



INSTITUTO FEDERAL GOIANO CAMPUS MORRINHOS
BACHARELADO EM AGRONOMIA

BEATRIZ APARECIDA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UM BACTERIÓFAGO EM ISOLADO DO
FILOPLANO DE *Solanum americanum* COM POTENCIAL PARA O BIOCONTROLE
DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

Morrinhos, GO
2025

BEATRIZ APARECIDA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UM BACTERIÓFAGO EM ISOLADO DO
FILOPLANO DE *Solanum americanum* COM POTENCIAL PARA O BIOCONTROLE
DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de
Bacharelado em Agronomia do Instituto Federal Goiano
Campus Morrinhos, como parte da exigência para
obtenção do título de bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Nadson Carvalho Pontes

Coorientadora: Dr^a. Aline Brito Vaz

Morrinhos, GO
2025

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema Integrado de Bibliotecas do IF Goiano - SIBi**

S586c Silva, Beatriz Aparecida da
 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UM BACTERIÓFAGO
 EM ISOLADO DO FILOPLANO DE *Solanum americanum*
 COM POTENCIAL PARA O BIOCONTROLE DA MANCHA
 BACTERIANA DO TOMATEIRO / Beatriz Aparecida da Silva.
 Morrinhos 2026.

34f. il.

Orientador: Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Aline Brito Vaz.

Tcc (Bacharel) - Instituto Federal Goiano, curso de 0422021 -
[MO.GRAD] Bacharelado em Agronomia - Morrinhos (Campus
Morrinhos).

I. Título.

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, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem resarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- Tese (doutorado)
 Dissertação (mestrado)
 Monografia (especialização)
 TCC (graduação)
- Artigo científico
 Capítulo de livro
 Livro
 Trabalho apresentado em evento

Produto técnico e educacional - Tipo: _____

Nome completo do autor:

Beatriz Aparecida da Silva

Matrícula:

2021104220210020

Título do trabalho:

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UM BACTERIÓFAGO

ISOLADO DO FILOPLANO DE *Solanum americanum* COM POTENCIAL PARA O BIOCONTROLE

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? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim 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;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, 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;
- Que 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

28 /01 /2026

Local

Data

Documento assinado digitalmente

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Documento assinado digitalmente

Ciente e de acordo:

 **NADSON DE CARVALHO PONTES**

Data: 29/01/2026 14:19:39-0300

Verifique em <https://validar.itii.gov.br>



BEATRIZ APARECIDA DA SILVA

Data: 28/01/2026 22:52:34-0300

Verifique em <https://validar.itii.gov.br>

Ass



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

Ata nº 20/2025 - CCBA-MO/DE-MO/CMPMHOS/IFGOIANO

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

Ao(s) doze dia(s) do mês de dezembro de 2025, às 08 horas, reuniu-se a banca examinadora composta por: Prof. Nadson de Carvalho Pontes (orientador), Dra. Aline Brito Vaz (coorientadora), Dr. Erasmo Ribeiro da Paz Filho (membro) e Prof. Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque (membro), para examinar o Trabalho de Curso (TC) intitulado "**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UM BACTERIÓFAGO ISOLADO DO FILOPLANO DE *Solanum americanum* COM POTENCIAL PARA O BIOCONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO**" da estudante **BEATRIZ APARECIDA DA SILVA**, Matrícula nº 2021104220210020 do Curso de Bacharelado em Agronomia do IF Goiano – Campus Morrinhos. A palavra foi concedida à estudante para a apresentação oral do TC e houve arguição do candidato pelos membros da banca examinadora. Após tal etapa, a banca examinadora decidiu pela **APROVAÇÃO** do estudante com **NOTA 9,5**. 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)

Aline Brito Vaz

Coorientador(a)

(Assinado Eletronicamente)

Erasmo Ribeiro da Paz Filho

Membro

(Assinado Eletronicamente)

Leonardo Cunha de Albuquerque

Membro

Observação:

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

Documento assinado eletronicamente por:

- **Nadson de Carvalho Pontes, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 12/12/2025 10:01:48.
- **Erasmo Ribeiro da Paz Filho, 2024104341340001 - Discente**, em 12/12/2025 10:06:07.
- **Leonardo Cunha de Albuquerque, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 12/12/2025 10:06:31.
- **Aline Brito Vaz, 2024104341340002 - Discente**, em 12/12/2025 10:08:28.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 12/12/2025. 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: 774057

Código de Autenticação: 01a7dd5490



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Campus Morrinhos

Rodovia BR-153, Km 633, Zona Rural, SN, Zona Rural, MORRINHOS / GO, CEP 75650-000

(64) 3413-7900

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Centro de Excelência em Bioinsumos (CEBIO) - URB Morrinhos, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e à Fundação de Apoio à Pesquisa (FUNAPE) pelo apoio financeiro e institucional, que possibilitou o desenvolvimento de atividades experimentais como este trabalho. Meu reconhecimento também vai para toda a equipe do Laboratório de Fitopatologia (LAFIP) do IF Goiano - Campus Morrinhos, pelo suporte técnico e aprendizado compartilhado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nadson Pontes, e à coorientadora, Dra. Aline Vaz, agradeço pela orientação, paciência e incentivo contínuo, que foram fundamentais para a condução deste estudo. Aos Drs. Tenille Ribeiro, Erasmo Ribeiro e à Prof. Dra. Clarice Megger, registro meus agradecimentos pelas valiosas contribuições e compartilhamento de conhecimento.

Agradeço ainda às amigas e mestrandas Laryssa Marcia Caetano e Eliza Gonçalves, pelo companheirismo e apoio durante todo o percurso acadêmico. Aos amigos que fiz ao longo do curso, Luis Felipe Paulino, Eduarda Vaqueiro, Mellyssa Eduarda, Beatriz Marques, Vitória Emilly e Bruna Suellen, deixo meu reconhecimento pelo incentivo e momentos compartilhados.

Um agradecimento especial ao meu namorado, Guilherme Moreira, pelo apoio constante, e à minha família, em especial meus pais Luciana e Uzimar e meus avós, pelo amor, compreensão e incentivo que sempre me motivaram a seguir meus objetivos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero muito obrigada.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo bioprospectar, caracterizar e avaliar o potencial de um bacteriófago isolado de folhas de *Solanum americanum* para o biocontrole da mancha bacteriana do tomateiro. O isolamento do bacteriófago *Xanthomonas* phage SA1 foi realizado a partir de amostras coletadas no ensaio de tomateiro do campus Morrinhos do IF Goiano, utilizando técnicas de spot test e plaque assay, seguidas de ciclos sucessivos de purificação para obtenção de isolado clonal. A estabilidade do fago foi avaliada *in vitro* em diferentes condições de pH, temperatura e exposição à radiação UV, demonstrando viabilidade em pH 5 e 7,4, redução progressiva da viabilidade com o aumento do tempo de exposição à UV (254 nm) e maior preservação da atividade lítica a 25 °C e 30 °C, com completa perda a 65 °C. O espectro de hospedeiros revelou ação seletiva sobre isolados de *Xanthomonas euvisicatoria perforans*, *X. hortorum* pv. *gardneri* e *X. campestris* pv. *campestris*. Em ensaios em casa de vegetação, a aplicação do fago reduziu significativamente a severidade da doença, e observações adicionais indicaram maior sobrevivência das plantas tratadas com o fago sob estresse térmico severo, sugerindo possível indução de resistência basal. Os resultados demonstram que o bacteriófago SA1 apresenta potencial promissor como agente de biocontrole de *Xanthomonas* em tomateiro, oferecendo alternativas sustentáveis para manejo da doença e proteção das plantas em condições adversas.

Palavras-chave: bacteriófago, controle biológico, *Solanum americanum*

ABSTRACT

The present study aimed to bioprospect, characterize, and evaluate the potential of a bacteriophage isolated from *Solanum americanum* leaves for the biocontrol of bacterial spot in tomato. The bacteriophage Xanthomonas phage SA1 was isolated from samples collected in the tomato trial at the Morrinhos campus of IF Goiano, using spot test and plaque assay techniques, followed by successive purification cycles to obtain a clonal isolate. Phage stability was evaluated in vitro under different pH, temperature, and UV radiation conditions, showing viability at pH 5 and 7.4, progressive reduction in viability with increased exposure to UV (254 nm), and greater preservation of lytic activity at 25 °C and 30 °C, with complete loss at 65 °C. The host range revealed selective activity against *Xanthomonas euvisicatoria* pv. *perforans*. isolates, *X. hortorum* pv. *gardneri* and *X. campestris* pv. *campestris* Greenhouse trials demonstrated a significant reduction in disease severity following phage application, and additional observations indicated improved survival of phage-treated plants under severe heat stress, suggesting possible induction of basal resistance. These results indicate that phage SA1 has promising potential as a biocontrol agent against *Xanthomonas* in tomato, offering a sustainable alternative for disease management and plant protection under adverse conditions.

