

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO CAMPUS
MORRINHOS
BACHARELADO EM AGRONOMIA**

THAYNARA MENDONÇA MARTINS

**DETERMINAÇÃO DA NATUREZA DO ÁCIDO NUCLÉICO DE BACTERIÓFAGOS QUE
INFECTAM *Xanthomonas perforans* ASSOCIADAS A MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO**

**MORRINHOS
Dezembro/2022**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL GOIANO CAMPUS MORRINHOS**

AGRONOMIA

**DETERMINAÇÃO DA NATUREZA DO ÁCIDO NUCLÉICO DE BACTERIÓFAGOS QUE
INFECTAM *Xanthomonas perforans* ASSOCIADAS A MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO**

THAYNARA MENDONÇA MARTINS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal Goiano – *Campus Morrinhos*, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes

MORRINHOS

Dezembro/2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Morrinhos

M379d Martins, Thaynara Mendonça.

Determinação da natureza do ácido nucléico de bacteriófagos que infectam *Xanthomonas* spp. associadas a Mancha Bacteriana do tomateiro. / Thaynara Mendonça Martins. – Morrinhos, GO: IF Goiano, 2022.
22 f. : il.

Orientador: Dr. Nadson de Carvalho Pontes.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, Bacharelado em Agronomia, 2022.

1. Pragas agrícolas - Controle biológico. 2. Bacteriófagos. 3. Mancha Bacteriana. I. Pontes, Nadson de Carvalho. II. Instituto Federal Goiano. III. Título.

CDU 635.64



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO
DA EDUCAÇÃO

SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO
FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 14/2022 - GPGPI-MO/CMPMHOS/IFGOIANO

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

Aos doze dias do mês de dezembro de 2022, às 13 horas, reuniu-se a banca examinadora composta por: Nadson de Carvalho Pontes (orientador), Leonardo Cunha de Albuquerque (membro) e Thayssa Monize Rosa de Oliveira (membro), para examinar o Trabalho de Curso intitulado “DETERMINAÇÃO DA NATUREZA DO ÁCIDO NUCLÉICO DE BACTERIÓFAGOS

QUE INFECTAM *Xanthomonas perforans* ASSOCIADAS A MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO” da discente Thaynara Mendonça Martins, Matrícula nº 2018104220210287 do Curso de Bacharelado em Agronomia do IF Goiano – Campus Morrinhos. A palavra foi concedida à estudante para a apresentação oral do TC. Em seguida houve arguição do discente pelos membros da banca examinadora. Após tal etapa, a banca examinadora decidiu pela APROVAÇÃO do(a) estudante com NOTA 8,25. Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora.

(Assinado Eletronicamente)

Nadson de Carvalho Pontes

Orientador(a)

(Assinado Eletronicamente)

Leonardo Cunha de Albuquerque

Membro

(Assinado Eletronicamente) Thayssa

Monize Rosa de Oliveira

Membro

Observação:

() O(a) estudante não compareceu à defesa do TC.

Documento assinado eletronicamente por:

- **Thayssa Monize Rosa de Oliveira, 2022204341340001 - Discente, em 12/12/2022 16:19:52.**
- **Leonardo Cunha de Albuquerque, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 12/12/2022 14:29:47.**
- **Nadson de Carvalho Pontes, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 12/12/2022 14:27:16.**

Este documento foi emitido pelo SUAP em 12/12/2022. 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: 452094

Código de Autenticação: 4299e4da95



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Campus Morrinhos

Rodovia BR-153, Km 633, Zona Rural, None, None, MORRINHOS / GO, CEP 75650-000

(64) 3413-7900

DEDICATÓRIA

Primeiramente dedico a Deus por me dar forças e abençoar com a graça de estar concluindo mais uma etapa da minha vida, com a oportunidade que recebi de ingressar no curso de Bacharelado em Agronomia, e a minha família, amigos e professores. Ao meu pai Sergio Alves Martins que sempre foi exemplo em tudo na minha vida, a minha mãe Alessandra Borges Mendonça Martins que me deu toda inspiração possível para que o objetivo fosse alcançado. Aos meus amigos e colegas do grupo de pesquisa LAFIP, em especial ao João Pedro, Thayssa, Raphael e Larissa ajudando na condução e execução do projeto. E por fim ao Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos – GO, que me ajudou e proporcionou todo encaminhamento no trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela toda graça concedida, foco, força e fé durante este período de estudo que foi um grande desafio para a minha jornada.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos, que foi extremamente fundamental para que eu pudesse ter está grande oportunidade de ingressar em um curso superior de grande importância para nossa região. Também pela bolsa de pesquisa ofertada pelo Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) do Instituto Federal Goiano, campus Morrinhos, concedida durante 2 anos e meio de curso e ao grupo de pesquisa LAFIP (Laboratório de Fitopatologia) pelo apoio e fornecimento de equipamentos e insumos.

