



**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO  
PAULO**

**AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS**

**INSTITUTO BIOLÓGICO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR  
E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS PARA CONTROLE  
DE BACTÉRIAS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *RALSTONIA SOLANACEARUM*  
EM TOMATEIRO**

**KEILA CRISTINA DOS SANTOS**

Dissertação apresentada para a obtenção do título  
de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e  
Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e  
Sanidade no Agroecossistema

São Paulo

2024

**Keila Cristina dos Santos**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS PARA CONTROLE  
DE BACTÉRIAS DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *RALSTONIA SOLANACEARUM*  
EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada para a obtenção do título  
de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e  
Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e  
Sanidade no Agroecossistema.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Harakava

Co-orientador: Prof. Dr. José Luiz Caldas Wolff

São Paulo

2024

Eu **Keila Cristina dos Santos**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: 

Data: 29/07/2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Santos, Keila Cristina dos.

Isolamento e caracterização de bacteriófagos para controle de bactérias do Complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. / Keila Cristina dos Santos. - São Paulo, 2024.

54 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2024D.KS07

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Ricardo Harakava

Coorientador: José Luiz Caldas Wolff

Versão do título para o inglês: Isolation and characterization of bacteriophages for controlling *Ralstonia solanacearum* Species Complex bacteria in tomato plants.

. 1. Fagos 2. Sequenciamento 3. Biocontrole 4. Murcha bacteriana em tomateiro I. Santos, Keila Cristina dos II. Harakava, Ricardo III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2024/07

---

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas e instituições que tornaram possível a realização deste trabalho:

Aos meus familiares, irmã, vô, mãe e pai, pelo contínuo apoio e acolhimento ao longo desta jornada. Em particular, sou imensamente grata ao Raryel por ter estado ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu orientador, Ricardo Harakava, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela paciência durante todo o processo.

Aos amigos que fiz durante o desenvolvimento deste trabalho. Especialmente à Doutora Patrícia Haddad, pelos valiosos conselhos e pelo apoio nos momentos difíceis e ao Doutor Pedro Luis Ramos-González, pela companhia e todo conhecimento compartilhado.

Ao Doutor José Luiz Caldas Wolff pela colaboração.

À Doutora Suzete pela disponibilidade de bactérias da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), abrigada no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, CAPSA, Instituto Biológico, Campinas, SP.

À Doutora Samantha Zanotta pela disponibilidade de amostras contaminadas abrigadas no Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário (LDF), Instituto Biológico, São Paulo, SP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado.

Agradeço sinceramente a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Suas colaborações foram fundamentais para o sucesso desta pesquisa.

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

## RESUMO

SANTOS, Keila. Isolamento e caracterização de bacteriófagos para controle de bactérias do Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. 2024. Defesa (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2024.

O cultivo do tomateiro é de importância econômica em nível mundial, mas enfrenta desafios por ser uma das plantas mais atacadas pela murcha bacteriana, cujos agentes etiológicos podem ser *Ralstonia solanacearum* ou *R. pseudosolanacearum*. A murcha causa perdas significativas, resultando em redução de rendimentos e impactos na segurança alimentar. Como não há eficácia no controle utilizando métodos tradicionais, a pesquisa se volta para alternativas, como os bacteriófagos. Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam especificamente bactérias, oferecendo uma promissora solução para reduzir a população de *R. solanacearum* ou *R. pseudosolanacearum*. O presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bacteriófagos a partir de amostras de solo e batata contaminadas pelas bactérias oriundas de cultivos comerciais visando o controle da murcha bacteriana em tomateiro (*Solanum lycopersicum* (L.) variedade Santa Clara. A presença de bacteriófagos foi detectada em dez amostras de um total de treze avaliadas. Experimentos em cultivo “indoor” foram realizados para avaliar o potencial destes bacteriófagos como agentes de controle biológico de *R. pseudosolanacearum*. Duas das cinco preparações de bacteriófagos avaliadas demonstraram eficácia no controle de murcha bacteriana com redução de incidência da doença de 80-100%. O sequenciamento de um desses fagos resultou na identificação como pertencente à família *Inoviridae*, possivelmente de um novo gênero.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fagos. Sequenciamento. Biocontrole. Murcha bacteriana em tomateiro.

## ABSTRACT

SANTOS, Keila. Isolation and characterization of bacteriophages for controlling *Ralstonia solanacearum* Species Complex bacteria in tomato plants. 2024. Defense (Master's in Plant and Animal Health, Food and Environmental Safety in the Agribusiness) – Biological Institute, São Paulo Agency for Agribusiness Technology, Secretary of Agriculture and Supply of the State of São Paulo, São Paulo, 2024.

Tomato cultivation is of global economic importance but faces challenges due to being one of the plants most affected by bacterial wilt, caused by pathogens such as *Ralstonia solanacearum* or *R. pseudosolanacearum*. Wilt causes significant losses, leading to reduced yields and impacts on food safety. Since traditional control methods are ineffective, research is focusing on alternatives like bacteriophages. Bacteriophages or phages are viruses that specifically infect bacteria, offering a promising solution to reduce populations of *R. solanacearum* or *R. pseudosolanacearum*. This study aimed to isolate and characterize bacteriophages from soil and potato samples contaminated with bacteria from commercial crops, targeting the control of bacterial wilt in tomato (*Solanum lycopersicum* (L.) variety Santa Clara). The presence of bacteriophages was detected in ten out of thirteen samples evaluated. "Indoor" cultivation experiments were conducted to assess the potential of these bacteriophages as biological control agents for *R. pseudosolanacearum*. Two of the five phage preparations tested showed effectiveness in controlling bacterial wilt, with a disease incidence reduction of 80-100%. Sequencing of one of these phages identified it as belonging to the Inoviridae family, potentially representing a new genus.