Keywords: bacteriophage; biological control; *Solanum americanum*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1- Registro da área de coleta no IF GOIANO – Campus Morrinhos, evidenciando a planta de Maria-pretinga (<i>Solanum americanum</i>) da qual foram obtidas as amostras foliares utilizadas para o isolamento do bacteriófago.	15
Figura 2- . Esquema ilustrativo do procedimento do spot test para avaliação da sensibilidade bacteriana a fagos.....	17
Figura 3- Esquema do processo de purificação do bacteriófago.	18
Figura 4- Esquema ilustrativo mostrando a planta hospedeira e a obtenção do bacteriófago.	22
Figura 5- Efeito da radiação UV sobre o bacteriófago após exposição por 0, 3, 6, 9 e 12 minutos.	23
Figura 6- Viabilidade do bacteriófago após exposição à radiação UV por 0, 3, 6, 9 e 12 minutos.	24
Figura 7- Resultado Plaque assay após exposição do bacteriófago as temperaturas: 30 °C, 40 °C e 65 °C ,1 h e 2 h.	25
Figura 8- Variação da porcentagem de unidades formadoras de placa (UFP) do bacteriófago em função do tempo de exposição a diferentes temperaturas (30°,40° e 65°).	26
Figura 9- Resultado do spot test para investigar a viabilidade do fago quando exposto a soluções com pH 3; 5; 7,4; 9 e 12.	27
Figura 10- Gama de hospedeiros do bacteriófago <i>Xanthomonas</i> phage SA1 pelo teste de plaque assay. ..	28
Figura 11- Efeito do bacteriófago <i>Xanthomonas</i> phage SA1 na severidade da doença em plantas inoculadas com a bactéria patogênica em função dos resultados do teste LSD a 5%.	30
Figura 12- Comparação do efeito do bacteriófago sobre plantas inoculadas com <i>Xanthomonas perforans</i> em relação ao controle.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análise de variância da viabilidade do bacteriófago após exposição a diferentes tempos de radiação UV (0, 3, 6, 9 e 12 minutos), com significância estatística determinada pelo teste F.....	23
Tabela 2- Análise de variância da viabilidade do bacteriófago após exposição a diferentes tempos exposição a diferentes temperaturas (30°, 40° e 65°), com significância estatística determinada pelo teste F.....	25
Tabela 3- Resultado do teste de gama de hospedeiro do bacteriófago <i>Xanthomonas</i> phage SA1: A tabela apresenta a sensibilidade de diferentes isolados de <i>Xanthomonas</i> spp. à infecção pelo fago.....	28
Tabela 4- Análise de variância da severidade da doença em teste de casa de vegetação após aplicação do bacteriófago em diferentes tratamentos.....	29

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2.	REVISÃO DE LITERATURA	11
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5	CONCLUSÃO.....	31
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

1. INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais produzidas e consumidas mundialmente, com grande importância para a segurança alimentar e a economia agrícola. No Brasil, destaca-se entre as principais culturas olerícolas, ocupando cerca de 54,5 mil hectares e alcançando produção anual próxima de 4 milhões de toneladas (FAO, 2024; Embrapa, 2022). Estados como Goiás figuram entre os maiores produtores, contribuindo significativamente para o agronegócio nacional (Almeida; Pedroso; Ferreira, 2023). Contudo, fatores fitossanitários impactam fortemente a produtividade.

Entre as doenças bacterianas, a mancha bacteriana do tomateiro é considerada uma das mais destrutivas, podendo causar perdas superiores a 50% (Embrapa, 2010). O complexo patogênico envolve quatro espécies: *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* e *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Jones *et al.*, 2004). Essas bactérias disseminam-se por respingos de água e práticas culturais, sobrevivendo em restos vegetais, sementes e hospedeiros alternativos (Potnis *et al.*, 2021). Destaca-se que *X. euvesicatoria* pv. *perforans* vem apresentando rápida evolução por recombinação genética, originando linhagens mais agressivas e adaptadas a ambientes tropicais (Huang *et al.*, 2024).

O uso de antibióticos agrícolas, como estreptomicina e oxitetraciclina, tornou-se limitado devido à ampla disseminação de genes de resistência, incluindo *strA–strB* e *aadA*, detectados desde a década de 1970 e persistentes em áreas produtoras (Marco; Stall, 1983; Sundin; Wang, 2018). Esse cenário evidencia a urgência por alternativas sustentáveis.

Nesse contexto, os bacteriófagos surgem como agentes promissores para o biocontrole de fitopatógenos. Esses vírus, amplamente distribuídos no ambiente, apresentam alta especificidade ao hospedeiro e capacidade de lise bacteriana direta, o que reduz impactos sobre a microbiota não alvo (Weinbauer, 2004; Dion *et al.*, 2020; Clokie *et al.*, 2011; Hyman; Abedon, 2010). Estudos envolvendo *Xanthomonas* têm revelado fagos estáveis e altamente líticos, reforçando seu potencial para o manejo da mancha bacteriana.

A persistência dos fagos no filoplano, entretanto, sofre influência de fatores ambientais, como radiação UV, temperatura e umidade. A radiação UV-B, em particular, reduz significativamente a infectividade viral (Iriarte *et al.*, 2007). Temperaturas elevadas podem comprometer proteínas de cápside (Jończyk *et al.*, 2011), enquanto a rápida secagem da superfície foliar diminui a viabilidade. Mesmo assim, fagos presentes em agroecossistemas frequentemente

exibem maior tolerância, possivelmente devido à proteção conferida por microambientes foliares, como tricomas e biofilmes (Balogh *et al.*, 2010).

Dante disso, a bioprospecção em plantas que coexistem com lavouras de tomate representa estratégia eficiente para a seleção de fagos naturalmente adaptados às condições ambientais enfrentadas pelo patógeno. *Solanum americanum*, espécie comum em áreas de cultivo, pode atuar como reservatório de fagos associados ao agroecossistema. Assim, este estudo teve como objetivo isolar e caracterizar um bacteriófago obtido de *S. americanum* e avaliar seu potencial para o biocontrole de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, agente causal da mancha bacteriana do tomateiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais cultivadas e consumidas no mundo, desempenhando papel fundamental tanto no abastecimento alimentar quanto na geração de renda. No Brasil, sua relevância econômica é expressiva. De acordo com a Embrapa (2022), o país figura entre os principais produtores globais, atendendo simultaneamente aos mercados de consumo *in natura* e à indústria de processamento.

Segundo dados recentes da FAO (2024), o Brasil encontra-se entre os dez maiores produtores de tomate do mundo, com uma área cultivada estimada em 54,5 mil hectares e produção anual próxima de 3,8 milhões de megagramas, o que corresponde a cerca de 2% da produção mundial. Essa representatividade reflete não apenas a importância socioeconômica da cultura, mas também o impacto direto que fatores fitossanitários exercem sobre a produtividade nacional.

Dados mais recentes do IBGE indicam que, em 2023, a produção de tomate no Brasil alcançou cerca de 4,17 milhões de toneladas, impulsionada principalmente por estados líderes na cultura, como Goiás — que se destaca por concentrar grande parte da produção industrial e movimentar de forma expressiva o agronegócio do tomateiro. Esses valores reforçam a relevância socioeconômica da cultura no país, contribuindo de maneira significativa para a geração de renda, empregos e para o fortalecimento da cadeia produtiva agrícola (Almeida; Pedroso; Ferreira, 2023).

A mancha bacteriana do tomateiro é uma das enfermidades mais destrutivas da cultura, podendo reduzir significativamente o rendimento das lavouras. Essas bactérias pertencem a um grupo amplo de patógenos Gram-negativos capazes de infectar mais de 400 espécies de plantas, sendo especialmente relevantes em solanáceas como tomate e pimentão (Timilsina *et al.*, 2020; Osdaghi *et al.*, 2021).

Entre as espécies associadas à doença, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* tem recebido atenção crescente devido à sua rápida evolução por recombinação genética, o que tem originado linhagens emergentes com novos repertórios de efetores do sistema de secreção tipo III. Essas mudanças têm contribuído para o aumento da agressividade e da adaptação desse patógeno a ambientes tropicais, ampliando sua capacidade de causar epidemias em regiões produtoras (Huang *et al.*, 2024).

A infecção inicia-se pela penetração das bactérias através de estômatos, hidatódios ou ferimentos causados por chuva, vento, abrasão mecânica e insetos, vias amplamente descritas para espécies de *Xanthomonas* (Timilsina *et al.*, 2020).

Uma vez no interior da folha, as células bacterianas colonizam o apoplasto, multiplicam-se rapidamente e secretam efetores via sistema de secreção do tipo III, fundamentais para suprimir respostas de defesa da planta e promover a instalação da doença (Huang *et al.*, 2024). A progressão

resulta em lesões necróticas que reduzem a área fotossintética ativa, intensificam a clorose e prejudicam a organização dos tecidos, afetando diretamente o desempenho fisiológico e a produtividade da planta (Jones *et al.*, 2004; Timilsina *et al.*, 2020).

A dispersão da doença ocorre principalmente por respingos de chuva, irrigação por aspersão e manejo cultural, que favorecem o transporte das bactérias para tecidos sadios. Sementes contaminadas, plantas voluntárias, ervas daninhas hospedeiras e restos culturais funcionam como importantes reservatórios do patógeno, garantindo sua sobrevivência entre safras (Potnis *et al.*, 2021). Em condições de alta umidade e temperaturas elevadas, a disseminação é acelerada e a severidade tende a aumentar, cenário frequentemente observado em áreas produtoras de tomate no Brasil e associado à ocorrência de surtos epidêmicos (Timilsina *et al.*, 2020).

O uso de antibióticos agrícolas, como estreptomicina e oxitetraciclina, tem se tornado cada vez menos eficaz no controle da mancha bacteriana do tomateiro devido à disseminação de populações resistentes de *Xanthomonas*. Estudos já documentavam resistência à estreptomicina em isolados associados à cultura desde a década de 1970, e essa tendência persiste em regiões produtoras no mundo todo (Marco & Stall, 1983; Sundin & Wang, 2018).

A presença de genes strA–strB e aadA, amplamente associados à resistência, reduz drasticamente a eficiência do manejo químico e limita o uso sustentável desses compostos no campo (Sundin & Wang, 2018). Assim, o controle baseado em antibióticos torna-se cada vez menos viável, reforçando a necessidade de alternativas biológicas mais seguras e eficazes.

Nesse contexto, os bacteriófagos representam uma alternativa promissora e sustentável para o manejo de doenças bacterianas. A resistência bacteriana aos fagos desenvolve-se mais lentamente do que aos antibióticos, devido à pressão seletiva distinta e à alta especificidade desses vírus (Parasion *et al.*, 2014). Fagos são autorreplicantes enquanto houver células hospedeiras e permanecem ativos mesmo em condições ambientais adversas (Schmelcher & Loessner, 2014).

Os bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam exclusivamente bactérias e constituem o grupo de vírus mais abundante da biosfera, com estimativas de cerca de 10^{31} partículas virais distribuídas em praticamente todos os ecossistemas conhecidos (Dion *et al.*, 2020). Eles exercem forte influência sobre a dinâmica microbiana ao modular populações bacterianas, promover transferência horizontal de genes e atuar como importantes reguladores ecológicos, inclusive em ambientes agrícolas (Weinbauer, 2004).