Em especial ao meu Prof. Dr. e orientador Nadson de Carvalho Pontes, pela amizade, orientação e confiança dedicadas a mim durante a realização deste trabalho. A prof. Dra. Miriam Fumiko Fujinawa que sempre me incentivou e apoiou em todos os momentos de estudo e trabalho desde o início do curso.

A Dra, Thayssa Monize Rosa de Oliveira e ao Dr. Leonardo Albuquerque pelas sugestões apresentadas, pela atenção e pela disponibilidade em participar da banca de defesa.

Aos meus colegas, Larissa, Leticia, Raphael, Rafaella, Marya, Lucas, César e Flavio os quais foram sempre solícitos, além da amizade dedicada a mim, força e companheirismo.

Aos estagiários voluntários do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos Wallace, Eduardo e Gustavo que me auxiliaram durante o desenvolvimento do TCC.

E por fim agradeço a minha família que sempre obteve em me ajudar durante todo curso, em especial meu pai Sergio Alves Martins e a minha mãe Alessandra Borges Mendonça Martins, pelo carinho, educação, apoio e confiança tidos a mim, ao meu irmão Thiago Mendonça Martins pelo incentivo, amizade e por toda ajuda e amparo durante toda a faculdade e todas as pessoas que de forma direta ou indiretamente fizeram parte desta etapa importante da minha vida.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Resumo.....	10
Abstract.....	11
1.Introdução	12
2.Materiais e Métodos.....	15
3.Resultados e Discussões	17
4.Conclusão.....	20
5.Referências Bibliográficas.....	21

Resumo

MARTINS, THAYNARA MENDONÇA. **DETERMINAÇÃO DA NATUREZA DO ÁCIDO NUCLÉICO DE BACTERIÓFAGOS QUE INFECTAM *Xanthomonas perforans* ASSOCIADAS A MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO.** 2022. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Bacharelado em Agronomia). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Morrinhos, Morrinhos, GO, 2022.

Os bacteriófagos são usados como agentes de controle biológico de várias fitobacterioses. Para a mancha bacteriana do tomateiro, o seu uso tem mostrado sucesso no controle quando comparado ao controle químico. Devido à enorme diversidade dos bacteriófagos, natureza do ácido nucléico é um dos critérios para classificação em Ordem e Família, assim como a morfologia. Por esta razão, o objetivo do trabalho foi caracterizar a natureza do material genético dos bacteriófagos da coleção do IF Goiano Campus Morrinhos que infectam *Xanthomonas perforans*, causadora da mancha bacteriana do tomateiro. Foi realizado a extração do ácido nucleico de seis isolados de bacteriófagos e 3 alíquotas de 10 µl foram reservadas de cada isolado. A primeira alíquota recebeu o tratamento com RNase, a segunda foi tratada com DNase e a terceira foi o controle e não recebeu nenhum tratamento. Todos os tratamentos foram executados conforme indicado pelo fabricante da enzima. Após tratamento, alíquotas de ácido nucleico foram submetidas à eletroforese em gel agarose a 1% a 100 V por 40 min. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio, colocado em um transluminador com luz UV e resultado foi observado por meio da imagem obtida com um fotodocumentador. Foi possível determinar que todos os bacteriófagos, F1, F2, F3, F4, F5 e F6, apresentam ácido desoxirribonucleico (DNA) como material genético.

Palavras-chaves: Controle biológico; *Solanum lycopersicum*; Vírus; *Xanthomonas* spp.

Abstract

MARTINS, THAYNARA MENDONÇA. **DETERMINATION OF THE NATURE OF THE NUCLEIC ACID OF BACTERIOPHAGES THAT INFECT *Xanthomonas perforans* ASSOCIATED WITH TOMATO BACTERIAL SPOT.** 2022. Completion of course work (Bachelor's Course in Agronomy). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Morrinhos, Morrinhos, GO, 2022.

Bacteriophages are used as biological control agents for various phyto-bacterial diseases. For tomato bacterial spot, its use has been shown to be successful in controlling it when compared to chemical control. Due to the enormous diversity of bacteriophages, the nature of the nucleic acid is one of the criteria for classification into Order and Family, as well as morphology. For this reason, the objective of this work was to characterize the nature of the genetic material of bacteriophages from the collection of the IF Goiano Campus Morrinhos that infect *Xanthomonas perforans*, which causes bacterial leaf spot in tomato. Nucleic acid extraction of six bacteriophage isolates was performed and 3 aliquots of 10 µl were reserved from each isolate. The first aliquot received the RNase treatment, the second was treated with DNase, and the third was the control and received no treatment. All treatments were performed as indicated by the enzyme manufacturer. After treatment, aliquots of nucleic acid were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel at 100 V for 40 min. Then, the gel was stained with ethidium bromide, placed in a transilluminator with UV light and the result was observed through the image obtained with a photodocumenter. It was possible to determine that all bacteriophages, F1, F2, F3, F4, F5 and F6, present deoxyribonucleic acid (DNA) as genetic material.

