado na região em que se planeja utilizá-los.

Existe uma enorme diversidade e quantidade de bacteriófagos no ambiente, o que favorece a prospecção de novos fagos, os quais podem ser usados contra as bactérias resistentes aos fagos anteriormente utilizados (Debarbieux *et al.* 2010). Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a prospecção de bacteriófagos com

potencial de uso como agentes de controle biológico da mancha bacteriana do tomateiro.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Obtenção das amostras

As amostras foram coletadas em lavouras comerciais de produção de tomate em diferentes municípios no estado de Goiás (Anápolis, Goiânia, Goiatuba e Morrinhos) e no município de Guará, no estado de São Paulo. As coletas ocorreram nos primeiros meses de 2019, período com condições climáticas favoráveis à ocorrência da doença. Em cada amostragem, foram coletadas folhas com sintomas de mancha bacteriana para isolamento do patógeno. Além das folhas sintomáticas, foram coletadas amostras de folhas assintomáticas e de solo em contato com folhas sintomáticas.

3.2.2 Isolamento do patógeno

Os isolados de *Xanthomonas* spp. foram obtidos de fragmentos de folhas de tomateiro com sintomas de mancha bacteriana. Os fragmentos de folhas foram desinfestados em álcool 70% (30 segundos), depois em hipoclorito de sódio 0,7% (30 segundos) e lavados três vezes em água destilada estéril. Depois foram macerados e, com auxílio de uma alça de platina, uma alíquota do extrato foi cultivada em placas de Petri contendo meio de cultivo Ágar Nutritivo (=NA, extrato de carne 1,0g/L, extrato de levedura 2,0g/L, Peptona 5,0g/L, NaCl 5,0g/L, Ágar 15,0g/L, PH 6,8 + 0,2%-25°C). As placas foram mantidas em câmaras do tipo B.O.D. por 48 horas a 28°C. Após o crescimento das colônias, foram selecionadas colônias amarelas e isoladas, que foram repicadas para outra placa de Petri. Estas culturas foram incubadas por 24 horas a 28°C. Após este período, foi feita a preservação da bactéria em tubos de preservação com tampão fosfato (K_2HPO_4 8,5 mmol L⁻¹; KH_2PO_4 7,5 mmol L⁻¹, pH 7,0) previamente autoclavados por 30 minutos.

A patogenicidade de cada isolado bacteriano foi avaliada em plantas de fumo por meio da observação de reação de hipersensibilidade, 36 horas após a inoculação, confirmada pela observação de sintomas em plantas de tomateiro cv. Santa Clara aos

sete dias após a inoculação. Em ambos os casos, a inoculação foi feita pela infiltração nas folhas com auxílio de uma seringa hipodermica de suspensão bacteriana, com concentração ajustada para 5×10^8 UFC.mL⁻¹ (OD₆₀₀=0,3).

3.2.3 Identificação dos isolados bacterianos

Após a confirmação da patogenicidade, a identificação dos isolados bacterianos foi feita por meio da técnica de PCR, usando *primers* específicos. A PCR foi feita em um termocicador (Modelo T100, Bio-Rad) com o seguinte programa: 94°C por 300 s seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 s, 66°C por 60 s e 72°C por 60 s, seguido de uma extensão final de 72°C por 420 s. As reações consistiram em: 1,5 mmol L⁻¹ de MgCl₂; 0,2 mmol L⁻¹ de cada dNTPs; 2 μmol L⁻¹ para todas as *primers*; 1,26 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen); aproximadamente 50 ng μL⁻¹ de DNA; e água ultrapura para um volume final de 12 μL. As reações com suspensões bacterianas foram feitas com as mesmas concentrações dos reagentes, adicionando 2 μL de cada suspensão (5×10^8 CFU mL⁻¹) por modelo, a um volume final de 12 μL. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%, tampão TBE 0,5x), corados com brometo de etídeo e visualizados em luz UV, usando um fotodocumentador (Loccus). Os *primers* utilizados foram desenhados por Koenraadt *et al.* (2009 apud Araújo *et al.* 2017).