Sua estrutura típica inclui um capsídeo protéico que protege o genoma — geralmente DNA fita dupla — e, nos fagos caudados, uma cauda contrátil ou não contrátil que medeia a adsorção e a injeção do material genético na célula hospedeira (Clokie *et al.* 2011).

Do ponto de vista funcional, os fagos líticos são os mais relevantes para o biocontrole, pois

infectam a bactéria, subvertem sua maquinaria metabólica para a produção de novos vírions e promovem a lise celular, liberando descendentes capazes de repetir o ciclo (Clokie *et al.*, 2011). Esse processo permite que o fago se amplifique diretamente no foco da infecção, uma característica que não ocorre com antibióticos.

A especificidade dos fagos, determinada principalmente por receptores bacterianos e proteínas de cauda, permite direcionar o controle apenas ao patógeno-alvo sem afetar a microbiota benéfica, característica especialmente desejável em sistemas agrícolas sustentáveis (Hyman & Abedon, 2010).

Debray, Conover e Koskella (2025) demonstraram que os bacteriófagos podem aumentar a resistência das plantas de forma indireta, mesmo sem interagir fisicamente com seus tecidos. Os autores mostraram que, ao infectar e lisar bactérias do microbioma associado ao tomateiro, os fagos liberam fragmentos bacterianos — como como lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanos — que são reconhecidos pela planta como sinais de perigo. Esses componentes ativam respostas de imunidade basal (PTI), deixando a planta em estado de alerta e mais preparada para enfrentar patógenos. Assim, ainda que os fagos atuem diretamente apenas sobre bactérias, sua ação pode fortalecer as defesas vegetais por meio da modulação do microbioma.

A sobrevivência de bacteriófagos no filoplano é fortemente influenciada por fatores ambientais, especialmente radiação ultravioleta (UV), temperatura e luminosidade. A radiação UV-B é considerada o principal fator limitante, sendo capaz de causar danos diretos ao DNA viral e reduzir drasticamente a infectividade em poucas horas de exposição, o que representa um desafio para a aplicação de fagos em campo (Iriarte *et al.*, 2007). A temperatura também exerce papel importante: enquanto muitos fagos mantêm estabilidade moderada entre 20–30 °C, valores mais elevados, comuns em regiões tropicais, aceleram a desnaturação de proteínas da cápside e diminuem a viabilidade viral (Jończyk *et al.*, 2011).

Além disso, a secagem rápida da superfície foliar e a exposição contínua à luz solar podem reduzir a persistência dos fagos, embora alguns isolados apresentem elevada adaptação ambiental, possivelmente devido à produção de partículas mais estáveis ou à proteção proporcionada por microambientes foliares, como tricomas e biofilmes (Balogh *et al.*, 2010). Esses fatores reforçam a necessidade de selecionar fagos naturalmente adaptados às condições do campo, como aqueles obtidos diretamente de plantas ou solos onde *Xanthomonas* ocorre, aumentando a chance de sucesso no biocontrole.

Considerando que a estabilidade dos fagos no ambiente é fortemente afetada por fatores como radiação UV, temperatura e luminosidade — o que pode limitar sua persistência na superfície foliar (Iriarte *et al.*, 2007; Jończyk *et al.*, 2011) — torna-se essencial identificar isolados

naturalmente adaptados às condições do campo. Nesse contexto, a bioprospecção em plantas que convivem com cultivos comerciais representa uma estratégia promissora, pois esses microambientes frequentemente abrigam fagos já expostos às mesmas intempéries que afetam o patógeno.

3. OBJETIVO GERAL:

Bioprospectar, caracterizar e avaliar o potencial de um bacteriófago isolado de folhas de *Solanum americanum* “maria-pretinha” para o biocontrole da mancha bacteriana do tomateiro, por meio de análises *in vitro* e *in vivo*.

3.1 Objetivos específicos:

- (i)** Realizar a bioprospecção e o isolamento do bacteriófago a partir de folhas de *Solanum americanum*.
- (ii)** Avaliar a estabilidade do bacteriófago sob diferentes condições de radiação UV, em distintos tempos de exposição, por meio de testes *in vitro*.
- (iii)** Determinar a estabilidade térmica do bacteriófago, submetendo-o a diferentes temperaturas e tempos de incubação.
- (iv)** Avaliar o efeito de diferentes valores de pH sobre a infectividade e viabilidade do bacteriófago.
- (v)** Realizar o teste de gama de hospedeiros *in vitro*, confrontando o fago para determinar o seu espectro de infecção.
- (vi)** Avaliar a eficiência do bacteriófago no controle da doença em condições de casa de vegetação, verificando sua capacidade de reduzir a incidência e/ou severidade da infecção na planta hospedeira.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta

A coleta das folhas de maria-pretinha (*Solanum americanum*) foi realizada em uma área experimental de tomate pertencente ao IF Goiano – Campus Morrinhos. As amostras, constituídas exclusivamente por folhas assintomáticas, foram obtidas no período da manhã, sob condições de céu aberto e temperatura média de 25 °C, em setembro de 2024. O propósito dessa etapa foi realizar a bioprospecção de bacteriófagos com potencial para infectar espécies de *Xanthomonas*.

A escolha de *S. americanum* foi devido à sua presença frequente como planta espontânea em lavouras de tomate e ao seu potencial papel como hospedeira alternativa de microrganismos que circulam no ambiente. Dessa forma, a coleta foi direcionada para plantas situadas próximas a tomateiros que exibiam sintomas de mancha bacteriana, aumentando a probabilidade de encontrar fagos naturalmente associados ao patossistema. Após a amostragem, as folhas foram acondicionadas em recipientes estéreis, mantidas sob refrigeração e transportadas imediatamente ao laboratório, a fim de preservar a integridade das partículas virais até o processamento (Figura 1).

Figura 1- Registro da área de coleta no IF GOIANO – Campus Morrinhos, evidenciando a planta de Maria-pretinha (*Solanum americanum*) da qual foram obtidas as amostras foliares utilizadas para o isolamento do bacteriófago.



Fonte: própria autora (2024)

4.2 Preparação das amostras e enriquecimento

Os fragmentos foliares coletados foram submetidos a um processo de desinfestação superficial em três etapas: imersão em álcool 70% por 30 segundos, seguida de tratamento com hipoclorito de sódio a 1% também por 30 segundos, e posteriormente três lavagens consecutivas em água destilada estéril. Esse procedimento teve como finalidade remover microrganismos e resíduos presentes na superfície, garantindo que a detecção de bacteriófagos fosse atribuída ao material interno ou aderido de forma mais estável aos tecidos.

Após a desinfestação, os fragmentos foram transferidos para 10 mL de uma suspensão bacteriana de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, proveniente da coleção do LAFIP, previamente ajustada para OD₆₀₀ = 0,2. As amostras de folhas foram incubadas junto com bactéria sob agitação (150rpm) por 2 horas a 28 °C, protegidas da luz, a fim de favorecer o contato entre possíveis partículas fagais presentes nos tecidos e sua bactéria hospedeira.

Concluída a etapa de enriquecimento, a suspensão foi distribuída em microtubos estéreis, aos quais se adicionou clorofórmio a 4% (v/v) para remover as células bacterianas remanescentes. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos em centrífuga refrigerada (Sigma, modelo 3-16PK; RCF 21.913 × g; capacidade 4 × 400 mL).

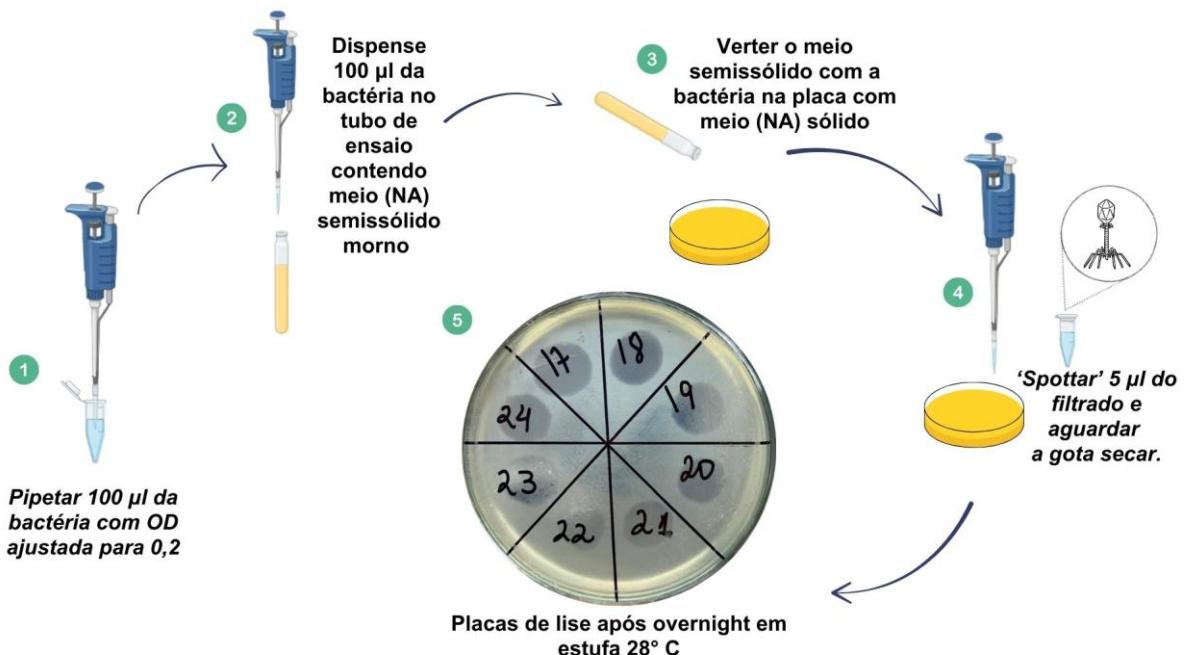
O sobrenadante obtido foi filtrado por membrana de 0,22 µm (Jet Biofilm), assegurando a remoção de células intactas e partículas maiores, preservando apenas os possíveis bacteriófagos. O filtrado final foi armazenado sob refrigeração a 4 °C até sua utilização nos ensaios subsequentes, mantendo a viabilidade do material viral.