Keywords: Biological control; *Solanum lycopersicum*; Virus; *Xanthomonas* spp.

1. Introdução

O Brasil está entre os dez principais produtores de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) do mundo. Em 2022, estima-se o plantio de 53 mil hectares no país, com produção de 3,6 milhões de toneladas (IBGE, 2022). Goiás é o principal estado produtor de tomate com 27,3% da produção nacional, sendo 12.300 hectares de área plantada em 2022 apenas para o cultivo destinado ao processamento (CEPEA, 2022). Uma das grandes dificuldades da produção de tomate é a grande incidência de doenças. Dentre as principais doenças, podemos destacar a mancha bacteriana do tomateiro.

A mancha bacteriana do tomateiro foi relatada pela primeira vez no Brasil, no Estado de São Paulo em 1959 (Rodrigues Neto et al., 1984). Esta doença é considerada a mais importante no segmento destinado ao processamento industrial. Os sintomas da mancha bacteriana do tomateiro podem se manifestar em todos estágios de desenvolvimento da cultura, em sua parte aérea, sob condições favoráveis tais como altas temperaturas, chuvas, chuvas de granizo e ventos, e a presença do patógeno (Quezado-Duval & Lopes, 2010). Os prejuízos são devido a redução da produtividade causada pela destruição foliar de difícil controle (Lopes & Quezado, 2000).

A doença é causada por bactérias do gênero *Xanthomonas*, classificadas em quatro diferentes espécies: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans*. Embora todas ocorram em tomateiro no Brasil, a espécie *X. perforans* é considerada prevalente nas principais áreas de produção. A mancha bacteriana do tomateiro é favorecida pela umidade e apresenta maior incidência em áreas irrigadas por aspersão ou pivôs, ou em épocas chuvosas (Quezado-Duval & Lopes, 2010). Temperaturas elevadas, próximas de 30°C, favorecem o desenvolvimento da doença causada por *X. perforans* (Araújo et al., 2011).

Além de fatores climáticos e ambientais favoráveis, o controle da mancha bacteriana do tomateiro é dificultado pela presença de fontes de inóculo no campo: plantas voluntárias de tomate, restos culturais e sementes infectadas (Jones et al., 1986). Além dessas fontes de inóculo, *Solanum americanum* (maria-pretinha), *Nicandra physaloides* (joá-de-capote), e *Euphorbia heterophylla* (leiteira) são hospedeiras de isolados patogênicos de *Xanthomonas* spp., detectados nos Estados de Goiás e Santa Catarina (Araújo et al., 2015).

Com ausência de variedades comerciais resistentes e a variável eficiência do controle químico, as perdas na produção de tomate geradas pela mancha bacteriana podem ser altas (Quezado-Duval & Lopes, 2010). O controle químico da mancha bacteriana do tomateiro é

realizado com antibióticos e de produtos à base de cobre. Com o uso recorrente desses produtos pelos agricultores, podem surgir populações de bactérias resistentes, o que pode contribuir para ineficiência desses produtos (Nascimento et al., 2013).

Dos produtos químicos registrados, apenas oxitetraciclina e cobre ainda mantêm um controle mais eficiente (Quezado-Duval et al., 2003; Araújo et al., 2012). Outro princípio ativo utilizado é o acibenzolar-S-metil, um análogo ao ácido salicílico capaz de induzir resistência adquirida (SAR) em plantas (Louws et al. 2001). Apesar de reduzir a severidade da doença, estes produtos promovem um aumento no gasto energético, por exigir uma redistribuição de metabólitos que seriam voltados ao crescimento e produção, só sendo viável com adoção de programa limitado de aplicações (Walters & Fountaine, 2009; Pontes et al., 2016).

Com a pouca disponibilidade de produtos eficazes, alternativas de controle para a mancha bacteriana são exploradas, como o uso de bacteriófagos que tem mostrado ser uma alternativa e muito explorado nos Estados Unidos (Quezado-Duval, 2004). Além da eficiência, a especificidade quanto a espécie bacteriana alvo, os bacteriófagos não apresentam riscos ao ambiente e nem aos seres humanos e animais, merecendo estudos e desenvolvimento para que se torne uma ferramenta no controle da doença (Sulakvelidze et al, 2001).