**KEYWORDS:** Phages. Sequencing. Biocontrol. Bacterial wilt in tomatoes.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estratégia para verificação da presença do profago RPSI-IB01 incorporado no genoma bacteriano. PCRs com os primers BE (borda esquerda) e BD (borda direita) devem gerar produtos em caso de incorporação ao genoma. ....31
- Figura 2:** Isolamento de bacteriófagos a partir da amostra F1 (A) e F2 (M) de batata contaminada. Formação de placa de lise a partir de inóculo de 20 µL de amostra pré-enriquecida, pelo método de dupla camada de ágar na presença de *R. pseudosolanacearum* IBSBF-3228.....32
- Figura 3:** Purificação do fago da amostra F4 por meio de diluição seriada. Placas de lise formadas na diluição de 10<sup>-5</sup>, pelo método de dupla camada de ágar na presença de *R. pseudosolanacearum* IBSBF-3228.....33
- Figura 4:** Visualização de placas de lise em placas de Petri através do método de sobrecamada. É possível visualizar placas de lise nas diluições 1 x 10<sup>-7</sup> (-7), 1 x 10<sup>-8</sup> (-8) e 1 x 10<sup>-9</sup> (-9). 34
- Figura 5:** Avaliação de concentração da linhagem de *Ralstonia pseudosolanacearum* IBSBF 3228 em plântulas de tomate. Planta testemunha não-inoculada (T) e planta com sintomas de murcha, inoculada com a bactéria na concentração de 1 x 10<sup>9</sup> UFC/mL (RS9)..... 35
- Figura 6:** Verificação da severidade da doença em mudas de tomate após inoculação de *Ralstonia pseudosolanacearum* IBSBF-3228 em duas concentrações. RS8 – 1 x 10<sup>8</sup> UFC/mL, RS9 – 1 x 10<sup>9</sup> UFC/mL, T- testemunha (água esterilizada). ....36
- Figura 7:** Redução da severidade de sintomas causados por *R. pseudosolanacearum* IBSBF 3228 pelo tratamento com a preparação de bacteriófago F2 (vaso à direita). ....37
- Figura 8:** Confirmação da presença do fago RPSI-IB01 incorporado nos genomas das linhagens IBSBF 2140 e 2477 de *Ralstonia solanacearum*, por PCR.....42
- Figura 9:** Mapa do bacteriófago RPSI-IB01 com suas ORFs putativas.....44
- Figura 10:** Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining com sequências da proteína pI de bacteriófagos da família Inoviridae. ....46



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Origem dos isolados bacterianos utilizados .....	23
<b>Tabela 2:</b> Isolados de bacteriófagos e suas origens .....	32
<b>Tabela 3:</b> Avaliação dos títulos das amostras de bacteriófagos que infectam <i>R. pseudosolanacearum</i> IBSBF-3228.....	34
<b>Tabela 4:</b> Severidade de sintomas em mudas de tomate inoculadas com duas concentrações de <i>R. pseudosolanacearum</i> IBSBF 3228.....	36
<b>Tabela 5:</b> Efeito de preparações de bacteriófagos na redução da severidade de sintomas em plantas de tomate inoculadas com <i>R. pseudosolanacearum</i> . As médias foram comparadas por teste de Duncan.....	37
<b>Tabela 6:</b> Concentrações de DNA extraído a partir das amostras de bacteriófagos utilizando cloreto de zinco.....	39
<b>Tabela 7:</b> <i>Contigs</i> e <i>scaffolds</i> obtidos pela montagem das sequências com o programa <i>Flye</i> . .....	40
<b>Tabela 8:</b> Possíveis ORFs encontradas no genoma do fago RPSI-IB01 .....	43

## **LISTA DE SIGLAS**

RPM - Rotação Por Minuto

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFP – Unidade Formadora de Placas

DO – Densidade Óptica

PVDF - Fluoreto de Polivinilideno

PEG – Polietilenoglicol

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celsius

μ - micro

λ - lambda

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVO .....	15
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Cultura do tomate.....	15
3.2 Murcha bacteriana.....	17
3.3 Bacteriófagos - contexto histórico e suas características .....	19
3.4 Aplicação de bacteriófagos e perspectivas para o futuro.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Armazenamento de <i>Ralstonia solanacearum</i> e <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> .....	23
4.2 Isolamento de bacteriófagos .....	24
4.4 Purificação de bacteriófagos .....	25
4.5 Armazenamento de bacteriófagos .....	25
4.6 Protocolo de titulação .....	26
4.7 Avaliação de virulência da linhagem de <i>R. pseudosolanacearum</i> IBSBF-3228 .....	26
4.10 Avaliação da eficiência de bacteriófagos na prevenção de murcha bacteriana – protocolo 3.	27
4.11 Precipitação de bacteriófagos .....	27
4.12 Extração de DNA de bacteriófagos precipitados com cloreto de zinco .....	28
4.13 Extração de DNA de bacteriófagos eluídos diretamente de placas de lise.....	28
4.14 Extração de DNA de bacteriófagos precipitados com PEG .....	29
4.15 Sequenciamento de bacteriófagos .....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Determinação dos filotipos de <i>R. solanacearum</i> e <i>R. pseudosolanacearum</i> .....	31
5.2 Isolamento de bacteriófagos de <i>R. pseudosolanacearum</i> .....	31
5.3 Títulos de bacteriófagos .....	33
5.4 Determinação da concentração de <i>R. pseudosolanacearum</i> efetiva para os experimentos de inoculação.....	35
5.6 Bacteriófagos na prevenção de murcha bacteriana .....	36
5.7 Precipitação, extração de DNA e sequenciamento dos bacteriófagos .....	38
6. CONCLUSÕES .....	46
REFERÊNCIAS .....	48

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por melhores estratégias nas práticas agrícolas intensificou-se diante da necessidade de diminuir perdas significativas na produção e garantir a segurança alimentar global. O cultivo de tomate é de importância mundial devido ao seu sabor e benefícios nutricionais, entretanto, a produção enfrenta desafios devido à alta incidência de doenças. Uma das doenças mais prejudiciais é a murcha bacteriana, causada pelas bactérias *Ralstonia solanacearum* ou *R. pseudosolanacearum*.

A murcha bacteriana representa uma ameaça significativa na produção, especialmente em regiões de climas tropicais e subtropicais. A doença reduz os rendimentos, aumenta os custos e afeta a segurança alimentar global. Não há métodos eficazes para seu controle. Entre as estratégias emergentes para mitigar a murcha bacteriana, a utilização de bacteriófagos (fagos), vírus parasitas intracelulares que infectam bactérias de forma específica, tem sido considerada como promissora (ÁLVAREZ; BIOSCA, 2017; BUTTIMER et al., 2017).

A capacidade de infectar hospedeiros específicos possibilita controlar patógenos bacterianos em ambientes complexos. Sua aplicação abrange diversos setores, desde a medicina até o processamento de alimentos e a agricultura (GRACE et al., 2021; HARADA et al., 2018; QADIR; MOBEEN; MASOOD, 2018; SILVA; NOGUEIRA, 2022).