4.3 Isolamento e Purificação de Bacteriófagos

Primeiramente foi realizado *spot test*, essa técnica foi feita porque permitiu identificar se no filtrado havia fago com capacidade de lisar a bactéria hospedeira. Para isso, a bactéria foi cultivada em caldo nutritivo *overnight* (12–18 h) a 28 °C, numa rotação de 150rpm. Após esse período a densidade celular foi ajustada para OD₆₀₀ = 0,2.

Antes mesmo de iniciar o teste as placas de Petri receberam uma camada fina de ágar nutritivo (1,5%), e após secar com auxílio de uma caneta foram feitos quadrantes no verso da placa de Petri com códigos para identificar os filtrados correspondentes, e ao controle (hipoclorito 1%). Feito isso, aplicou-se uma sobrecamada de ágar semissólido (0,4%) contendo 100 µL da suspensão bacteriana, seguida da deposição de *spots* de 5 µL dos filtrados. Após a secagem dos *spots*, as placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas, como mostrado na figura 2.

Figura 2- . Esquema ilustrativo do procedimento do *spot test* para avaliação da sensibilidade bacteriana a fagos.



Fonte: elaborado pela própria autora (2024)

No dia seguinte foi feita avaliação se no *spot* apareceu lise ou não. Como obteve-se a presença do fago lítico foi feita a etapa do *plaque assay*. Para o isolamento do bacteriófago foi feito o teste *plaque assay* para isso foi feita a diluição seriada em tampão SM do filtrado até 10^{-10} . A partir dessas diluições foi feito o teste, adicionou-se no microtubo 100 µL do filtrado e 250 µL da bactéria diluída (OD 0,2), logo após foram incubados por 2h a 28°C.

Após o período de incubação foi feito o *plaque assay*, que consistiu em uma fina camada de ágar nutritivo na placa de Petri, adicionou os 350 µL (fago diluído + bactéria) no meio semissólido 0,4% na placa de Petri e esperou secar vedou com papel filme e acondicionou-se as placas invertidas para não condensar na incubadora a 28°C por 24h. Após esse período foi feita a avaliação verificando as lises realizando a contagem para verificar a titulação viral.

Para a purificação o fragmento de ágar correspondente à placa de lise foi transferido para 100 mL de suspensão bacteriana ($OD_{600} = 0,2$) e mantido sob agitação a 150 rpm por 2 horas, permitindo a liberação dos fagos das placas. Em seguida, foram adicionados clorofórmio a 4% (v/v) de 1ml do filtrado e o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa de 0,22 µm, removendo células bacterianas e partículas maiores. Para garantir a obtenção de partículas virais isoladas, o filtrado foi submetido a diluições seriadas decimais em tampão SM, variando de 10^{-1} a 10^{-10} . As diluições finais permitiram que as placas de lise fossem visualizadas isoladamente em placas de ágar. O

Plaque assay foi então realizado para determinar o título viral (UFP/mL), pela fórmula:

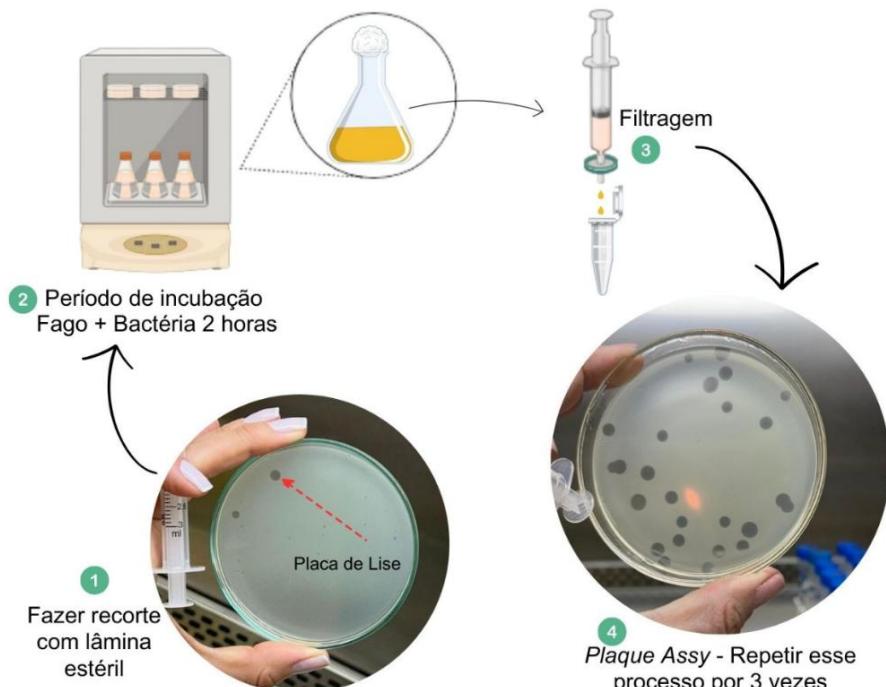
$$\text{Título viral (UFP/mL)} = N \times F / V$$

Onde:

- **N** = número de placas/unidades formadoras de placa (UFPs) na diluição escolhida
- **F** = fator da diluição (ex.: 10^3 , 10^6 , etc.)
- **V** = volume inoculado na placa (em mL)

Para assegurar a pureza do fago, o processo de plaqueamento foi repetido três vezes, utilizando sempre unidades formadoras de placa isoladas. Dessa forma, garantiu-se que o fago selecionado representasse um único morfotípico (Figura 3).

Figura 3- Esquema do processo de purificação do bacteriófago.



Fonte: elaborado pela própria autora (2024)

O isolado obtido foi nomeado *Xanthomonas phage* SA1 – “SA” = *Solanum americanum*, 1 = primeiro isolado. (Acrônimo XPSA1 X = *Xanthomonas*, P = *perforans*, SA = *Solanum americanum*, 1 = primeiro isolado, Fago 38 da coleção de bacteriófagos do LAFIP).

4.4 Avaliação do efeito do pH na viabilidade dos bacteriófagos

O efeito do pH sobre a viabilidade dos bacteriófagos foi avaliado segundo metodologia adaptada de Albino *et al.* (2014), com ajustes para garantir maior precisão experimental. O procedimento foi realizado em três etapas principais: preparação das soluções tampão, exposição dos fagos aos diferentes pH e avaliação da viabilidade por meio de *spot test*.

Foram preparados 30 mL de tampão SM contendo: 5,8 g de NaCl; 2 g de MgSO₄·7H₂O; 50 mL de Tris-HCl 1 mol/L. O tampão SM foi ajustado para os valores de pH 3, 5, 7,4, 9 e 12 mediante adição controlada de HCl 0,1 mol/L ou NaOH 2 mol/L. Os valores finais foram conferidos em pHmetro de bancada.

As soluções ajustadas foram distribuídas em microtubos estéreis. Para testar a estabilidade dos fagos em cada condição, foi realizada uma série de diluições decimais (10^{-1} a 10^{-10}), utilizando: 100 µL da suspensão de fagos, com título previamente determinado; 900 µL do tampão SM, ajustado ao pH correspondente. A mistura foi homogeneizada em vórtex para garantir contato uniforme entre as partículas virais e o tampão em cada condição. Essa etapa permitiu avaliar não apenas a sobrevivência dos fagos, mas também possíveis efeitos do pH na infectividade e na capacidade de formar placas de lise.

A viabilidade dos fagos após exposição a cada pH foi determinada por meio do método de *spot test*. Para isso: Em placas contendo a bactéria hospedeira em camada dupla (double agar layer), após foram aplicados 6 µL de cada diluição (10^{-1} a 10^{-10}). Permitindo que cada pH fosse testado em ampla faixa de concentrações.

As placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas, em triplicata, garantindo reprodutibilidade. Após a incubação, a formação de zonas de lise foi registrada, permitindo inferir a viabilidade dos fagos em cada condição de pH. Esse conjunto de procedimentos possibilitou identificar faixas de pH que preservam a infectividade dos fagos e aquelas que comprometem sua estabilidade.

4.5 Teste de UV

A estabilidade dos bacteriófagos frente à radiação ultravioleta foi avaliada por meio de protocolo adaptado de Iriarte *et al.* (2007), Czajkowski *et al.* (2014) e Liu *et al.* (2024). A irradiação foi realizada utilizando a lâmpada UV da câmara de fluxo laminar (254 nm). As suspensões do fago as quais foram previamente diluídas até 10^{-7} e distribuídas em microtubos contendo 100 µL por amostra, mantidos com a tampa aberta durante a exposição.

Os microtubos foram submetidos à radiação pelos tempos de 0, 3, 6, 9 e 12 minutos, em triplicata. Após cada intervalo, as amostras foram imediatamente utilizadas no ensaio de placas.

Para isso, 100 µL da suspensão irradiada foram adicionados a 250 µL da cultura da bactéria hospedeira e deixados em contato por 2 horas para adsorção antes da semeadura em ágar semissólido.

As placas foram incubadas a 28 °C e monitoradas quanto à formação de unidades formadoras de placa (UFP). A comparação entre os títulos resultantes permitiu quantificar a sobrevivência dos fagos após cada período de exposição à radiação UV.

4.6 Avaliação da estabilidade térmica dos bacteriófagos

A estabilidade dos bacteriófagos em diferentes temperaturas foi avaliada por meio de ensaio controlado, utilizando suspensões previamente diluídas e submetidas a tempos distintos de exposição térmica. O procedimento foi estruturado em duas etapas principais: (1) exposição dos fagos às temperaturas definidas e (2) determinação da viabilidade por *plaque assay*

Suspensões de fagos com diluição final de 10^{-7} foram distribuídas em microtubos estéreis, sendo alocados: 100 µL de suspensão de fago por microtubo; três microtubos por temperatura, representando as triplicatas experimentais. As temperaturas selecionadas para o ensaio foram: 30 °C (condição moderada, próxima à ideal para muitos fagos), 40 °C (condição de estresse térmico moderado), e 65 °C (condição de estresse térmico severo). Os microtubos foram incubados em estufas previamente estabilizadas nas temperaturas correspondentes, pelos tempos de: 1 hora e 2 horas.