Segundo Buttmer et al. (2017), mesmo tendo sido descobertos como “compostos antibacterianos”, apenas no início do século 20 foram afirmados como vírus por Frederick Twort e Felix d'Herelle. A princípio, usados para pesquisas voltadas ao controle de bactérias patogênicas a humanos e animais, os bacteriófagos foram, posteriormente, utilizados no controle de fitobacterioses por Mallman e Hemstreet. Estes autores observaram que o filtrado de um líquido recolhido a partir da decomposição de couve inibiu o crescimento da bactéria que causou a podridão, no caso *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Mallman & Hemstreet apud Buttmer, 2017).

Os bacteriófagos, são vírus específicos de bactérias (Romeiro, 2005). A classificação dos bacteriófagos é feita com base na morfologia da partícula viral e na natureza do material genético (DNA, RNA, fitas ‘ss’ ou ‘ds’). A grande maioria das estirpes virais descritas pertencem a ordem Caudovirales, tendo como principais famílias as Siphoviridae, Myoviridae e Podoviridae (Ackermann, 1999). São parasitas obrigatórios, e precisam da bactéria para completar seu ciclo de replicação (Duckworth, 1987). Apesar de haver predomínio de fagos com DNA em sua composição, existe descrição na literatura de fagos com RNA. É o caso do fago $\phi 6$ que infecta

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*, cujo material genético é constituído de RNA de fita dupla (Mindich, 1999).

A multiplicação viral ocorre pelo ciclo lítico e/ou lisogênico (Abedon, 2006). No ciclo lítico, a infecção resulta na multiplicação de novas partículas virais e lise da bactéria hospedeira para liberação dos mesmos. Já no ciclo lisogênico, o material genético do fago se integra ao cromossomo bacteriano ou persiste como um plasmídeo e se multiplica a cada fissão binária do hospedeiro. O ideal para selecionar fagos como agente de controle biológico é escolher fagos que usam o ciclo lítico como multiplicação no hospedeiro alvo. Os fagos que utilizam o ciclo lisogênico são conhecidos como prófagos e não são eficientes no controle de doenças bacterianas (Drulis et al., 2012).

Atualmente, é utilizado como produto de biocontrole a base de fagos, o Agriphage®, criado para o controle de manchas bacterianas de tomate e pimentão, sendo específico para *Xanthomonas* spp., causadora da mancha bacteriana do tomateiro, e *Pseudomonas syringae* pv. *tomate*, causadora da pinta preta do tomateiro. O produto pertence à empresa Omnilytics®, que foi a primeira empresa a receber o registro da agência de proteção ambiental US para um biocontrole a base de fago (Buttimer et al., 2017).

Por serem muito específicos em relação à espécies e/ou isolado bacteriano, misturas entre bacteriófagos, chamadas coquetéis são realizadas para que se aumente o espectro de controle da bactéria alvo (Buttimer et al., 2017). Com um número estimado de 10^{31} unidades, os fagos são considerados a entidade biológica mais abundante na biosfera (Whitman et al, 1998). Tal número é importante, pois quanto maior a diversidade de fagos, maior a chance de achar fagos diferentes para um mesmo alvo e menor o risco de resistência. Por esta razão, o presente trabalho tem por objetivo determinar a natureza do ácido nucléico dos isolados de bacteriófagos capazes de infectar *X. perforans*, de modo a caracterizá-los e permitir a utilização de isolados geneticamente distintos em aplicações para este alvo.

2. Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de Fitopatologia (LAFIP) do Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos. Os isolados de bacteriófagos F1, F2, F3, F4, F5 e F6, capazes de infectar espécies de *Xanthomonas*, causadora da mancha bacteriana do tomateiro, pertencem a coleção do Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos. Estes foram prospectados no trabalho “Isolamento e Caracterização de bacteriófagos com foco na sua utilização para o controle da mancha bacteriana do tomateiro” desenvolvido por Souza (2020).

Cada bacteriófago foi cultivado em suspensão bacteriana de *Xanthomonas perforans* em meio líquido Nutriente (5 g de peptona, 5 g de NaCl, 1,5 g de extrato de levedura, 1,5 g de extrato de carne e 1000 ml de água destilada). Após 24 horas sob agitação a 90 rpm, a 28°C, foi adicionado 10% de volume de clorofórmio e agitado gentilmente. A suspensão foi centrifugada a 10000 rpm por 10 min e o sobrenadante filtrado em filtros de 0,22 µm. Assim, realizado uma nova centrifugação, a 20000 rpm por 30 min. O sobrenadante é descartado e o pellet ressuspensionado com SM Buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄.7H₂O, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01 % (w/v) gelatina).