3.2.4 Isolamento e purificação dos bacteriófagos das amostras de folhas e de solo

Quando da recepção das amostras de folhas e solo de determinada localidade, elas foram mantidas a 8°C por um período não superior a 14 dias, enquanto era feito o isolamento do patógeno das folhas sintomáticas oriundas do mesmo local. Após os procedimentos de isolamento do patógeno e confirmação da patogenicidade descritos acima, o processo de isolamento de fagos das amostras foi feito utilizando isolado bacteriano proveniente do local de coleta de cada amostra. Para tal, os isolados bacterianos foram cultivados em 200 mL de meio de cultura Caldo Nutritivo (5g/L de Peptona, 1g/L de Extrato de Carne, 2g/L de Extrato de Levedura, 5g/L de NaCl) por 24 horas a 28°C, sob agitação a 90 rpm. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para OD₆₀₀=0,1. Quando da observação do primeiro isolado sensível a fagos,

no caso, o isolado IFGO-X4, este também passou a ser utilizado nos procedimentos de prospecção de fagos.

Fragmentos de folhas provenientes das amostras foram desinfestados superficialmente em álcool 70% por 30 segundos, depois por hipoclorito de sódio a 0,7% por 30 segundos e lavados três vezes em água destilada estéril. Em seguida, as amostras foram colocadas em 100 mL de suspensão bacteriana ajustada e mantidas sob agitação por 2 horas a 28°C, protegidas da luz. Após a incubação, a suspensão foi coletada e transferida para um frasco estéril e adicionado 10% de clorofórmio (v/v) e agitado gentilmente. Em seguida, foi feita a centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos (Centrífuga refrigerada de bancada Sigma modelo 3-16PK/Velocidade máx. de 15.300 rpm, força centrífuga (RCF) 21.913 x g e capacidade de 4 x 400 mL.) O sobrenadante foi filtrado com filtro de seringa (membrana 0,22 µm de tamanho de poro; Jet Biofilm) e conservado sob refrigeração 8°C-10°C para ser avaliado quanto à presença de bacteriófagos. Para isolamento dos fagos das amostras de solo, 2 g de solo provenientes destas foram adicionados a 4 mL de água destilada autoclavada. A mistura foi agitada em vórtex por 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa (membrana 0,22 µm de tamanho de poro; Jet Biofilm) e mantido sob refrigeração 8°C-10°C até o isolamento e purificação do bacteriófago.

O isolamento dos bacteriófagos foi feito para ambos os filtrados, de folhas de tomateiro e solo, pelo método de dupla camada de meio de cultura de Adams (1959 apud Bergamin Filho 2019). Para tal, alíquotas de 100 µL do filtrado foram adicionadas a 250 µL de suspensão bacteriana do mesmo isolado utilizado no processo de enriquecimento (1×10^8 UFC/mL) e incubadas por 2 horas a 28°C. A mistura de suspensão bacteriana e filtrado foi adicionada a 5 mL de meio semissólido (3 g extrato de carne, 5 g de peptona, 8 g de ágar, 1000 mL de água destilada), fundida e mantida a 55°C. Essa mistura foi depositada em placas de Petri com uma camada de ágar-água (15 g de ágar e 1000 mL de água destilada), espalhada e mantida em repouso até a solidificação (20-30 minutos em câmara de fluxo). Depois de 24 horas de incubação a 28°C, a formação de placas de lise foi avaliada visualmente.