Após cada tempo de exposição, os microtubos foram imediatamente retirados das estufas e utilizados no ensaio de *plaque assay* para determinação da infectividade residual dos fagos. O procedimento consistiu em: Adicionar 100 µL do fago exposto a 250 µL da cultura bacteriana hospedeira em fase logarítmica na concentração 0,2; e foi incubado a mistura por 2 horas, permitindo a adsorção viral; e adicionar meio semissólido e verter sobre placas de ágar previamente preparadas.

As placas foram incubadas a 28 °C, e a formação de unidades formadoras de placa (UFP) foi observada para quantificar a viabilidade dos fagos após cada combinação de temperatura e tempo de exposição. Esse protocolo possibilitou avaliar a tolerância térmica do fago e identificar temperaturas críticas capazes de comprometer sua integridade e capacidade infectiva.

4.7 Teste gama de hospedeiro

Para a determinação da gama de hospedeiro, empregou-se o método de *plaque assay*, no qual cada isolado bacteriano foi testado quanto à susceptibilidade ao fago. O procedimento consistiu em adicionar 100 µL da suspensão fágica a 250 µL da cultura bacteriana hospedeira em

fase logarítmica ($OD_{600} \approx 0,2$), incubando-se a mistura por 2 horas para favorecer a adsorção viral. Em seguida, adicionou-se meio semissólido e a suspensão foi vertida sobre placas de ágar previamente preparadas.

Após incubação a 28 °C, observou-se a formação de unidades formadoras de placa (UFP), utilizada como indicador da capacidade infectiva do fago frente a cada bactéria avaliada. Foram testados isolados de *Xanthomonas spp.* (códigos LF-Xantho2, LF-Xantho1, IFGO-52, IFGO-59 e IFGO-60) e duas espécies fitopatogênicas específicas: *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* (anteriormente conhecida como *Xanthomonas gardneri*), conforme atualização taxonômica proposta por Jibrin *et al.* (2024) (código IFGO-50); *Xanthomonas euvisicatoria perforans* (código LF-Xantho1; IFGO-52; IFGO-60 e IFGO-49). Também foi incluído um isolado de prospectado do repolho a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (LF-Xantho2). Esse ensaio permitiu identificar quais hospedeiros eram efetivamente suscetíveis ao fago e delinear seu espectro de atuação biológica.

4.8 Teste em casa de vegetação

A avaliação da aplicação de fagos em plantas de tomate foi conduzida em blocos, utilizando plantas de tomate *Heinz 1801* com 35 dias de idade, avaliou-se a aplicação de bacteriófagos em condições controladas de casa de vegetação. O delineamento experimental foi composto por vinte e quatro plantas distribuídas em quatro tratamentos, cada um contendo oito plantas: controle negativo com aplicação apenas de água; plantas inoculadas exclusivamente com *Xanthomonas perforans*; e dois tratamentos nos quais as plantas receberam a mistura da bactéria com o bacteriófago isolado (*Xanthomonas phage SA1*).

Para a preparação dos inóculos, a suspensão bacteriana de *X. perforans* foi inicialmente cultivada e posteriormente diluída até atingir uma densidade celular correspondente a $OD_{600}= 0,2$ garantindo padronização da concentração antes da aplicação. Em seguida, foram preparados 50 mL da suspensão final utilizando a fórmula $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$. O *Xanthomonas phage SA1* foi previamente diluído até 10^{-7} . Foi feita a aplicação dos tratamentos, que consistiram da aplicação do fago na concentração final de 10^{-10} UFP/mL, e água (controle). A aplicação de ambos os agentes foi realizada por pulverização foliar até o ponto de escorrimento.

No planejamento experimental o fago foi aplicado primeiro; após um dia aplicou-se a suspensão bacteriana e duas horas depois, realizou-se uma segunda aplicação do fago, garantindo interação direta e contínua entre fago e bactéria na superfície foliar. Foi feita câmara úmida nas plantas por 24 horas.

As plantas foram mantidas em condições controladas na casa de vegetação. Aos 14 dias

após a inoculação, as plantas foram avaliadas quanto à severidade da doença, que foi quantificada por meio de análise visual utilizando a escala diagramática descrita por Mello *et al.* (1997). Essa escala apresenta imagens com diferentes porcentagens de área foliar lesionada, permitindo comparar visualmente as folhas do tomateiro e estimar de forma prática e padronizada o nível de severidade.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos foi aplicado o teste LSD à 5% de probabilidade.

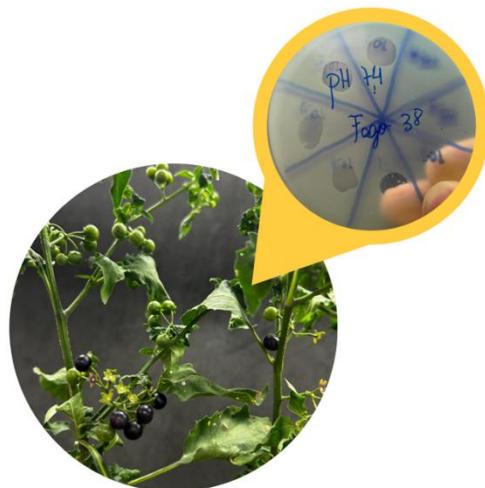
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bioprospecção e isolamento do bacteriófago

O bacteriófago *Xanthomonas* phage SA1 foi isolado a partir de folhas de *Solanum americanum* coletadas no ensaio de tomateiro realizado no campus Morrinhos do IF Goiano. A presença de atividade lítica foi confirmada por meio de *spot test* e placas duplo-camada, nas quais foram observadas placas claras indicativas de lise completa dos isolados de *Xanthomonas* utilizados para enriquecimento.

Após três ciclos sucessivos de purificação, foi obtido um isolamento clonal estável, designado SA1, com morfologia característica de placas claras, adequado para estudos subsequentes de estabilidade e gama de hospedeiros. O fago foi titulado e estocado em tampão SM a 4 °C, permanecendo viável para os ensaios *in vitro* e em casa de vegetação descritos nos itens seguintes.

Figura 4- Esquema ilustrativo mostrando a planta hospedeira e a obtenção do bacteriófago.

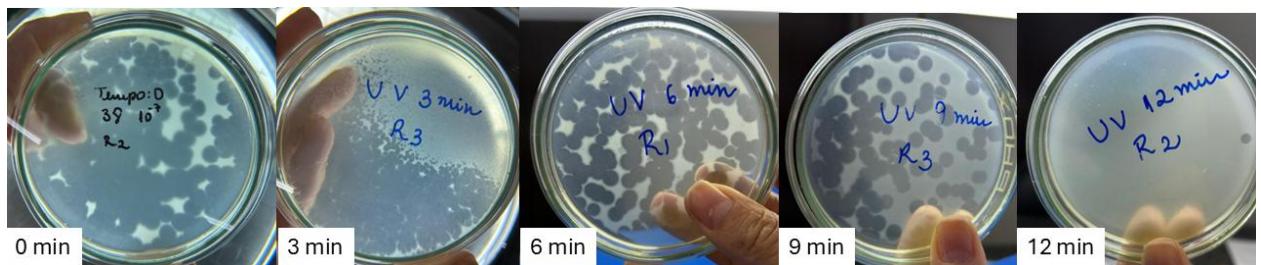


Fonte: elaborado pela própria autora (2025)

5.2 Avaliação da estabilidade sob radiação UV

Quanto ao teste de UV, os resultados mostraram efeito altamente significativo do fator *Minutos* ($p = 0,0063$), indicando que os diferentes tempos de exposição explicam a maior parte da variação observada. Revelando que o tempo 0 min apresentou média significativamente superior às demais (grupo “a3”), os tempos intermediários (3, 6 e 9 min) formaram grupos intermediários (“a2 / a3”), e 12 min foi estatisticamente o menor (grupo “a1”), confirmando a perda progressiva e acumulativa de viabilidade viral com o aumento do tempo de exposição.

Figura 5- Efeito da radiação UV sobre o bacteriófago após exposição por 0, 3, 6, 9 e 12 minutos.



Fonte: elaborado pela própria autora (2025)

Tabela 1- Análise de variância da viabilidade do bacteriófago após exposição a diferentes tempos de radiação UV (0, 3, 6, 9 e 12 minutos), com significância estatística determinada pelo teste F.

Causas de Variação	GL	QM
Tratamento	4	33655.166**
Resíduo	10	4894.466
Coeficiente de Variação (%)		43,36

GL - Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

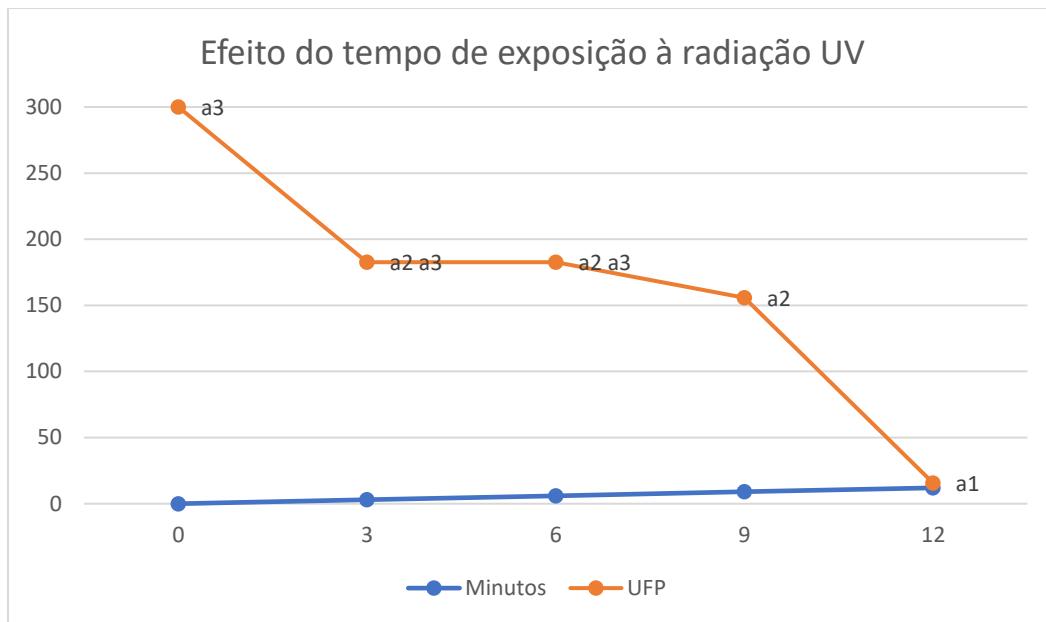
NS - Não significativo pelo teste de F

** - Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F

Esses resultados estatísticos, apresentados na Tabela 1, são visualmente corroborados pelo gráfico (figura 6), que mostra a clara tendência de queda das médias de UFP com o aumento do tempo de UV , onde as barras representam a média das unidades formadoras de placas (UFP) com desvio padrão, as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos, determinadas pelo teste LSD a 5% de probabilidade.