A partir da suspensão de cada isolado de bacteriófago na concentração 10⁸ unidades formadoras de placas por ml (UFP.ml⁻¹) foi realizado a extração do ácido nucleico, pelo método descrito por Sambrook & Russel (2001). Para a extração dos ácidos nucleicos dos bacteriófagos, primeiro foi adicionado uma alíquota de proteinase K (concentração final 50 µl/ml) em um microtubo de 1,5 ml com amostra de fago, depois adicionou-se SDS (Dodecil sulfato de sódio) (10% m/v) para concentração final ficar 0,5%. A mistura foi homogeneizada gentilmente e incubada por 1 hora a 56 °C. Após este período, quando a mistura resfriou até a temperatura ambiente, foi adicionado o volume igual de fenol e misturado gentilmente até formar uma emulsão. Esta foi centrifugando a 5000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada uma solução 1:1 de fenol e clorofórmico, sendo novamente centrifugada a 5000 rpm por 5 min. Decorrido este procedimento, o sobrenadante foi transferido para um microtubo novo. Para precipitação do ácido nucleico, foi adicionado etanol à -20°C. A mistura foi agitada e centrifugada a 14000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o ácido nucleico precipitado foi deixado em temperatura ambiente até secar. Após seco, foi adicionado TE (pH 7,6 (TRIS HCl pH 7,6 10 mM/EDTA pH 7,6 1M) dado um vortex e spin.

Foi realizado um gel de integridade para conferir a qualidade do ácido nucleico. A visualização da integridade ou não do ácido nucléico foi feito por meio da eletroforese em gel agarose. Para preparo do gel, em um Erlenmeyer contendo 100 ml de TAE 1% (Tris-Acetato-EDTA), foi adicionado 1g de agarose. O Erlenmeyer foi levado ao microondas para aquecimento por aproximadamente 3 minutos ou até que a solução estivesse completamente translúcida. Assim que resfriada a solução, esta foi vertida para um molde e um pente posicionado acima para formação dos poços. Após solidificar, o gel foi transferido para uma cuba de eletroforese contendo TAE 1%. No primeiro poço, foi adicionado o marcador 1Kb Plus. Em cada um dos demais poços, foi adicionado 5 µl de ácido nucleico de um fago e 3 µl de tampão de carregamento. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por 40 min. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio, colocado em um transluminador com luz UV e resultado foi observado por meio da imagem obtida com um fotodocumentador.

Confirmada a integridade do ácido nucleico, procedeu-se o tratamento do ácido nucleico com RNase e DNase para determinar a natureza deste. Três alíquotas de ácido nucléico de cada isolado de bacteriófago foram separadas para o ensaio. A primeira alíquota foi tratada com RNase, a segunda, com DNase, e a terceira não recebeu nenhum tratamento. Os tratamentos foram conduzidos conforme recomendação do fabricante. Ambas as enzimas utilizadas foram da marca Invitrogen TM. Para cada isolado de fago foi utilizado três microtubos. No primeiro microtubo foi misturado 5 µl de ácido nucleico, 2,5 µl de RNase e 2,5 µl de tampão de carregamento. No segundo microtubo foi adicionado com 5 µl de ácido nucleico, 2,5 µl de DNase, 2,5 µl de Buffer e 2,5 µl de tampão de carregamento. No terceiro microtubo, foi adicionado apenas 5 µl de ácido nucleico e 2,5 µl de tampão de carregamento. A visualização da degradação ou não do ácido nucléico foi feito por meio da visualização de gel de agarose após eletroforese, conforme procedimento descrito anteriormente. A confirmação da degradação foi dada pela ausência de banda quando comparado com o controle (ácido nucléico sem nenhum tratamento).

3. Resultados e Discussões

Houve êxito no procedimento de extração do ácido nucleico dos bacteriófagos. Para todos os fagos, foi possível observar por meio da eletroforese de gel agarose 1% a integridade dos ácidos nucleicos (Figura 1). Tal resultado permitiu ser possível o estudo da natureza do material genético por meio da utilização das nucleases.

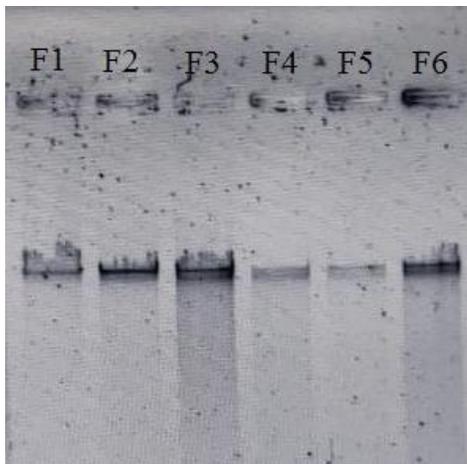


Figura 1. Imagem do gel de agarose 1% dos ácidos nucleicos dos isolados de bacteriófagos (F1, F2, F3, F4, F5 e F6) após a extração.