Para purificação dos fagos, foram selecionadas placas de lise que apresentassem características diferentes (tamanho ou formato), dando preferência àquelas de maior tamanho em cada isolamento. Estas placas foram recortadas e colocadas em 100 mL de suspensão bacteriana (OD 600=0,1) e mantidas sob agitação a

100 rpm por 2 horas. Após este período, foi adicionado clorofórmio (10% do volume final). Depois foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos e filtradas em filtro de seringa (Jet Biofilm 0,22 μ m tamanho do poro). Após a filtragem, foi feita a diluição seriada. Foram transferidas 100 μ L dessa amostra para um microtubo autoclavado contendo 900 μ L de tampão SM-buffer, agitadas no vórtex. A partir dessa diluição, foram tomados outros 100 μ L e transferidos a um novo microtubo, também contendo 900 μ L de solução tampão SM-buffer. Foram feitas 10 diluições (10^{-1} , 10^{-2} , [...], 10^{-10}) para obter placas de Petri com placas de lise como descrito anteriormente pelo método de Adams (1959 apud Bergamin Filho 2019). Este processo foi repetido mais três vezes para obter culturas puras dos fagos. Na terceira repetição, também foram recortadas as placas de lise e colocadas na suspensão bacteriana, depois foi adicionado o clorofórmio, centrifugadas e filtradas, como descrito anteriormente. Para obter uma concentração ideal de fagos para a utilização no isolamento, foram feitas diluições seriadas do último filtrado obtido e feito o método de Adams (1959 apud Bergamin Filho 2019).

Para preparo das soluções estoque de fagos, foram preparadas 10 placas de Petri, com meio ágar-água na parte inferior e meio semissólido na parte superior, ao qual foram previamente adicionadas suspensão bacteriana e suspensão de fagos oriunda da última etapa do processo de purificação, nas proporções descritas anteriormente. Estas culturas foram mantidas a 28°C por 24 horas. Após este período, foi adicionado em cada placa um volume de 5 mL de SM-buffer (5,8 g de NaCl; 2,0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 50 mL TrisHCl -PH 7,4; 0,1 g de gelatina incolor; e 1000 mL de H_2O destilada). As placas foram deixadas sob agitação 28°C por uma hora. Depois de recolhido o volume de SM-buffer das 10 placas, ele foi adicionado a este clorofórmio (10% do volume final). A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa (Jet Biofilm 0,22 μ m tamanho do poro), obtendo-se a solução estoque. Esta suspensão de fagos foi mantida sob refrigeração, protegida da luz. Foi feita a diluição seriada da suspensão estoque de bacteriófagos para estimar o número de bacteriófagos por meio do ensaio de dupla camada. Após a contagem das placas de lise, as soluções estoque dos diferentes fagos foram padronizadas quanto ao número de unidades virais infecciosas (título de fagos), expresso como unidades formadoras de placas por mL (UFP/mL) e mantidas sob refrigeração para os próximos testes.

3.2.5 Teste de gama de hospedeiros

Os bacteriófagos obtidos foram avaliados quanto à capacidade de infectar diferentes isolados de *Xanthomonas* spp. Para isso, foram avaliados os isolados de *Xanthomonas* spp. coletados ao longo deste estudo. Cada isolado de *Xanthomonas* spp. foi cultivado em Caldo Nutritivo por 24 horas a 28°C, e a suspensão bacteriana ajustada para OD₆₀₀=0,1. Uma alíquota de 250 µL de suspensão bacteriana foi misturada em 5 mL de meio semissólido fundido e espalhado em placas de Petri contendo ágar-água. Cada placa foi dividida externamente em quatro seções. Em cada uma, foi depositada uma alíquota de 5 µL da solução estoque de fago. Todos os fagos isolados foram avaliados para todos os isolados de *Xanthomonas* spp. obtidos. Após incubação a 28°C por 24 h, a presença de uma zona de lise no local em que foi depositada a alíquota do fago para cada isolado bacteriano foi interpretada como sensibilidade, e a ausência de zona de lise, como resistência à infecção fágica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (bacteriófagos x isolados de *Xanthomonas* spp.), com três repetições para cada tratamento.