Figura 6- Viabilidade do bacteriófago após exposição à radiação UV por 0, 3, 6, 9 e 12 minutos.



Fonte: elaborado pela própria autora (2025)

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os achados de Liu *et al.* (2024) sobre a sensibilidade de bacteriófagos à radiação UV. Assim como o fago LDT325, cuja viabilidade diminuiu drasticamente com o aumento do tempo de exposição (perdendo quase toda a atividade após 21 minutos), o fago avaliado neste experimento apresentou redução progressiva da viabilidade com o aumento do tempo de exposição à UV, sendo o tempo de 12 minutos suficiente para quase eliminar a atividade viral.

Embora os tempos máximos e as concentrações iniciais de fagos sejam diferentes entre os dois estudos, o padrão de perda de viabilidade é consistente, indicando que a radiação UV atua como agente inativante de forma gradual e dependente do tempo de exposição. Esses resultados reforçam a literatura existente, confirmando que a viabilidade de bacteriófagos é significativamente afetada pela radiação UV e destacam a necessidade de considerar esse fator em aplicações biológicas.

Todavia, segundo dados do “Solar and Ultraviolet Radiation” do NCBI (2020), a radiação solar que atinge a superfície da Terra é composta quase exclusivamente por UV-A ($\approx 95\%$) e UV-B ($\approx 5\%$), sendo que a UV-C — utilizada em nosso experimento — é praticamente inexistente no ambiente externo.

Isso implica que os resultados obtidos com UV-C representam uma condição severa e não natural, na prática de campo, a viabilidade do fago sob luz solar dependerá da ação mais moderada de UV-A/UV-B, podendo levar a uma inativação muito mais lenta ou parcial.

5.3 Avaliação da Temperatura

Para o experimento de temperatura, o fator “horas” não apresentou efeito significativo ($p > 0,05$), indicando que o período de exposição às temperaturas testadas não influenciou de maneira decisiva a viabilidade do fago dentro do intervalo testado (0, 1 e 2 h). Em contrapartida, o fator “temperatura” foi significativo ($p < 0,05$), demonstrando que a sobrevivência dos fagos depende diretamente da intensidade térmica, demonstrado na tabela 2.

Tabela 2- Análise de variância da viabilidade do bacteriófago após exposição a diferentes tempos exposição a diferentes temperaturas (30°, 40° e 65°), com significância estatística determinada pelo teste F.

Causas de Variação	GL	QM
Horas	2	1325,444 ^{NS}
Temperatura	3	2919,185*
Resíduo	3	287.703
Coeficiente de Variação (%)		32,14

GL - Graus de liberdade

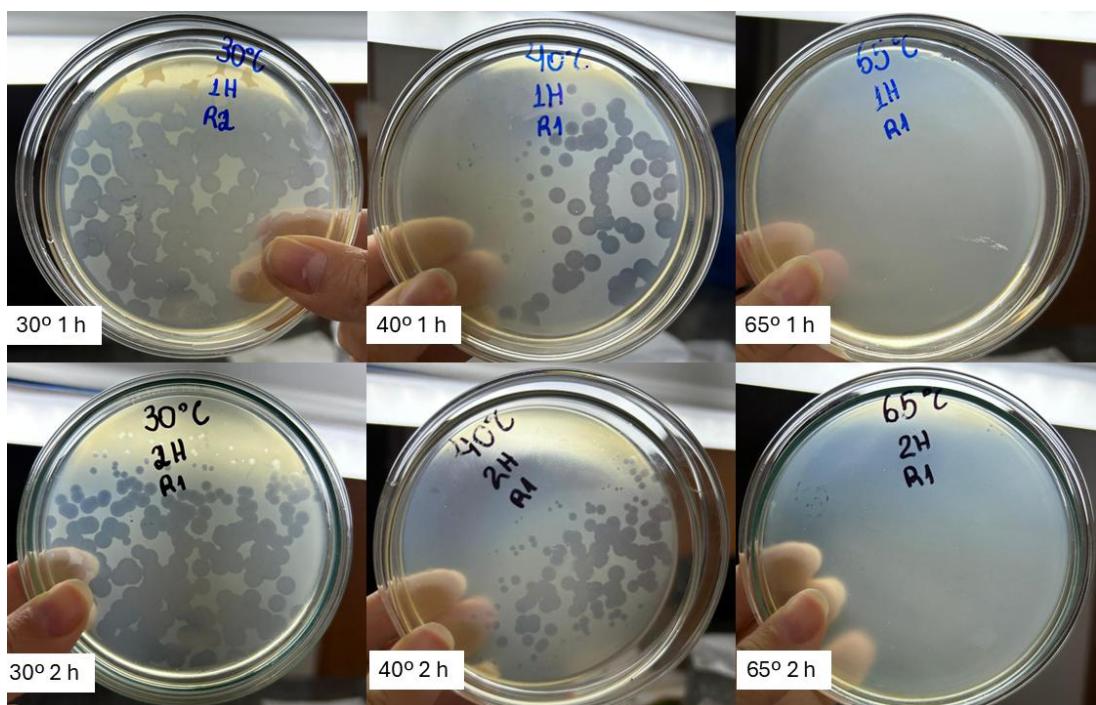
QM – Quadrado médio

NS - Não significativo pelo teste de F

** - Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F

Figura 7- Resultado *plaque assay* após exposição do bacteriófago as temperaturas: 30 °C, 40 °C e 65 °C ,1 h e 2 h.

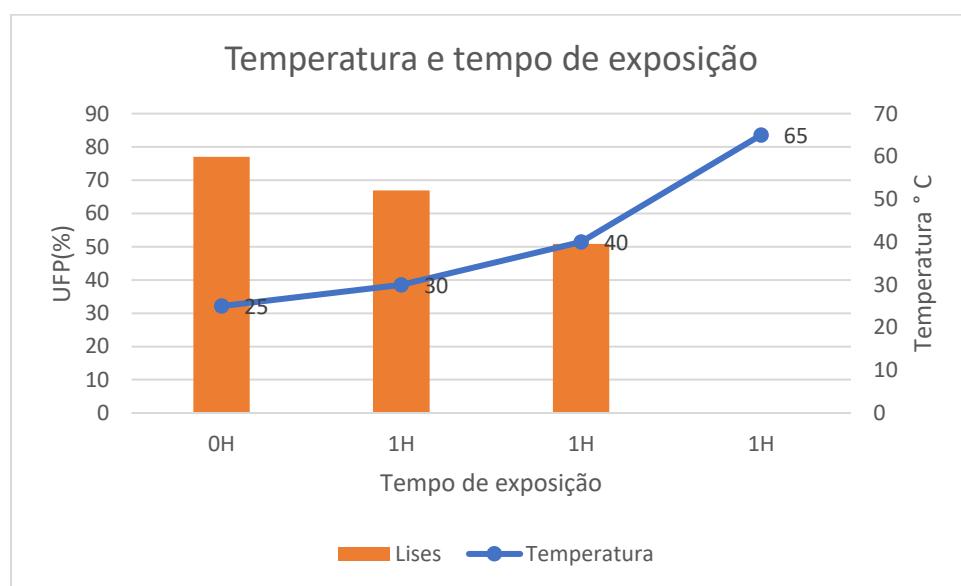


Fonte: elaborado pela própria autora (2025)

As temperaturas 25°C e 30°C proporcionaram maior preservação das unidades de lise, valores compatíveis com a temperatura ótima para muitos fagos de ambiente vegetal. Já a temperatura de 40°C representou uma condição intermediária, com redução moderada da atividade, enquanto 65°C resultou em completa perda da viabilidade, evidenciado na figura 7.

Alves (2021) demonstrou que o bacteriófago destinado ao controle de *Pseudomonas cichorii* quando submetido a diferentes condições térmicas manteve quase 100 % da atividade lítica após 60 minutos de incubação em temperaturas entre 5 e 45 °C, evidenciando alta estabilidade em condições amenas a moderadas. Quando submetido a temperaturas acima de 60 °C, houve redução drástica da viabilidade. De forma semelhante, o fago avaliado neste trabalho apresentou maior preservação da viabilidade em 25 e 30 °C, redução intermediária em 40 °C e completa perda de atividade em 65 °C.

Figura 8- Variação da porcentagem de unidades formadoras de placa (UFP) do bacteriófago em função do tempo de exposição a diferentes temperaturas (30°, 40° e 65°).



Fonte: elaborado pela própria autora (2025)

Além disso, o fator tempo (0 a 2 h) não influenciou significativamente a viabilidade conforme mostrado na figura 8, evidenciando que a intensidade térmica é o principal determinante da sobrevivência do fago.

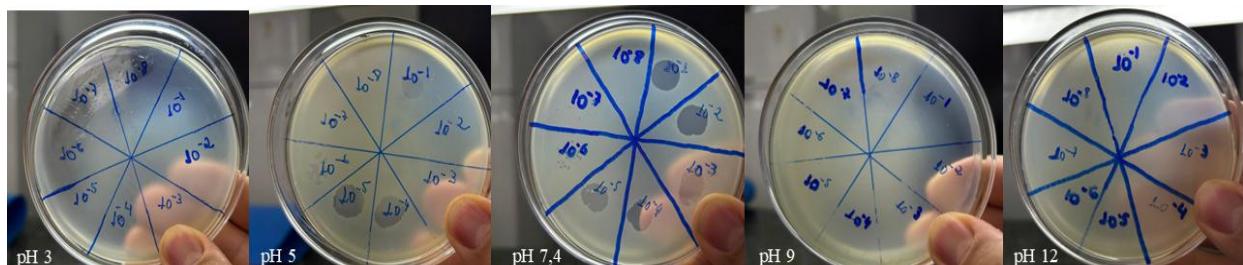
Esses resultados reforçam que a termossensibilidade é uma característica comum de fagos de plantas e deve ser considerada em estratégias de armazenamento e aplicação em campo, indicando que o calor desnatura proteínas estruturais essenciais do capsídeo e compromete a capacidade de infectar a bactéria hospedeira.