A partir da eletroforese de gel agarose dos ácidos nucleicos tratados com RNase, DNase e sem tratamento, foi possível determinar a natureza do ácido nucleico dos fagos como sendo o ácido desoxirribonucleico (DNA). Tal conclusão é possível pois não são bandas que indicassem presença de ácido nucleico no gel após tratamento com DNase (Figura 2, poços 2 a 7). Nos demais poços, com tratamento com RNase ou sem tratamento, haviam presença de bandas indicando ácido nucleico íntegro.

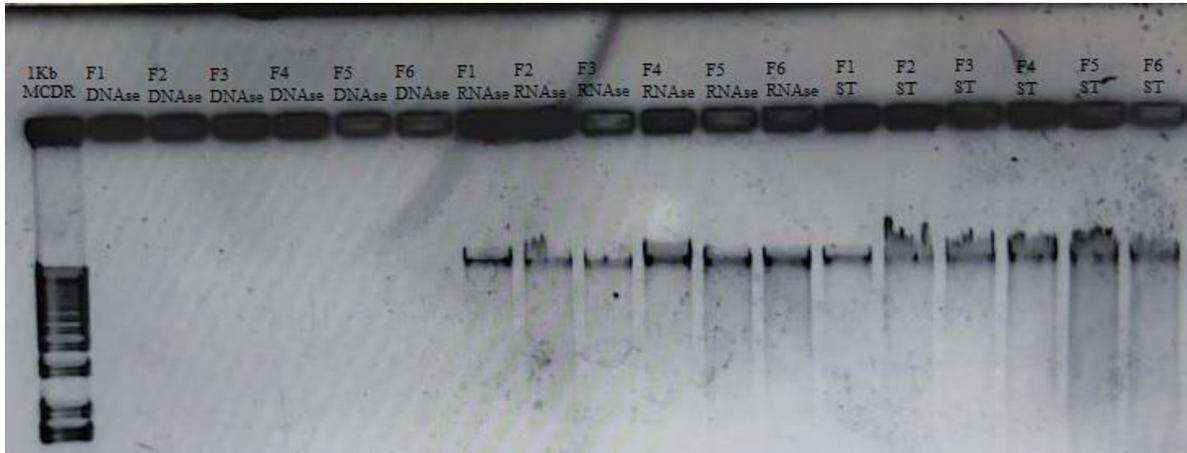


Figura 2. Imagem do gel de agarose após eletroforese contendo amostras dos ácidos nucleicos dos isolados de bacteriófagos (F1, F2, F3, F4, F5 e F6) tratados com DNase (poços 2 a 7), RNase (poços 8 a 13) e sem tratamento (=ST, poços 14 a 19). MCDR 1Kb (poço 1) = Marcador 1Kb.

Este resultado indica a abundância de fagos com DNA na composição do material genético. Como observado para os fagos descritos para o controle de outras espécies de *Xanthomonas*, causadoras de doenças de plantas. Um exemplo é o fago Xp10, descrito como patogênico à *X. oryzae* pv. *oryzae*, o qual pertence à família *Siphoviridae* e seu genoma é de DNA de fita dupla (Yuzenkova et al., 2003). As mesmas características foram encontradas para os fagos Cp1 e Cp2, que infectam *X. axonopodis* pv. *citri* (Ahmad et al., 2014). Já, o isolado XacN1, que também infecta *X. axonopodis* pv. *citri*, apresenta RNA de fita dupla. Entretanto, pertence a outra família *Myoviridae*, também bastante comum entre os fagos que controlam fitobacterioses (Yoshikawa et al., 2018).

Uma das principais vantagens da fagoterapia está no fato de os bacteriófagos serem extremamente específicos na lise celular bacteriana, não sendo prejudiciais a seres humanos e animais, pois não afetam outras espécies bacterianas a não ser o alvo (Sulakvelidze, et al, 2001; Buttimer et al., 2017). Porém, também é importante avaliar o nível de especificidade de fagos dentro de uma mesma espécie. Todos os fagos avaliados no presente estudo são patogênicos à *X. perforans*. Porém, o fato destes fagos terem o mesmo tipo de material genético pode indicar que estes sejam geneticamente muito parecidos. Assim, caso não haja diversidade genética entre eles, a ocorrência de isolados de *X. perforans* resistentes à algum destes fagos, pode inviabilizar o uso dos demais em coquetel.