3.2.6 Eficiência de bacteriófagos no controle da mancha bacteriana no tomateiro

Mudas de tomate cv. AP533 (Semini®) com 20 dias após a semeadura, apresentando duas folhas verdadeiras, foram transplantadas para vasos de 2 L preenchidos com solo autoclavado e mantidos em casa de vegetação com sistema de isolamento térmico, controle de umidade e temperatura do tipo PAD-FAN, acionado quando a temperatura máxima chegava a 30°C. Uma semana após o transplante, quando as plantas apresentavam quatro folhas verdadeiras, foi feita a aplicação dos tratamentos, que consistiram da aplicação de fagos (isolados ou em mistura) na concentração final de 10¹⁰ UFP/mL, hidróxido de cobre (Kocide®, 5 g p.c./L) e água (controle), pulverizados até o ponto de escoamento. Passadas 24 horas da aplicação dos tratamentos, as plantas foram inoculadas com isolados de *Xanthomonas* spp. por meio de pulverização das folhas com suspensão bacteriana ajustada para a OD₆₀₀=0,1. Foram escolhidos dois isolados: um suscetível ao maior número de fagos e outro com resistência a alguns fagos.

Após 14 dias da inoculação, foi feita avaliação da área foliar lesionada da terceira e quarta folha verdadeiras. A parcela experimental correspondeu a um vaso com

uma planta. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (tratamentos x isolados de *Xanthomonas* spp.) com quatro repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e feito o desdobramento para avaliar a interação entre os fatores ‘fagos’ e ‘isolados de *Xanthomonas* spp.’. Quando observados efeitos significativos dos fatores avaliados sobre a variável resposta (F, $P \leq 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). O experimento foi em duplicata para verificar a repetibilidade dos resultados.

3.3 Resultados

Após o processamento das amostras coletadas em diferentes áreas de produção, foram obtidos nove isolados de *Xanthomonas* spp. provenientes das folhas de tomate com sintomas de mancha bacteriana do tomateiro (Tabela 1). Com base na reação de PCR com *primers* específicos, a maioria dos isolados foi identificada como *X. perforans*. Dois isolados não amplificaram para nenhum dos *primers* avaliados, não sendo possível a determinação a nível de espécie.

Tabela 1 - Isolados de *Xanthomonas* spp. provenientes de plantas de tomateiro com sintomas de mancha bacteriana

Isolado	Data da coleta	Propriedade	Município	Espécie
IFGO-X1	20180619	Bunge S.A.	Guaíra-SP	<i>X. perforans</i>
IFGO-X2	20180810	Fazenda São José	Morrinhos-GO	<i>X. perforans</i>
IFGO-X3	20180810	Fazenda São José	Morrinhos-GO	<i>X. perforans</i>
IFGO-X4	20181214	Fazenda do Sítio	Morrinhos-GO	<i>X. perforans</i>
IFGO-X5	20190107	Área de tomate envarado	Anápolis-GO	<i>X. perforans</i>
IFGO-X6	20190514	Fazenda São Caetano Pivô 1	Morrinhos-GO	<i>Xanthomonas</i> sp.
IFGO-X7	20190514	Fazenda São Caetano Pivô 2	Morrinhos-GO	<i>Xanthomonas</i> sp.
IFGO-X8	20190514	Fazenda Três Barras	Morrinhos-GO	<i>X. perforans</i>
IFGO-X9	20190717	Fazenda Magnólia	Goiatuba-GO	<i>X. perforans</i>

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Ao longo das coletas, foi possível o isolamento de bacteriófagos patogênicos *Xanthomonas* spp. tanto de amostras de folhas como de amostras de solo (Tabela 2). Os primeiros isolamentos de fagos só foram conseguidos na terceira área amostrada. Estes foram oriundos das amostras da propriedade Fazenda do Sítio, onde foram coletadas

plantas voluntárias de tomateiro (tigueras), localizadas próximo a um cultivo de soja em área previamente ocupada com cultivo de tomate. Neste caso, não foram coletadas amostras de solo.