A utilização de bacteriófagos é uma alternativa viável e sustentável para controlar infecções bacterianas. No entanto, ainda há desafios a serem superados na aplicação de bacteriófagos como agentes de controle biológico. A sensibilidade a fatores ambientais, a possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana e a necessidade de entender melhor seus mecanismos são questões cruciais. A caracterização detalhada dos bacteriófagos e suas interações com a bactéria hospedeira são fundamentais para aproveitar seu potencial de forma eficaz e segura (DION; OECHSLIN; MOINEAU, 2020; HOLTAPPELS et al., 2021; SIEIRO et al., 2020; TROTTEREAU et al., 2021).

Dado o cenário atual de preocupações com a segurança alimentar e a crescente demanda por práticas agrícolas sustentáveis, a exploração de bacteriófagos como agentes de controle biológico contra patógenos bacterianos em plantas representa uma área de pesquisa em crescimento. A compreensão de seus mecanismos e sua aplicação estratégica podem contribuir

significativamente para o desenvolvimento de soluções mais eficazes e sustentáveis na agricultura.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Selecionar bacteriófagos e caracterizar por técnicas moleculares bacteriófagos capazes de infectar cepas de *Ralstonia solanacearum* ou *R. pseudosolanacearum*.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Isolar bacteriófagos a partir de amostras de solo e batata oriundas de campos contaminados;
2. Identificar os bacteriófagos por meio de sequenciamento total dos genomas
3. Avaliar o efeito dos bacteriófagos no controle de *R. pseudosolanacearum* em tomateiro;

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Cultura do tomate**

O tomateiro (*Solanum lycopersicum L.*) é originário da região andina (atualmente Peru, Bolívia e Chile) e sua disseminação foi feita pelos Incas, Maias e Astecas. Durante a colonização espanhola o tomate chegou ao continente europeu, onde, inicialmente, foi utilizado principalmente como planta ornamental (CAMARGO et al., 2006). Atualmente o tomate é cultivado em todo o mundo para fins alimentares.

No levantamento de 2021, a *Food and Agriculture Organization* (FAO) registrou 175 países que cultivam o fruto, sendo a China líder mundial, gerando cerca de 31% da produção (FAO, 2021). O Brasil ocupa a 9ª posição sendo responsável por 2,5%. O tomate é produzido em todas as regiões do Brasil. Segundo o levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção total no Brasil foi de 1 070,0 mil toneladas, com valor da produção de 8,65 bilhões de reais. O estado de Goiás lidera o ranking produzindo cerca de 6,8 toneladas, seguido por São Paulo, responsável por 1 039,7 mil toneladas (IBGE, 2023). O tomateiro ocupa a segunda posição mundial em área de cultivo de hortaliças e primeiro lugar mundial no ranking de hortaliças industrializadas (CONAB, 2019). A alta procura no mercado devido ao seu sabor e suas propriedades antioxidantes naturais (vitamina C, compostos

fenólicos e carotenoides), compostos bioativos e funcionais, carboidratos, proteínas e minerais, torna o tomate uma hortaliça de importância nutricional e econômica (CONAB, 2019).

Pertencente à família *Solanaceae*, o tomate conta com muitas variedades ou cultivares no mercado. As variedades apresentam diferentes respostas às condições de exposição à luz, concentração de CO<sub>2</sub>, temperatura, absorção de água e nutrientes, além de pragas e doenças. Tais características permitem que essas plantas prosperem em diferentes condições como climas tropicais e climas temperados (EMBRAPA, 2024).

O plantio do tomateiro pode ser feito em cultivo aberto ou protegido, realizado por pequenos, médios e grandes produtores. As plantas apresentam um porte arbustivo e seu crescimento vegetativo pode ser categorizado com base em seu tipo de desenvolvimento, que pode ser determinado ou indeterminado (EMBRAPA, 2024).

As cultivares de desenvolvimento determinado têm um crescimento limitado de até 1,20 m de altura sem a necessidade de estacas, sendo conhecidas como tomate rasteiro, estas são as preferidas para o plantio e são geralmente cultivadas para fins industriais de processamento. Por outro lado, as plantas de crescimento indeterminado podem alcançar até 10 metros de comprimento. Nestes casos, o tutoramento ou o uso de estacas se tornam necessários para manter a planta ereta e garantir que os frutos não entrem em contato com o solo (EMBRAPA, 2024). Ao selecionar uma variedade, é essencial considerar características como ciclo de crescimento, que pode variar de 95 a 125 dias dependendo dos fatores bióticos e abióticos; características alvo (acidez, viscosidade, coloração e tamanho do fruto) e características agrônômicas (padrão de maturação e tolerância a pragas e doenças) (EMBRAPA, 2024).

O cultivo do tomateiro está sujeito a uma grande diversidade de doenças. Segundo levantamento realizado em Santa Catarina pela Conab (2019), foi demonstrado que os defensivos agrícolas representaram 32% dos custos totais de produção em uma área com produtividade de 80 t/ha (CONAB, 2019). A murcha bacteriana, cujo agente etiológico é a bactéria *Ralstonia solanacearum* ou *R. pseudosolanacearum*, é uma das doenças mais prejudiciais que afeta o cultivo do tomateiro, podendo levar a perdas significativas principalmente em regiões de climas tropicais e subtropicais (LOPES, 2009).

### 3.2 Murcha bacteriana

A murcha bacteriana ocasiona perdas econômicas em importantes culturas por todo o mundo devido sua ampla distribuição geográfica e abundância de hospedeiros (mais de 400 espécies de plantas) (ÁLVAREZ; LÓPEZ, 2010). As plantas afetadas por *R. solanacearum* incluem culturas básicas (batata), frutas (banana, tomate), oleaginosas (girassol, amendoim), especiarias, forragens, flores, árvores florestais (pau-ferro e eucalipto), ervas daninhas e plantas ornamentais (PAUDEL et al., 2020). A família *Solanaceae* é a mais suscetível a esta doença. Há dificuldade em avaliar as perdas de safra devido à falta de uniformidade na coleta de dados, no entanto, há relatos de perdas anuais estimadas em um bilhão de dólares mundialmente (ELPHINSTONE, 2005).