5.4 Avaliação de pH

O teste de pH realizado por *spot test* demonstrou que o *Xanthomonas* phage SA1 manteve atividade lítica em ambas as condições avaliadas (pH 5 e pH 7,4), com lise observada em todas as réplicas. Esses resultados indicam que o fago é capaz de permanecer infectivo em condições levemente ácidas e próximas ao pH fisiológico da planta (Figura 9).

Os resultados estão de acordo com os achados de Alves (2021), na qual um bacteriófago isolado para *Pseudomonas cichorii* apresentou estabilidade máxima em pH ideal 7,5 e permaneceu estável na faixa de pH de 5,0 a 8,5, enquanto houve redução significativa no título em pH extremos de 3,0 e 11,0. A comparação evidencia que fagos fitopatogênicos tendem a tolerar faixas moderadas de pH, reforçando o potencial do *Xanthomonas* phage SA1 como agente de controle biológico. Ressalta-se, no entanto, que o ensaio foi qualitativo. Como o objetivo foi observar a presença ou ausência de lise em cada condição, e não quantificar o título viral, não foi realizada análise estatística.

Figura 9- Resultado do *spot test* para investigar a viabilidade do fago quando exposto a soluções com pH 3; 5; 7,4; 9 e 12.

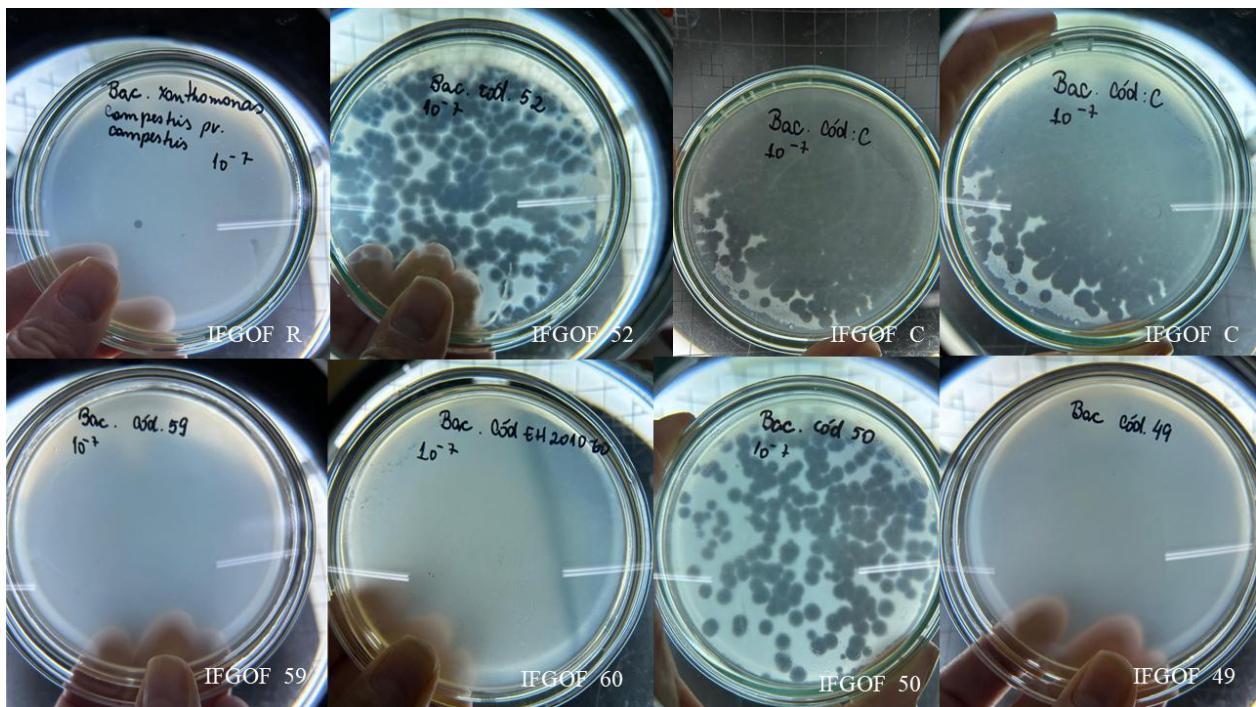


Fonte: elaborado pela própria autora (2025)

5.5 Avaliação experimento gama de hospedeiro

Os resultados do teste de gama de hospedeiro demonstraram que o bacteriófago *Xanthomonas* phage SA1 apresentou capacidade infectiva seletiva entre os isolados avaliados. Entre as amostras classificadas como *Xanthomonas spp.*, os isolados LF-Xantho2, IFGO-52 e LF-Xantho1 foram sensíveis ao fago, evidenciando formação de placas claras e indicando eficiente infecção e lise bacteriana. Em contraste, os isolados IFGO-59 não apresentou sensibilidade, sugerindo ausência de adsorção eficaz ou resistência intrínseca ao fago. Porém para o isolado IFGO-60 foi observado um halo transparente restrito a uma região da placa, indicando possível interação incompleta ou infecção parcial pelo fago. Quanto às espécies fitopatogênicas específicas, observou-se sensibilidade em *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* (isolado IFGO-50), enquanto o isolado IFGO-49 não foi infectado. De modo geral, o fago SA1 exibiu um espectro de ação moderadamente amplo dentro do gênero, como observado na figura 10.

Figura 10- Gama de hospedeiros do bacteriófago Xanthomonas phage SA1 pelo teste de *plaque assay*.



Fonte: elaborado pela própria autora (2025)

A análise estatística não foi aplicada ao teste de gama de hospedeiro porque os resultados foram qualitativos, expressos apenas como presença (+) ou ausência (-) de infecção fágica. O objetivo do teste é verificar se o fago é capaz ou não de lisar cada isolado bacteriano, caracterizando sua especificidade e espectro de hospedeiros, expressos na tabela 3.

Tabela 3- Resultado do teste de gama de hospedeiro do bacteriófago Xanthomonas phage SA1: A tabela apresenta a sensibilidade de diferentes isolados de *Xanthomonas spp.* à infecção pelo fago.

Código	Bactéria	Xanthomonas phage SA1
LF-Xantho2	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> .	+
IFGO-52	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	+
LF-Xantho1	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	+
IFGO-59	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	-
IFGO-60	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	+
IFGO-50	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>gardneri</i>	+
IFGO-49	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	-

“+” presença de placas (sensível) e “-” ausência de placas (resistente). Ensaio qualitativo sem análise estatística.

5.6 Avaliação experimento em casa de vegetação – Severidade da doença

Os resultados demonstraram um efeito altamente significativo dos tratamentos sobre o grau de severidade da doença ($p < 0,01$), demonstrando que as aplicações influenciaram de forma expressiva o desenvolvimento da mancha bacteriana nas plantas (Tabela 4).

Tabela 4- Análise de variância da severidade da doença em teste de casa de vegetação após aplicação do bacteriófago em diferentes tratamentos.

Causas de Variação	GL	QM
Tratamento	2	17.388,635**
Resíduo	21	68,641
Coeficiente de Variação (%)		23,77

GL - Graus de liberdade

QM – Quadrado médio

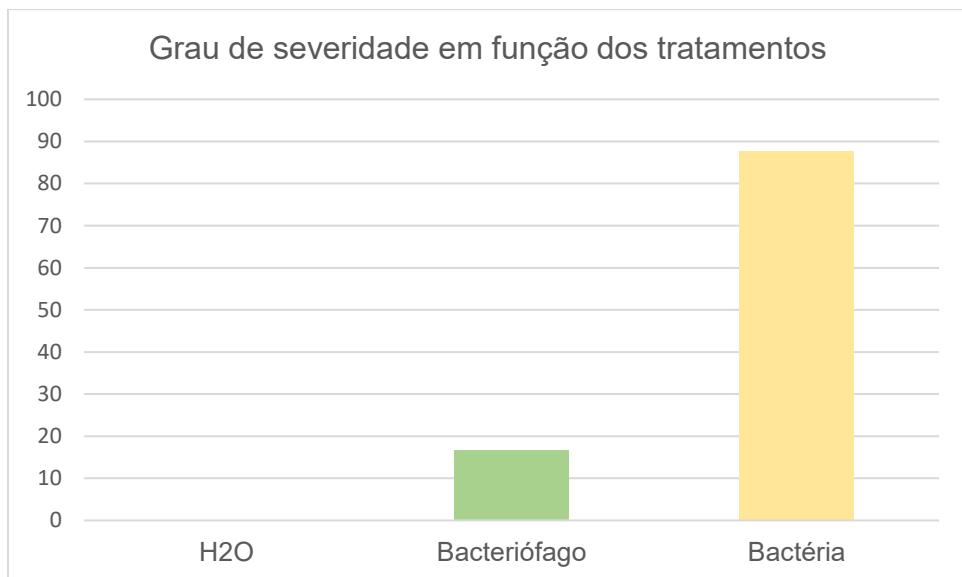
NS - Não significativo pelo teste F

** - $p < 0,01$ altamente significativo ao nível de 1%

* - $p < 0,05$ significativo ao nível de 5%

O teste revelou que o controle H₂O apresentou média zero, confirmando a sanidade das plantas não inoculadas, enquanto o controle com bactéria apresentou a maior severidade (87,81). O tratamento com bactéria + bacteriófago (*Xanthomonas* phage SA1) reduziu significativamente a severidade para 16,75, mostrando que o bacteriófago atuou efetivamente como agente de biocontrole. As diferenças entre os tratamentos foram estatisticamente comprovadas e podem ser visualizadas na figura 11. Estes resultados evidenciam que o uso do bacteriófago reduziu significativamente a bactéria patogênica.