Tabela 2 - Bacteriófagos obtidos de amostras de folhas e solo coletadas em áreas de cultivo de tomateiro com ocorrência de mancha bacteriana

Bacteriófagos	Local/Município	Material de origem
PL2	Fazenda do Sítio – Morrinhos	Folhas
PL4	Fazenda do Sítio – Morrinhos	Folhas
F1	Fazenda São Caetano Pivô 1 - Morrinhos	Folhas
F3	Fazenda São Caetano Pivô 1 - Morrinhos	Folhas
F4	Fazenda São Caetano Pivô 2 - Morrinhos	Folhas
S1	Fazenda São Caetano Pivô 1 - Morrinhos	Solo
S2	Fazenda São Caetano Pivô 2 - Morrinhos	Solo
F2	Fazenda Três Barras – Morrinhos	Folhas
F5	Fazenda Três Barras – Morrinhos	Folhas
F6	Fazenda Três Barras – Morrinhos	Folhas
S3	Fazenda Três Barras – Morrinhos	Solo
S4	Fazenda Três Barras – Morrinhos	Solo
GF1	Fazenda Magnólia – Goiatuba	Folhas
GF2	Fazenda Magnólia – Goiatuba	Folhas
GS1	Fazenda Magnólia – Goiatuba	Solo
GS2	Fazenda Magnólia – Goiatuba	Solo

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Quanto ao teste de gama de hospedeiros, foram observadas diferenças entre os fagos quanto à capacidade de infectar isolados de *Xanthomonas* spp. bem como diferenças entre os isolados bacterianos quanto à resistência aos fagos. Os isolados IFGO-X1 e IFGO-X2 foram resistentes a todos os fagos avaliados (Tabela 3). O isolado IFGO-X3 apresentou resistência à maioria dos fagos, sendo infectado por apenas quatro, dos quais três foram isolados do solo. Para oito fagos, observou-se capacidade de infectar até seis isolados de *Xanthomonas* spp. dos nove avaliados.

No experimento *in vivo* do efeito dos bacteriófagos sobre a severidade da mancha bacteriana, foram escolhidos os fagos PL4, S4 e GF2, que se diferenciam quanto à gama de hospedeiros entre os isolados avaliados. Para inoculação, optou-se por isolados identificados a nível de espécie (*X. perforans*) que tivessem diferenças quanto

à sensibilidade aos fagos, como os isolados IFGO-X9 (suscetível aos três fagos) e IFGO-X5 (resistente a GF2).

Com base na análise de variância, foi possível detectar efeito dos fatores avaliados sobre a severidade da doença (F, $P < 0,0001$) nos dois ensaios conduzidos. Quando feito o desdobramento da interação ‘tratamentos’ x ‘isolados de *Xanthomonas* spp.’, foram observadas diferenças entre os tratamentos para ambos os isolados (Tabelas 4 e 5).

Tabela 3 - Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas* spp. a bacteriófagos encontrados em amostras de folhas e solo coletadas em áreas de produção de tomate com ocorrência da mancha bacteriana

Fago	<i>Xanthomonas perforans</i>				<i>Xanthomonas</i> spp.			
	X2	X3	X4	X5	X8	X9	X6	X7
PL2	-	-	+	+	+	+	-	-
PL4	-	-	+	+	+	+	-	-
F1	-	-	+	+	+	+	+	+
F2	-	-	+	+	+	+	-	-
F3	-	-	+	+	+	+	-	-
F4	-	-	+	+	+	+	+	+
F5	-	-	+	+	+	+	+	+
F6	-	-	+	+	+	+	+	+
GF1	-	-	+	+	+	+	+	+
GF2	-	+	+	-	+	+	-	-
GS1	-	-	+	+	+	+	+	+
GS2	-	-	+	+	+	+	+	+
S1	-	+	+	-	+	+	+	-
S2	-	+	+	-	+	+	+	-
S3	-	+	+	-	+	+	-	-
S4	-	-	+	+	+	+	+	+