*R. solanacearum* é transmitida pelo solo, água, equipamentos e material vegetal contaminado. A infecção ocorre através das raízes da planta e, ao colonizar o xilema, a bactéria secreta grandes quantidades de exopolissacarídeos que impossibilitam o transporte de água. Paralelamente à produção de exopolissacarídeos, ocorre o crescimento bacteriano em biofilme, o que garante proteção aos mecanismos de defesa da planta e impossibilita o tratamento com compostos exógenos (MINA et al., 2019). Os sintomas incluem murcha e retardo do crescimento, e conseqüentemente a morte da planta (AHMAD; ADDY; HUANG, 2021; ÁLVAREZ; LÓPEZ; BIOSCA, 2008).

*R. solanacearum* é aeróbica, com formato de bastonete, pertencendo a subdivisão das proteobactérias. Estas vêm sendo classificadas em raças, de acordo com a gama de hospedeiros (HAYWARD, 1994; HE; ET AL, 1983) e biovares, com base na utilização de três açúcares (lactose, maltose e celobiose) e três álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol) como fontes de carbono (HAYWARD, 1994).

Atualmente, as cepas de *R. solanacearum* são classificadas como um complexo de espécies. Este complexo é caracterizado por cepas que surgiram ao longo de uma evolução prolongada, ocorrendo de forma independente em diversas regiões e em diferentes hospedeiros. Denominado como Complexo de Espécies de *Ralstonia solanacearum* (RSSC), são classificados em quatro filotipos e sequevares de acordo com a sequência genética da região espaçadora intergênica (ITS) e dos genes *egl*, *hrpB* e *mutS* (FEGAN; PRIOR, 2005; PINHEIRO et al., 2011). De certa forma, os filotipos estão associados à origem geográfica dos isolados (FEGAN; PRIOR, 2005). Os isolados do filotipo I são principalmente encontrados na Ásia,



enquanto os filotipos IIA e IIB estão presentes nas Américas, o filotipo III na África e o filotipo IV na Indonésia. Contudo, devido à dispersão através de longas distâncias é possível encontrar diferentes filotipos em áreas geográficas diversas (RAMSUBHAG et al., 2012; SANCHEZ PEREZ et al., 2008).

O complexo *R. solanacearum* foi dividido em três espécies distintas. Os indivíduos dos filotipos I e III agora são classificados como pertencentes à *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. Os isolados do filotipo IV foram subdivididos em *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis*, *R. syzygii* subsp. nov. *celebesensis* e *R. syzygii* subsp. *syzygii*. Enquanto isso, os indivíduos do filotipo II continuam a ser designados como *R. solanacearum*. Essa separação em três genoespécies foi fundamentada em análises do espaço intergênico 16S–23S rRNA, do gene *egl*, em testes de hibridização de DNA–DNA e em estudos genômicos (PRIOR et al., 2016; SAFNI et al., 2014).

Não há controle de *R. solanacearum* devido à sua capacidade de manter genes de patogenicidade na ausência de uma planta hospedeira, alta variabilidade genética e agressividade sob diversas condições ambientais (PRIOR et al., 2016). A bactéria sobrevive de forma latente por longos períodos em até um metro de profundidade no solo, em água e plantas de vegetação espontânea (ÁLVAREZ; LÓPEZ; BIOSCA, 2008; SALAS; TÖFOLI, 2017). As estirpes são resistentes aos mecanismos de controle tradicionais tais como cobre, pesticidas e tratamentos com antibióticos (CAO et al., 2018; NICOLOPOULOU-STAMATI et al., 2016; WICKER et al., 2007).

Devido a inexistência de métodos para o controle de *R. solanacearum*, aposta-se na prevenção através do manejo integrado como: utilização de sementes certificadas, solo e a água livres do patógeno; evitar plantio durante o verão; uso de cultivares resistentes e rotação de cultura com gramíneas (milho e pastagens) (SALAS; TÖFOLI, 2017). No caso de solos infectados a ausência de cultivo por no mínimo 5 anos e controle de plantas daninhas são indicados para a redução da carga bacteriana (FRENCH, 1982; HUET, 2014; LOPEZ; BIOSCA, 2005).

Alternativas para controle dos sintomas da murcha vêm sendo estudadas, como a utilização de bactérias antagonistas ou mutantes avirulentas de *R. solanacearum* (YULIAR; ASI NION; TOYOTA, 2015), melhoramento genético de plantas (ZOHOUNGBOGBO et al., 2021) e aplicação de bacteriófagos (ÁLVAREZ; BIOSCA, 2017; ÁLVAREZ; LÓPEZ; BIOSCA, 2019; BUTTIMER et al., 2017; ELHALAG et al., 2018; UMRAO; KUMAR;

KAISTHA, 2021; WEI et al., 2017). O uso de bacteriófagos líticos vem ganhando destaque pela sua capacidade de penetrar o biofilme, infectar as bactérias hospedeiras, diminuir a comunidade bacteriana, e conseqüentemente, aumentar a população de partículas virais (BIOSCA; GONZÁLEZ; ORTEGA, 2016).

### 3.3 Bacteriófagos - contexto histórico e suas características

A capacidade dos bacteriófagos em infectar apenas hospedeiros específicos os torna eficazes para o controle de patógenos bacterianos em ambientes complexos, promovendo seu uso para aplicações médicas, veterinárias, processamento de alimentos e práticas agrícolas (GRACE et al., 2021; HARADA et al., 2018; QADIR; MOBEEN; MASOOD, 2018; SILVA; NOGUEIRA, 2022; YAMADA; YAMADA, 2012). Logo em sua descoberta, sua eficácia foi demonstrada contra doenças humanas (ABEDON et al., 2011; EL-SHIBINY; EL-SAHHAR, 2017; SULAKVELIDZE; ALAVIDZE; MORRIS, 2001) motivando empresas farmacêuticas a comercializar preparações de bacteriófagos para combater infecções bacterianas. Quase em paralelo, pesquisadores começaram a avaliar e ter sucesso no uso dos bacteriófagos no tratamento de doenças bacterianas de plantas, como por exemplo, controle da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas* sp. em repolhos (MALLMANN; HEMSTREET, 1924; MOORE, 1926). Apesar do sucesso inicial o estudo diminuiu drasticamente com a descoberta da penicilina. Durante aquele período, apenas algumas nações do leste europeu como Polônia, Geórgia e Rússia continuaram as pesquisas neste campo (KUTATELADZE; ADAMIA, 2010; SULAKVELIDZE; ALAVIDZE; MORRIS, 2001).