Figura 11- Efeito do bacteriófago *Xanthomonas* phage SA1 na severidade da doença em plantas inoculadas com a bactéria patogênica em função dos resultados do teste LSD a 5%.



Fonte: elaborado pela própria autora (2025)

De maneira consistente, Nguyen Trung Vu & Chang-Sik Oh (2020) destacam que bacteriófagos são agentes biológicos específicos, capazes de reduzir a severidade de doenças bacterianas em diversas culturas, sem causar efeitos adversos às plantas hospedeiras.

No presente experimento, observou-se que as plantas inoculadas apenas com a bactéria apresentaram maior severidade da doença, enquanto a aplicação do bacteriófago resultou em redução significativa da severidade em comparação ao tratamento com bactéria isolada ($p < 0,01$, teste LSD). Esse resultado evidencia o efeito positivo do bacteriófago no controle do patógeno em condições de casa de vegetação.

Figura 12- Comparaçao do efeito do bacteriófago sobre plantas inoculadas com *Xanthomonas perforans* em relação ao controle.



Fonte: elaborado pela própria autora (2025)

Além dos resultados obtidos nos experimentos conduzidos sob condições controladas, observou-se um achado adicional relevante durante testes preliminares. Em uma etapa anterior, plantas de tomateiro da mesma idade e inoculadas da mesma forma foram inadvertidamente expostas a temperaturas excessivamente elevadas na casa de vegetação, o que resultou em severo estresse térmico. Nessas condições extremas, todas as plantas inoculadas apenas com a bactéria patogênica morreram, enquanto parte das plantas tratadas com o bacteriófago sobreviveu, mesmo após o estresse térmico intenso.

Esse comportamento sugere que o fago pode ter desempenhado um papel adicional além do controle direto da bactéria, possivelmente modulando mecanismos fisiológicos da planta ou contribuindo indiretamente para uma resposta de resistência basal, fenômeno já relatado em estudos recentes. Debray, Conover e Koskella em 2025, demonstrou-se que alguns bacteriófagos aplicados a plantas podem induzir respostas de defesa basal, tornando-as mais tolerantes tanto ao patógeno quanto a estresses abióticos moderados. O padrão observado neste estudo, portanto, corrobora a literatura emergente e aponta para a possibilidade de efeitos indiretos benéficos do fago sobre a planta hospedeira.

Embora esses resultados preliminares não tenham sido obtidos sob condições experimentais controladas, eles representam um sinal promissor e reforçam a necessidade de estudos futuros voltados à compreensão dos possíveis efeitos fisiológicos do fago sobre a planta, especialmente sob situações de estresse térmico.

6. CONCLUSÃO

O fago SA1, isolado de *Solanum americanum*, mostrou sensibilidade à radiação UV-C, estabilidade entre 25–30 °C, atividade em pH 5 e 7,4 e especificidade para três espécies de *Xanthomonas*. Em casa de vegetação, reduziu a severidade da doença, confirmando seu potencial como agente sustentável de biocontrole.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINO, L. A. A.; ROSTAGNO, M. H.; HÚNGARO, H. M.; MENDONÇA, R. C. S. Isolation, characterization, and application of bacteriophages for *Salmonella* spp. biocontrol in pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2014.
- ALMEIDA, G. V. B. de; PEDROSO, M. T. M.; FERREIRA, Z. R. Tomate no Brasil: dados recentes de produção, comercialização e consumo. *Campo & Negócios Online*, 2023.
- ALVES, M. K. Isolamento e caracterização genômica de bacteriófago para biocontrole de *Pseudomonas cichorii*. 2021. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2021.
- BALOGH, B. *et al.* Phage therapy for plant disease control. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 11, p. 48–57, 2010.
- CLOKIE, M. R. J. *et al.* Phages in nature. *Bacteriophage*, v. 1, p. 31–45, 2011.
- CLOKIE, M. R. J.; KROGSGAARD-NIELSEN, A.; ABEDON, S. T. Phage structure and assembly. *Advances in Applied Microbiology*, v. 75, p. 1–32, 2011.
- CORREA, A. M. S. *et al.* Revisiting the rules of life for viruses of microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 8, p. 501–513, 2021.
- CZAJKOWSKI, R.; OZYMKO, Z.; LOJKOWSKA, E. Isolation and characterization of novel soilborne lytic bacteriophages infecting *Dickeya* spp. biovar 3 ('*D. solani*'). *Plant Pathology*, v. 63, p. 758–772, 2014.
- DEBRAY, R.; CONOVER, A.; KOSKELLA, B. Phages indirectly maintain tomato plant pathogen defense through regulation of the commensal microbiome. *ISME Communications*, v. 5, n. 1, p. ycaf065, 2025.
- DION, M. B.; OECHSLIN, F.; MOINEAU, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, n. 3, p. 125–138, 2020.
- EMBRAPA. Tomate. Portal Embrapa, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/tomate>. Acesso em: nov. 2025.
- EMBRAPA. QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A. Mancha bacteriana: uma atualização para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. Circular Técnica, Brasília, DF: Embrapa, n. 84, 2010.
- FAOSTAT. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Dados - Conjunto de dados - Culturas - Produção Nacional, 2024. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: nov. 2025.
- HATFULL, G. F. Bacteriophage discovery and genomics. In: *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*, p. 219–230, 2021.
- HUMAN, P.; ABEDON, S. T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in*

Applied Microbiology, v. 70, p. 217–248, 2010.

IBGE. Produção agrícola municipal – Tomate. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2023.

IRIARTE, F. B. *et al.* Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Phytopathology*, v. 97, p. 1344–1350, 2007.

JIBRIN, Mustafa O.; SHARMA, Anuj; MAVIAN, Carla N.; TIMILSINA, Sujan; KAUR, Amandeep; IRUEGAS-BOCARDO, Fernanda; POTNIS, Neha; MINSAVAGE, Gerald V.; COUTINHO, Teresa A.; CRESWELL, Tom C.; EGEL, Daniel S.; FRANCIS, David M.; KEBEDE, Misrak; MILLER, Sally A.; MONTELONGO, María J.; NIKOLAEVA, Ekaterina; PIANZZOLA, María J.; PRUVOST, Olivier; QUEZADO-DUVAL, Alice M.; RUHL, Gail E.; SHUTT, Vou M. *et al.* Phylodynamic insights into global emergence and diversification of the tomato pathogen *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2024. DOI: 10.1094/MPMI-04-24-0035-R.

JONCZYK, E.; KŁAK, M.; MIĘDZYBRODZKI, R.; GÓRSKI, A. The influence of external factors on bacteriophages — review. *Folia Microbiologica*, v. 56, p. 191–200, 2011.

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*, v. 27, n. 6, p. 755–762, 2004.

KERING, K.; KIBII, B.; WEI, H. Biocontrol of phytobacteria with bacteriophage cocktails. *Pest Management Science*, v. 75, n. 7, p. 1775–1781, 2019.

LIU, L.; WANG, B.; HUANG, A.; ZHANG, H.; LI, Y.; WANG, L. Biological characteristics of the bacteriophage LDT325 and its potential application against the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, 2024.
doi:10.3389/fmicb.2024.1370332.

MELLO, S. C.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Escala diagramática para avaliação da mancha bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, n. 3, p. 447–448, 1999.

NAKAYINGA, R. *et al.* Xanthomonas bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications. *BMC Microbiology*, v. 21, p. 265, 2021.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI. *Solar and Ultraviolet Radiation*. In: Health Effects of Exposure to Ultraviolet Radiation. Bethesda: National Institutes of Health, 2020. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304366/>. Acesso em: dez. 2025.

NGUYEN, T. V.; OH, C. S. Bacteriophage usage for bacterial disease management and diagnosis in plants. *The Plant Pathology Journal*, 2020. DOI: 10.5423/PPJ.RW.04.2020.0074.

OSDAGHI, E.; JONES, J. B.; SHARMA, A.; GOSS, E. M.; ABRAHAMIAN, P.; NEWBERRY, E. A. Um certificado para mancha bacteriana em tomate e pimentão. *Molecular Plant Pathology*, v. 22, p. 1500–1519, 2021. doi:10.1111/mpp.13125.

PARASION, S.; KWIATEK, M.; GRYKO, R.; MIZAK, L.; MALM, A. Bacteriófagos como uma estratégia alternativa para combater o desenvolvimento de biofilme. *Polish Journal of*

Microbiology, v. 63, p. 137–145, 2014.

POTNIS, N. Harnessing eco-evolutionary dynamics of xanthomonads on tomato and pepper to tackle new problems of an old disease. *Annual Review of Phytopathology*, v. 59, p. 289–310, 2021. doi:10.1146/annurev-phyto-020620-101612.

SALMOND, G. P.; FINERAN, P. C. Um século do fago: passado, presente e futuro. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, p. 777–786, 2015.

SCHMELCHER, M.; LOESSNER, M. J. Aplicação de bacteriófagos para detecção de patógenos transmitidos por alimentos. *Bacteriophage*, v. 4, e28137, 2014.

SULAKVELIDZE, A.; KUTTER, E. 14 Bacteriophage Therapy in Humans. In: *Bacteriophages: biology and applications*, p. 381, 2004.

SUTTLE, C. A. Viruses in the sea. *Nature*, v. 437, p. 356–361, 2005.

TIMILSINA, S.; POTNIS, N.; NEWBERRY, E. A.; LIYANAPATHIRANAGE, P.; IRUEGAS-BOCARDO, F.; WHITE, F. F. Diversidade, virulência e interações planta-patógeno de *Xanthomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, p. 415–427, 2020. doi:10.1038/s41579-020-0361-8.

VILLICAÑA, R. A. et al. Isolation and characterization of two novel jumbo bacteriophages infecting *Xanthomonas vesicatoria*. *Antibiotics*, v. 13, n. 7, p. 651, 2024.

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 28, p. 127–181, 2004.

WILHELM, S. W.; SUTTLE, C. A. Viruses and nutrient cycles in the sea: viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *Bioscience*, v. 49, n. 10, p. 781–788, 1999.