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

No primeiro experimento, quando as plantas foram inoculadas com IFGO-X9, todos os tratamentos diferiram da testemunha em relação à severidade da mancha bacteriana do tomateiro, com exceção do tratamento com hidróxido de cobre (Tukey, $P \leq 0,05$). Entretanto, quando da inoculação com IFGO-X5, foi o tratamento com GF2 que não diferiu da testemunha não tratada (Tukey, $P \leq 0,05$). Em relação à severidade da

mancha bacteriana em função da inoculação com estes dois isolados, foram observadas diferenças entre eles nos tratamentos com aplicação de GF2 (F, $P=0,0166$), o que não foi observado para os demais tratamentos (F, $P\leq 0,05$). Quando GF2 foi aplicado em mistura com PL4 e S4, houve redução da severidade da mancha bacteriana tanto em plantas inoculadas com IFGO-X9, como naquelas inoculadas com IFGO-X5, não tendo sido observadas diferenças entre o nível de severidade proporcionado por estes isolados nas plantas tratadas com a mistura de fagos (F, $P=0,6777$).

Tabela 4 – Severidade (%) da mancha bacteriana do tomateiro em plantas tratadas com bacteriófagos e inoculadas com dois diferentes isolados de *Xanthomonas perforans* no primeiro experimento

Tratamentos	IFGO-X9	IFGO-X5	Pr>F
Controle	68,75 A ¹	73,75 A	0,6768
Hidróxido de cobre	33,75 AB	25,00 B	0,4684
PL4	26,25 B	21,25 B	0,6778
S4	23,75 B	22,50 B	0,7553
GF2	18,75 B	43,75 AB	0,0166
MIX (PL4 + S4 + GF2) ²	13,75 B	18,75 B	0,6777
Pr>F	0,009	0,0003	

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, $P\leq 0,05$). ²Plantas pulverizadas com mistura dos três bacteriófagos em proporções iguais e com concentração final de 10^{10} UFP/mL.

No segundo experimento, quando as plantas foram inoculadas com IFGO-X9, todos os tratamentos diferiram da testemunha em relação à severidade da mancha bacteriana do tomateiro (Tukey, $P\leq 0,05$). Entretanto, quando da inoculação com IFGO-X5, os tratamentos com os fagos GF2 e S4 e com o hidróxido de cobre não diferiram da testemunha não tratada (Tukey, $P\leq 0,05$). Em relação à severidade da mancha bacteriana em função da inoculação com estes dois isolados, não foram observadas diferenças entre eles nos diferentes tratamentos (F, $P\leq 0,05$).

Tabela 5 – Severidade (%) da mancha bacteriana do tomateiro em plantas tratadas com bacteriófagos e inoculadas com dois diferentes isolados de *Xanthomonas perforans* no segundo experimento

Tratamentos	IFGO-X9	IFGO-X5	Pr > F
Controle	70,00 A ¹	61,25 A	0,3536
Hidróxido de cobre	34,25 B	32,25 AB	0,8311
PL4	46,25 B	29,75 B	0,0848
S4	48,75 B	41,75 AB	0,4571
GF2	46,25 B	45,00 AB	0,8940
MIX (PL4 + S4 + GF2) ²	32,00 B	28,00 B	0,6700
Pr > F	0,0087	0,0216	

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (LSD, $P\leq 0,05$). ²Plantas pulverizadas com mistura dos três bacteriófagos em proporções iguais e com concentração final de 10^{10} UFP/mL.

3.4 Discussão

Tem sido observada maior prevalência de *X. perforans* em áreas de produção de tomate nas principais regiões produtoras do Brasil (Araújo *et al.* 2017). Tal fato foi observado neste estudo com a maioria dos isolados identificados como *X. perforans*. Há várias hipóteses para a maior associação desta espécie a epidemias de mancha bacteriana do tomateiro, como a produção de bacteriocinas que inibem isolados das outras espécies (Hert A e Roberts *et al.* 2005; Hert A e Marutani *et al.* 2009; Potnis *et al.* 2014) ou maior adaptabilidade a altas temperaturas (Araújo *et al.* 2011). Em relação ao nível de especificidade que os bacteriófagos têm para determinadas espécies ou isolados de *Xanthomonas* (Klement 1959), é de fundamental importância conhecer quais espécies são predominantes nas áreas de produção, de modo que sejam selecionados fagos capazes de infectar estas espécies.