Os bacteriófagos são divididos em 13 famílias com base no tipo de ácido nucleico encapsulado e na aparência de seu *virion* (partícula infecciosa) (GAMACHU; DEBALO, 2022). Tais vírus variam em características replicativas e morfológicas, sendo esses alguns dos parâmetros usados pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) para sua classificação.

Sua estrutura de natureza proteica que protege o ácido nucleico de degradações, chama-se capsídeo e possibilita sua interação com as células hospedeiras. O capsídeo pode ter formato poliédrico como nas famílias *Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* e *Cystoviridae*; filamentosos como *Inoviridae*; pleomórfico como *Plasmaviridae* ou conectado a uma cauda como toda ordem *Caudovirales* (ACKERMANN, 2005, 2009; DION; OECHSLIN; MOINEAU, 2020).

As partículas dos bacteriófagos podem medir de 22-500 nm de diâmetro. Seu genoma pode ser composto de DNA ou RNA. Bacteriófagos com DNA de fita dupla (dsDNA) representam a maioria em bancos de dados públicos a partir de 2019. Outros bacteriófagos foram identificados com DNA de fita simples (ssDNA), RNA de fita simples (ssRNA) e RNA de fita dupla (dsRNA) (DION; OECHSLIN; MOINEAU, 2020).

Para que os bacteriófagos completem seu ciclo replicativo, é necessário induzir a célula bacteriana hospedeira a realizar a síntese de todos os componentes essenciais necessários para a produção de novos bacteriófagos. Isso ocorre via dois ciclos: lisogênico (na qual a célula hospedeira não é destruída, mas sim geneticamente alterada) e lítico (a célula hospedeira é destruída).

O ciclo lítico, também referido como infecção virulenta, consiste em quatro etapas: ligação, síntese, montagem e liberação. A fase de ligação depende da presença de receptores específicos na superfície da célula hospedeira bacteriana, aos quais o fago pode se ligar. A fase de síntese, na qual o material genético do fago passa para a célula hospedeira por um mecanismo semelhante à injeção e o genoma viral sintetiza endonucleases que degradam o cromossomo, interrompendo o metabolismo da célula hospedeira e redirecionando-o para síntese de ácido nucleico e proteínas virais. Após a síntese, o capsídeo viral é montado e seu genoma é empacotado em novos bacteriófagos. Por fim, a membrana da célula bacteriana é então rompida, liberando novas partículas virais. Enzimas líticas, também conhecidas como endolisinas ou lisinas, desempenham um importante papel na degradação do peptidoglicano da membrana bacteriana durante a etapa final do ciclo (BIOSCA; GONZÁLEZ; ORTEGA, 2016; GAMACHU; DEBALO, 2022; GILL; ABEDON, 2003; HALAWA, 2023; HANLON, 2007; MADIGAN et al., 2016; ROGOVSKI et al., 2021; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

### **3.4 Aplicação de bacteriófagos e perspectivas para o futuro**

A utilização de bacteriófagos apresenta potencial, demonstrando ser uma abordagem escalável, com custo-benefício atrativo e uma adaptabilidade na formulação de inóculos direcionados a cepas específicas. Bacteriófagos que infectam *R. solanacearum* têm sido caracterizados como pertencente às famílias *Inoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* e *Siphoviridae* (ADDY; AHMAD; HUANG, 2019). O bacteriófago PE226 isolado na Coreia do Sul (família *Inoviridae*), exibiu virulência a *R. solanacearum* (MURUGAIYAN et al., 2011). O bacteriófago  $\phi$ Rs551, isolado nos Estados Unidos (família *Inoviridae*), reduziu a virulência

de *R. solanacearum* raça 3 biovar 2 ao diminuir a produção de exopolissacarídeo (AHMAD et al., 2017). O uso do bacteriófago  $\phi$ sp1 isolado na Índia (família *Myoviridae*) demonstrou uma diminuição do crescimento bacteriano, permitindo uma redução de até 87% de incidência da murcha bacteriana (UMRAO; KUMAR; KAISTHA, 2021).

Embora haja relatos positivos sobre a aplicação de bacteriófagos, ainda existem desafios que requerem investigação (SIEIRO et al., 2020). Dentre eles está a sensibilidade dos bacteriófagos no meio ambiente devido ao efeito de fatores externos como temperatura, dessecação e luz ultravioleta, isso implica na necessidade de otimizar o momento e/ou época de aplicação dos bacteriófagos (BALOGH et al., 2003; IRIARTE et al., 2007, 2012).

Outra consideração importante relacionada a aplicação de bacteriófagos é o desenvolvimento de bactérias resistentes (MEADEN; KOSKELLA; MOYA, 2013; OECHSLIN, 2018). Em contraste com a resistência a antibióticos, onde o surgimento de cepas multirresistentes é uma preocupação global, as características da resistência aos bacteriófagos apresentam peculiaridades (VIVAS et al., 2019; WAGEMANS et al., 2022). A resistência bacteriana aos bacteriófagos é cerca de 10 vezes menor do que a resistência aos antibióticos (TANJI et al., 2004), paralelamente, pode ser selecionado uma bactéria menos agressiva, pois os receptores na superfície da bactéria também podem atuar como fatores de virulência (BARROW; SOOTHILL, 1997; WENDLING et al., 2017), como observado em cepas das espécies *Flavobacterium columnare* (LAANTO et al., 2012), *F. psychrophilum* (CASTILLO et al., 2015) e *Vibrio anguillarum* (RØRBO et al., 2018).

A investigação de aspectos desafiadores desempenhará um papel fundamental no desenvolvimento do uso de bacteriófagos como agentes no combate às infecções bacterianas que representam uma ameaça para a produção de alimentos (ALLEN et al., 2013; PIRNAY et al., 2012). Os custos decrescentes do sequenciamento do genoma completo devem tornar o estudo da evolução e propagação dos mecanismos de resistência mais acessível e preciso (DIDELLOT et al., 2012; KISAND; LETTIERI, 2013). Além disso, os avanços na metagenômica podem viabilizar o monitoramento dos efeitos das perturbações ambientais nas comunidades microbianas e permitir o rastreamento das mudanças durante longos períodos. Ainda, obter genomas de bacteriófagos virulentos é essencial para fins de aplicação, assegurando que não codifiquem genes associados à toxicidade, e ainda permitindo avaliar melhor o resultado do tratamento (PHILIPSON et al., 2018).