Apesar de todos os fagos avaliados serem fagos de DNA, há de se considerar que há predomínio de fagos com DNA em sua composição (Ackermann, 1999). Sendo um grupo maior, é certo haver diversidade genética dentre os fagos de DNA. O uso de técnicas de avaliação de diversidade genética dos isolados de bacteriófagos, torna-se necessário para prospecção dos fagos com características intrínsecas. Haja vista que o relacionamento fago/bactéria costuma ser muito específicos em relação à espécies e/ou isolado bacteriano, os coquetéis de fagos a serem utilizados no controle de doenças bacterianas devem utilizar isolados geneticamente distintos (Buttimer et al., 2017). Haja vista a abundância dos fagos na biosfera (Whitman et al, 1998), técnicas moleculares podem permitir detectar diversidade genética entre fagos que infectam uma mesma espécie bacteriana.

Algumas técnicas, como RFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA), RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) e AFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado), permitem detectar polimorfismos entre organismos da mesma espécie ou grupo. Essas técnicas são procedimentos rápidos, que não tem necessidade prévia de um sequenciamento para distinguir indivíduos. Para bacteriófagos de *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Lactococcus* spp. e *Streptococcus* spp., o RAPD, por exemplo, com primers P1, P2 e OLP5 apresentou com sucesso o polimorfismo entre eles (Gutiérrez et al., 2011). Todas estas técnicas necessitam de material genético extraído de qualidade, o que é possível conforme resultado das técnicas empregadas no presente estudo. O método utilizado neste trabalho, para determinar a natureza de ácido nucleico de fagos, é importante como etapa de caracterização molecular dos bacteriófagos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. Haja vista que todos os fagos avaliados são de DNA, um próximo passo seria avaliar a diversidade genética por meio das técnicas supracitadas.

4. Conclusão

Não houve diferença entre a natureza do ácido nucleico dos bacteriófagos de *Xanthomonas perforans* avaliados no presente estudo. Todos os isolados de fagos tinham como material genético o DNA.

5. Referências Bibliográficas

ABEDON, S. T. **Bacteriophage Ecology, Population Growth, Evolution and Impact of Bacterial Viruses.** Cambridge; p. 3-5. 2006.

ACKERMANN, H.W. **Tailed bacteriophages: the order Caudovirales.** Adv. Virus Res. 51:135-201, 1999.

AHMAD, A. A. et al. **Characterization of bacteriophages cp1 and cp2, the strain-typing agents for *xanthomonas axonopodis* pv. citri.** Applied and Environmental Microbiology, v. 80, n. 1, p. 77– 85, 1 jan. 2014.

ARAÚJO, E.R.; COSTA J. R.; PONTES N. C.; QUEZADO-DUVAL, A.M. ***Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* associated with bacterial leaf spot on weeds in Brazilian tomato fields.** European Journal of Plant Pathology, 2015.

ARAÚJO, E.R.; PEREIRA, R.C.; FERREIRA, M.A.S.V.; CAFÉ-FILHO, A.C.; & MOITA, A.; QUEZADO-DUVAL, A.M. **Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*.** Acta Horticulturae. 914. 39-42. 10.17660/ActaHortic.2011.914.3., 2011.

ARAÚJO, E.R.; PEREIRA, R.C.; FERREIRA, M.A.S.V.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; CAFÉ-FILHO A. C. **Sensitivity of *Xanthomonas* Causing Tomato Bacterial Spot To Copper And Streptomycin And In Vivo Infra-Specific Competitive Ability In *Xanthomonas perforans* Resistant And Sensitive To Copper.** EMBRAPA, Brasil Journal of Plant Pathology. Brasília. 94 (1), 79-87, 2012.

BALOGH, B., JONES, J. B., MOMOL, M. T., OLSON, S. M., OBRADOVIC, A., KING, P., & KACKSON, L. E. **Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot of tomato.** Plant Disease, 87, pp. 949-954, 2003.

BUTTNER, C.; MCAULIFFE, O.; OSS, R.P.; HILL, C.; O'MAHONY, J.; COFFEY, A. **Bacteriophages and bacterial plant diseases.** Frontiers in microbiology, 8, 34, 2017.

CEPEA/ESALQ/USP. 2022. **Anuário 2021-2022.** Revista Brasil Hortifruti. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-2021-2022_retrospectiva-2011-perspectivas-2022-dos-hf-s.aspx>. Acesso em: 20 outubro de 2022.

DRULIS-KAWA, Z.; SKROBEK, G. M.; MACIEJEWSKA, B.; DELATTRE, A. S. and LAVIGNE, R. **Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications.** Current Protein and Peptide Science, v. 13, n. 8, p. 699-722, 2012.