Nos Estados Unidos, há vários trabalhos relacionados ao uso de fagos para o controle da mancha bacteriana do tomateiro (Balogh *et al.* 2003; Obradović *et al.* 2004; Obradović *et al.* 2005), inclusive com produtos comerciais (Flaherty *et al.* 2000). Entretanto, é possível que fagos isolados em outros países possam não ser efetivos na infecção de isolados brasileiros. A incapacidade de um bacteriófago em conseguir infectar determinado isolado do patógeno pode reduzir sua capacidade de controlar a doença, como observado na interação entre o fago GF2 e o isolado IFGO-X5. Essa variação da infecção dos fagos pode ser explicada pelo fato de eles serem específicos, capazes de infectar uma estreita gama de hospedeiro, tipicamente limitada a apenas um único gênero, espécie ou, muitas vezes, apenas a um número limitado de cepas dentro de uma dada espécie (Gill e Abedon, 2003).

Uma alternativa para que formulações à base de fagos sejam efetivas contra as diferentes variantes do patógeno é a mistura de fagos com diferentes gamas de hospedeiros. Considerando que a mancha bacteriana do tomateiro está associada a um complexo de espécies (Jones *et al.* 2004), seria necessário o desenvolvimento de formulações contendo fagos com capacidade de infectar as diferentes espécies associadas à doença.

Quando se fala em formulação, outra preocupação seria a questão da sobrevivência dos fagos na superfície foliar, uma vez que eles têm sensibilidade à radiação UV (Jones *et al.* 2012). Balogh *et al.* (2003) observaram drástica redução no

número de unidades formadoras de placas até 40 horas após aplicação de fagos que infectam *X. perforans* em folhas de tomateiro. No presente estudo, com aplicação dos fagos 24 horas antes da inoculação, o desempenho no controle da doença foi igual ou até superior ao do hidróxido de cobre, produto de contato com baixo poder residual, principalmente em condições de chuva ou irrigação por aspersão, como no caso do presente estudo.

É possível o desenvolvimento de formulações que protejam os bacteriófagos do efeito deletério da luz UV na superfície das folhas (Balogh *et al.* 2003). Porém o isolamento de fagos deste ambiente pode resultar na seleção de vírus, cujas partículas virais sejam mais resistentes a este tipo de condição. Pensando assim, seria lógico esperar que fagos isolados do solo tivessem menor efeito no controle de uma doença de parte aérea em relação àqueles fagos isolados deste nicho. Entretanto, não se observou esta diferença em nosso estudo. Considerando que Balogh *et al.* (2003) observaram maior redução da viabilidade dos fagos após 20 horas da aplicação, um estudo mais detalhado sobre a sobrevivência dos fagos prospectados deve ser conduzido com avaliação de seu efeito residual.

Para o manejo de doenças bacterianas, há pouca disponibilidade de produtos, sendo o uso de cúpricos a principal opção utilizada pelos produtores. O uso de fagos associados a outras estratégias de manejo da mancha bacteriana do tomateiro, como os indutores de resistência, como o acibenzolar-S-metil, pode apresentar resultados superiores às tradicionais aplicações de produtos à base de cobre (Obradović *et al.* 2004).

Neste estudo, foi possível o isolamento de fagos com capacidade patogênica a *X. perforans*, principal espécie associada à mancha bacteriana do tomateiro no Brasil (Araújo *et al.* 2017). A aplicação de alguns destes fagos possibilitou redução da severidade da doença, o que indica ser esta uma alternativa promissora a ser inserida no manejo da mancha bacteriana em nossos cultivos de tomate.

3.5 Conclusão

Neste trabalho foi possível o isolamento de 14 bacteriófagos em áreas de produção de tomate, oriundos tanto de amostras de folhas como de solo. Houve diferenças entre isolados de *Xanthomonas perforans* em relação à sensibilidade a estes

fagos. Entre os 14 fagos, 3 foram selecionados para serem submetidos ao teste *in vivo*, mostrando-se capazes de infectar e reduzir a severidade da mancha bacteriana do tomateiro quando incitada por isolados do patógeno sensíveis a eles.