Caracterizar bacteriófagos, não apenas para identificar bacteriófagos desconhecidos, mas também para compreender completamente sua biologia molecular e mecanismos de ação, pode mitigar riscos potenciais relacionados ao seu uso. Dados genômicos de bacteriófagos estão ajudando a adquirir conhecimento detalhado sobre sua evolução e ecologia em diversos ecossistemas (DION; OECHSLIN; MOINEAU, 2020).

Cerca de 35 bacteriófagos de *R. solanacearum*, com genomas completos, estão classificados de acordo com os guias do ICTV. A principal origem geográfica de bacteriófagos de *R. solanacearum* com genomas completos publicados é a Ásia, com 64% oriundos do Japão (TROTEREAU et al., 2021). No Brasil, foram sequenciados cerca de 10 bacteriófagos que infectam *R. solanacearum*. Um exemplo é o bacteriófago do gênero Phikmvvirus, denominado phiAP1, isolado a partir de solo de cultivo de tomate e que demonstrou infectar diversas estirpes de *R. solanacearum*, *Ralstonia pseudosolanacearum* e *Ralstonia syzygii*, (XAVIER et al., 2018). Também já foi descrito um bacteriófago filamentosos da família Inoviridae, denominado RSIBR1, que causa redução da patogenicidade de *R. pseudosolanacearum* em berinjela sem causar lise celular (DE ALMEIDA et al., 2022).

Isolar e caracterizar bacteriófagos de *R. solanacearum* de uma região geográfica ainda pouco explorada contribui com o conhecimento sobre a diversidade viral. A compreensão de suas características genéticas e sua associação com a epidemiologia local de seus hospedeiros é essencial para ajustar as estratégias de aplicações biotecnológicas (HOLTAPPELS et al., 2021; TROTEREAU et al., 2021). Bacteriófagos nativos poderão ter maior sucesso biológico sobre patógenos locais que bacteriófagos exógenos, uma vez que agentes biológicos são diretamente afetados por condições externas (IRIARTE et al., 2007, 2012). Fatores abióticos e bióticos, como o clima e especificidade do hospedeiro, devem ser considerados para o uso de bacteriófagos como agentes antibacterianos. A investigação do comportamento de bacteriófagos na lise de células bacterianas poderá revelar novos mecanismos para o combate a infecções sem a necessidade de novos antibióticos. Bacteriófagos adequados poderão ser utilizados como método de controle alternativo sustentável devido à sua alta especificidade e por não disseminar resíduos tóxicos (PERTICS; KOVÁCS; SCHNEIDER, 2023). Investigar a complexidade e diversidade dos mecanismos presentes nestes microrganismos pode dar espaço a novas possibilidades, abrindo o leque para recuperação de áreas contaminadas, controle e prevenção de doença e sanidade de equipamentos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Armazenamento de *Ralstonia solanacearum* e *Ralstonia*

#### *pseudosolanacearum*

As linhagens de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* (IBSBF-2140, IBSBF-2385, IBSBF-2477 e IBSBF-3228) (Tabela 1) comprovadamente virulentas foram cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, abrigada no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, CAPSA, Instituto Biológico, Campinas, SP. O armazenamento foi realizado de acordo com o protocolo desenvolvido por Wolff (2016), mas com adaptações. As linhagens foram cultivadas em placas de Petri contendo meio CPG (0,1% p/v de casaminoácidos; 1,0% de peptona; 0,5% de glicose e 1,7% de ágar) (MIHARA et al., 2016; WOLFF, 2016). Para selecionar colônias virulentas (rosa claro), 0,005% de corante Cloreto de Tetrazólio (TZC) foi adicionado.

**Tabela 1:** Origem dos isolados bacterianos utilizados

<b>Código IBSBF - Depositante</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Ano de isolamento</b>	<b>Local</b>
2140 – J. Rodrigues Neto JL- 17	<i>Solanum tuberosum</i>	2005	Brasil
2385 – L.O.S Beriam	<i>Solanum lycopersicon</i>	2006	Brasil
2477 – J. Rodrigues Neto JV - 26	<i>Solanum tuberosum</i> var. Biutje	2007	Brasil
3228 – L.O.S Beriam	<i>Solanum lycopersicon</i>	2016	Brasil

Estoques de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* foram preservados em tubos criogênicos contendo 420 µL de glicerol 100% e 980 µL de células bacterianas, e mantidos em ultrafreezer a -80 °C. Para a reativação, alíquotas de 10µL das amostras dos estoques em glicerol foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultivo CPG pela técnica de esgotamento utilizando-se alça bacteriológica para visualização de colônias e realização de testes moleculares.

Para o cultivo em meio líquido, células bacterianas foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo caldo CPG e incubadas a 28 °C por 16 horas sob agitação de 120-150 rpm em um agitador de bancada, para obtenção da bactéria em sua fase exponencial de crescimento ( $OD_{\lambda 600 \text{ nm}} = 0,2$ ). As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4 °C e utilizadas em ensaios por no máximo um mês.

A determinação dos filotipos das linhagens bacterianas foi realizada por meio de sequenciamento da região espaçadora 16S-23S com os primers pHR (TGCGGCTGGATCACCTCCTT) (MASSOL-DEYA et al., 1995) e p23Suni322-anti (GGTTCTTTTCACCTTCCCTC) (HONEYCUTT et al., 1995). A amplificação foi realizada a partir de ~20 ng de DNA bacteriano, com 200 nM de cada primer e *GoTaq Green Master Mix* (Promega) em volume final de 20 µL. O programa do termociclador consistiu em desnaturação inicial a 94°C/2 min, 40 ciclos de 94°C/10s – 54°C/30s – 72°C/40s e extensão final a 72°C/4 min. Os produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1%, coloração com brometo de etídio e visualização em transiluminador sob luz UV. Os produtos amplificados foram sequenciados pelo método Sanger, utilizando o reagente *BigDye Terminator v3.1* (*Applied Biosystems*) e equipamento *3500xL Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) (HONEYCUTT; SOBRAL; MCCLELLAND, 1995; MASSOL-DEYA et al., 1995).