DUCKWORTH, D. **History and basic properties of bacterial viruses.** Phage Ecology (Goyal S M, Gerba C P, Bitton G. Eds), John Wiley & Sons, New York, 1-44, 1987.

GUTIÉRREZ, D., MARTÍN-PLATERO, A.M., RODRÍGUEZ, A., MARTÍNEZ-BUENO, M., GARCÍA, P., MARTÍNEZ, B. **Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity.** FEMS microbiology letters, 322(1), 90-97, 2011.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (Brasil). SIDRA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Área plantada, área colhida e produção, por ano da safra e produto das lavouras.** AGROSTAT - Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro, [s. l.]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>. Acesso em: 06 nov. 2022.

JONES, J. B., LACY, G. H., BOUZAR, H., STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. **Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper.** Systematic and applied microbiology, 27(6), 755-762, 2004.

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, 76, 430–434, 1986.

LANG, J. M., GENT, D. H., & SCHWARTZ, H. F. **Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophage and a plant activator.** Plant Disease. 91, pp. 871-878, 2007.

LOPES C. A; QUEZADO-SOARES A. M. **Doenças causadas por bactérias em tomate.** In: ZAMBOLIM L; VALE FXR; COSTA H. (ed). **Controle de doenças de plantas: hortaliças.** Viçosa: UFV. p. 754-784. 2000.

LOUWS, F. J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; JONES, J. B.; SHOEMAKER, P. B.; SAHIN, F.; MILLER, S. A. **Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator.** Plant Disease. 85:481-488. 2001.

MALLMANN, W. L. & HEMSTREET, C. **Isolation Of An Inhibitory Substance From Plants.** Department of Bacteriology, Michigan Agricultural College, 1924.

MCKENNA, F.; EL-TARABILY, K. A.; HARDY, G. E. S. T.; & DELL, B. **Novel in vivo use of a polyvalent *Streptomyces* phage to disinfect *Streptomyces scabies* infected seed potatoes.** Plant Pathology. 50, pp. 666-675, 2001.

MINDICH, L. **Reverse genetics of dsRNA bacteriophage ϕ 6.** In: **Advances in virus research.** Academic Press, 1999. p. 341-353.

NASCIMENTO, A. D. R., FERNANDES, P. M., BORGES, L. C., MOITA, A. W., & QUEZADO-DUVAL, A. M. **Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo.** Horticultura Brasileira, v. 31, n. 1, p. 15-24, 2013.

PONTES, N. C.; NASCIMENTO, A. R.; GOLYNSKI, A., MAFFIA, L. A.; OLIVEIRA, J. R.; QUEZADO-DUVAL, A. M. **Intervalos e número de aplicações de Acibenzolar-S-Methyl para o controle da mancha bacteriana no processamento de tomate.** Plant Disease, 2016.

QUEZADO-DUVAL, A. M., LEITE JR, R. P., TRUFFI, D., CAMARGO, L. E. **Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil.** Plant disease, 88(2), 157-161, 2004.

QUEZADO-DUVAL, A.M. & LOPES, A.C. **Mancha bacteriana: uma atualização para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria.** Circular técnica 84 EMBRAPA, Brasília, 2010.

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

RODRIGUES NETO, J.; SUGIMORI, M. H.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; **Raças de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, no Estado de São Paulo.** 51. São Paulo - SP: Instituto Biológico. p.13-16. 1984.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas.** Viçosa: Editora UFV.2005.

SOUSA, D. M. **Isolamento e Caracterização de Bacteriófagos com foco na sua utilização para controle da Mancha Bacteriana do Tomateiro.** 2020.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, Jr. J. G. **Bacteriophage therapy.** Antim Agents and Chemother, 45, 649-659, 2001.

WALTERS, D. R. & FOUNTAINE, J. M. **Practical application of induced resistance to plant diseases: An appraisal of effectiveness under field conditions.** The Journal of Agricultural Science. 147:523-535, 2009.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; AND WIEBE, W. J. **Perspective prokaryotes: the unseen majority.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. U.S.A, 1998.

YOSHIKAWA, G.; ASKORA, A.; BLANC-MATHIEU, R.; KAWASAKI, T.; LI, Y., NAKANO, M.; YAMADA, T. **Xanthomonas citri jumbo phage XacN1 exhibits a wide host range and high complement of tRNA genes.** Scientific reports, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

YUZENKOVA, J.; NECHAEV, S.; BERLIM, J.; ROGULJA, D.; KUZNEDELOV, K.; INMAN, R.; SEVERINOV, K. **Genome of Xanthomonas oryzae bacteriophage Xp10: an odd T-odd phage.** Journal of molecular biology, v. 330, n. 4, p. 735-748, 2003.