3.6 Referências

- Adams MH (1959) *In*: Bergamin Filho A (2019) Caracterização de um bacteriófago ativo contra *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson e *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson e seu emprego no controle desses patógenos. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. <https://doi.org/10.11606/T.11.2019.tde-20191220-105322>
Tese de doutorado (Agronomia, Fitopatologia) - Universidade de São Paulo (1975).
Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-20191220-105322/fr.php>. Acesso: em 3 jan. 2020
- Araújo ER, Costa JR, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM (2017), Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. *Plant Pathol*, 66:159-168. doi:10.1111/ppa.12543
- Araújo ER, Pereira RC, Ferreira MASV, Café-Filho AC, Moita AW, Quezado-Duval AM (2011). Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas Perforans* and *X. Gardneri*. *Acta Hortic*. 914:39-42
- 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
- Balogh B, Jones J.B, Momol MT, Olson SM, Obradović A, King P, Jackson LE (2003) Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease*.87:949-954. doi:10.1094/PDIS.2003.87. 8.949
- Buttimer C, Macauliffe RPR, Hill C, O’Mahony J, Coffey A (2017) Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Frontiers Microbiology*
- 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
- Flaherty JE, Jones JB, Harbaugh BK, Somodi GC, Jackson LE (2000) Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. *HortScience*, 35:882-4
- 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

Gill J, Abedon ST (2003) Bacteriophage Ecology and Plants. *APSnet Features*, Online. doi: 10.1094/APSnetFeature-1103

Hert AP, Marutani M, Momol MT, Roberts PD, Olson SM, Jones JB (2009) Suppression of the bacterial spot pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato leaves by an attenuated mutant of *Xanthomonas perforans*. *Applied and Environmental Microbiology* May, 75(10):3323-3330

Hert AP, Roberts PD, Momol MT, Minsavage GV, Tudor-Nelson SM, Jones JB (2005) Relative importance of bacteriocin-like genes in antagonism of *Xanthomonas perforans* tomato race 3 to *Xanthomonas euvesicatoria* tomato race 1 strains. *Applied and Environmental Microbiology* Jul 2005, 71(7):3581-3588

Jones JB, Vallad GE (2012) Soil-based systemic delivery and phyllosphere in vivo propagation of bacteriophages: Two possible strategies for improving bacteriophage persistence for plant disease control. *Bacteriophage*, 2:215-224

Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. (2004) Reclassification of the *Xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper *System. & Appl Microbiol*, 27:755–62

Jones JB, Vallad GE, Iriarte FB, Obradović A, Wernsing MH, Jackson LE, Balogh B, Hong JA, Momol MT (2012) Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage*, 2(4):208–214

Klement, Z (1959) Some new specific bacteriophages for plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *Nature*, 184:1248-1249

Nascimento AR, Fernandes PM, Borges LC, Moita AW, Quezado-Duval AM (2013) Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo - *Horticultura Brasileira*, Goiânia - Go 31:15-24

Potnis N, Soto-Arias JP, Cowles KN, van Bruggen AHC, Jones JB, Barak JD (2014) *Xanthomonas perforans* colonization influences enterica in the tomato phyllosphere. *applied and environmental microbiology* Apr 2014, 80(10):3173-3180

Obradović A, Jones JB, Momol MT, Balogh B, Olson SM (2004) Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Dis*, 88:736–40

Obradović A, Jones JB, Momol MT, Olson SM, Jackson LE, Balogh B, Guven K, Iriarte FB (2005) Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Dis*, 89:712–6

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

Romero-Suarez S, Jordan B, Heinemann JA (2012) Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the causal agent of walnut blight disease. *World Journal Microbiology Biotechnology*

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

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Perspective prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 6578–6583. doi: 10.1073/pnas.95.12.6578

Wommack KE, Colwell RR (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:69-114. doi: 10.1128/MMBR.64.1.69-114