#### 4.2 Isolamento de bacteriófagos

Bacteriófagos foram isolados a partir de treze amostras de batatas sementes positivas para a presença de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* de acordo com análises realizadas pelo Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário do Instituto Biológico.

Os isolamentos foram realizados seguindo o protocolo proposto por Wolff (2016) com adaptações. Em frasco Erlenmeyer, 25g de amostra de batatas cortadas com bisturi estéril foram adicionadas a 75 mL de tampão SM (5,8g de NaCl, 2g de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 50 mL 1M Tris HCl pH7.4, 5,0 mL ágar a 1%) e mantido a temperatura ambiente por 12 horas a 60 rpm em agitador de bancada. A suspensão foi transferida para tubo tipo Falcon de 50 mL e centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm (WOLFF, 2016).

As amostras foram enriquecidas em frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de caldo CPG com o dobro da concentração e 20 mL das quatro linhagens de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* (IBSBF-2140, IBSBF-2385, IBSBF-2477 e IBSBF-3228). Os frascos Erlenmeyers foram mantidos a 28 °C por 12 horas a 60 rpm em agitador de bancada a 60 rpm por 12 horas a 28 °C. Em seguida, as amostras foram novamente transferidas para tubo Falcon de 50 mL, centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos e filtradas (PVDF de 0,22 µm) com auxílio de uma seringa.

Para confirmar a presença de bacteriófagos, foi utilizada a técnica de camada dupla de ágar de Adams (1959) adaptada. Em placas de Petri, foi efetuada uma camada base de

meio de cultivo CPG contendo 1,7% de ágar e posterior sobrecamada com o mesmo meio contendo 0,45% de ágar e 1 mL de suspensão de linhagens de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* em sua fase exponencial de crescimento. Após a secagem, alíquotas de 20 µL do filtrado foram inoculadas em pontos específicos das placas, as quais foram mantidas em estufa a 28 °C por 48 horas (ADAMS, 1959).

### **4.3 Especificidade de hospedeiro**

A determinação das linhagens de hospedeiros específicos foi determinada de acordo com Addy (2019), mas com pequenas modificações. Resumidamente, alíquotas de 20 µL de amostra de cada fago foram inoculadas pelo método de camada dupla descrito anteriormente. A camada superior foi preparada com 1 mL de cada linhagem bacteriana em sua fase exponencial de crescimento. As placas foram incubadas a 28 °C durante 48 horas. A sensibilidade à infecção pelo fago à bactéria foi confirmada pela observação placas de lise.

### **4.4 Purificação de bacteriófagos**

Amostras que apresentaram placas de lise indicaram a presença de bacteriófagos e foram submetidas a diluições em série em tampão SM até  $1 \times 10^{-8}$ . Um volume de 100 µL de cada diluição foi adicionado diretamente a microtubos esterilizados contendo 1 mL de suspensão bacteriana na fase exponencial de crescimento. As células foram incubadas a 28 °C durante 30 minutos sob agitação de 500 rpm em agitador de bancada. Em seguida, foram adicionadas a placas de Petri contendo 4 mL de meio CPG para preparação da camada dupla (MIHARA et al., 2016). As placas de Petri foram mantidas em estufa a 28 °C durante 48 horas (MIHARA et al., 2016; WOLFF, 2016).

Uma fração do meio de cultura contendo uma placa de lise foi transferida, utilizando uma ponteira de 20 µL esterilizada, para um microtubo contendo 1 mL de tampão SM. O microtubo foi submetido a agitação de 500 rpm em agitador de bancada durante duas horas. Em seguida, a amostra foi mantida refrigerada por um período de 24 horas. A amostra foi centrifugada a 5.000 g durante 10 min e o sobrenadante foi transferido para tubo esterilizado. Após a purificação, as amostras foram diluídas em série e o processo de purificação foi repetido duas vezes com o objetivo de se obter uma amostra com apenas um tipo viral.

### **4.5 Armazenamento de bacteriófagos**



Para o armazenamento de bacteriófagos, 100  $\mu\text{L}$  de suspensão viral foi multiplicada em 10 mL de suspensão de *R. pseudosolanacearum* em sua fase exponencial de crescimento. As células foram incubadas a 28 °C por 48 horas sob agitação de 120 rpm. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 20 °C por 15 minutos a 4000 rpm e filtradas (PVFD de 0,22  $\mu\text{m}$ ) com auxílio de uma seringa. Microtubos contendo 1,5 mL de amostras de bacteriófagos foram armazenados a 4 °C.

Estoques de bacteriófagos foram preparados em microtubos contendo o filtrado suplementado com concentração final de 15% glicerol. Os microtubos foram armazenados a -20 °C e -80 °C (ACKERMANN, 2005; ALVI et al., 2018).

#### 4.6 Protocolo de titulação

Para determinação da titulação dos bacteriófagos, 100  $\mu\text{L}$  das amostras purificadas foram adicionados em 10 mL de suspensão de *R. pseudosolanacearum* em fase exponencial de crescimento em caldo CPG. A cultura foi incubada a 28 °C por 48 horas a 120 rpm e, posteriormente, transferida para tubo Falcon de 15 mL e centrifugada a temperatura ambiente por 15 min a 4.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado (PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$ ) com auxílio de uma seringa e uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  foi submetida à diluição em série de até  $1 \times 10^{-10}$ . Posteriormente, 1 mL de suspensão de *R. solanacearum* foi adicionado a 4 mL de meio CPG contendo 0,45% de ágar e vertido sobre meio sólido para o preparo da sobrecamada. Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de cada diluição do bacteriófago foram depositados em diferentes pontos da placa (MIHARA et al., 2016; WOLFF, 2016). O ensaio foi realizado em triplicata e as placas de lise foram contadas e expressas em unidades formadoras de placas/mL (UFP/mL).

#### 4.7 Avaliação de virulência da linhagem de *R. pseudosolanacearum* IBSBF-3228

Para verificar a melhor concentração para a inoculação de *R. pseudosolanacearum*, 63 mudas de tomate *Solanum lycopersicum* (L.) variedade Santa Clara I-5300 com cerca de 15 dias de crescimento foram transplantadas para vasos de 300 mL contendo substrato Vivatto (*Technes*). Para os tratamentos contendo a fitobactéria, foram preparadas suspensões nas concentrações de  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  UFC/mL e um volume 12 mL foi aplicado nos vasos correspondentes. No tratamento testemunha (T) foi utilizada água esterilizada. Tanto as suspensões quanto a testemunha foram aplicados no solo, próximo ao caule da planta. O

experimento foi realizado em triplicata e os sintomas de murcha bacteriana foram registrados uma vez por semana utilizando-se a escala de grau de murcha (KEMPE, 1983).

- Grau 1 - 25% das folhas das plantas murchas;
- Grau 2 - 26–50% das folhas das plantas murchas;
- Grau 3 - 51–75% das folhas das plantas murchas;
- Grau 4 - 76% ou mais folhas das plantas murchas e colapso do caule;
- Grau 5 - morte das plantas.

#### **4.10 Avaliação da eficiência de bacteriófagos na prevenção de murcha bacteriana**

O ensaio biológico foi conduzido para verificar a eficiência dos bacteriófagos na prevenção do aparecimento de sintomas da murcha bacteriana no tomateiro em solo contaminado com *R. pseudosolanacearum* IBSBF-3228.

Plântulas de tomate de aproximadamente 20 dias foram transplantadas em vasos preenchidos com 300 mL de substrato *Vivatto*. Nos vasos correspondentes, foram inoculados 10 mL de suspensão de *R. pseudosolanacearum* na concentração de  $1 \times 10^9$  UFC/mL em fase exponencial de crescimento. Em seguida, 10 mL de suspensão de bacteriófagos na concentração de  $1 \times 10^8$  UFP/ml foram aplicadas nos mesmos vasos. Para o controle positivo foi utilizada apenas 10 mL da suspensão bacteriana e para a testemunha foi utilizada 10 mL de água esterilizada. Cada tratamento consistiu em sete repetições e os sintomas da doença foram registrados uma vez por semana durante um mês.

#### **4.11 Precipitação de bacteriófagos**

Para precipitação de bacteriófagos 30  $\mu$ L de cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ) foi adicionado a 1,5 mL de amostra filtrada. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 5 minutos e centrifugadas a 20 °C por 90 minutos a 14.000 RPM. O sedimento foi suspenso em 30  $\mu$ L de tampão SM.

A eficácia da precipitação das amostras concentradas foi verificada através da contagem de UFP/ml, em que, 5  $\mu$ L do precipitado é submetido a diluição em série de até  $1 \times 10^{-7}$  e 20  $\mu$ L de cada diluição foi inoculada pelo método de dupla camada.

#### 4.12 Extração de DNA de bacteriófagos precipitados com cloreto de zinco

Cinco das 10 amostras de bacteriófagos (F1, F2, F3, F4, F5) foram preparadas inoculando 100 µL em 10 mL de suspensão de *R. pseudosolanacearum* IBSBF-3228 em sua fase exponencial de crescimento (OD 600 nm = 0,2). Os tubos foram incubados a 27 °C por 48 horas a 150 rpm e, em seguida, as células foram centrifugadas e filtradas com filtro (PVDF de 0,22 µm) com auxílio de uma seringa.

Para a extração de DNA, 900 µL do filtrado foi transferido para um microtubo contendo 100 µL de tampão para DNase e 10 µL de DNase. A amostra foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Após esse período, 1/50 de solução de cloreto de zinco 2M foi adicionado ao tubo, homogeneizado no vórtex e incubado a 37 °C durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação por 30 minutos a 13.400 rpm. O sobrenadante foi descartado por inversão e 500 µL de tampão TENS foi adicionado. As amostras foram agitadas em vórtex e 50 µL de proteinase K foram adicionados à suspensão com posterior incubação a 60 °C durante 30 minutos. A seguir, foram adicionados 250 µL de clorofórmio/-álcool isoamílico (24:1) e 250 µL de fenol, homogeneizando a solução até completa emulsificação, posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13.400 rpm. 500 µL do sobrenadante foi transferida para um novo microtubo e 500 µL de clorofórmio foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas e submetidas à centrifugação nas condições citadas anteriormente. A seguir, 500 µL do sobrenadante foram adicionados em um novo tubo, adicionou-se 500 µL de isopropanol e incubou-se por 5-10 minutos freezer a -80 °C. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 70% foi adicionado ao tubo, homogeneizando-se por inversão e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os DNAs foram secos em estufa a vácuo. Cerca de 50 µL de água ultrapura foram utilizados para suspender o sedimento. A concentração de DNA foi verificada utilizando *Nanodrop*.

#### 4.13 Extração de DNA de bacteriófagos eluídos diretamente de placas de lise

Este método rápido foi descrito por Jakociune e Moodley (2018) (JAKOČIŪNĒ; MOODLEY, 2018). Amostras de bacteriófagos foram preparadas em placas de petri contendo 1 mL de *R. pseudosolanacearum* em sua fase exponencial de crescimento e 100 µL de

bacteriófagos para preparação da sobrecamada. As placas foram incubadas a 28 °C durante 24 horas. Após o aparecimento de placas de lise, 5 mL de tampão SM foi adicionado e as placas foram refrigeradas a 4 °C por 24h. Posteriormente, 4 mL das amostras foram centrifugados a 20 °C por 20 minutos a 4000 RPM e o sobrenadante foi filtrado utilizando filtro (PVDF de 0,22 µm) com auxílio de uma seringa. 450 µL do filtrado foi tratado adicionando 50 µL de tampão DNase 10x, 1 µL de DNase (1 U/µL) e 1 µL de RNase (10 mg/mL) a 37 °C por 1h30. Em seguida, 20 µL de 0,5 M EDTA foi adicionado para a inativação das enzimas, 1,25 µL de Proteinase K (20 mg/mL) foi adicionado e as amostras foram incubadas a 56 °C por 1h30. A purificação do DNA foi feita utilizando o kit *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) e verificada utilizando *Nanodrop*.

#### **4.14 Extração de DNA de bacteriófagos precipitados com PEG**

As amostras de bacteriófagos foram preparadas incubando 500 µL de bacteriófagos em 50 mL de *R. pseudosolanacearum* em sua fase exponencial de crescimento a 28 °C por 48 h a 150 RPM. 5 mL de clorofórmio/ álcool isoamílico foi adicionado e as células foram novamente incubadas a 28 °C por 30 minutos a 150 RPM. Após incubação as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 20 minutos a 4.000 RPM e filtradas (PVDF de 0,22 µm) com auxílio de seringa e armazenadas a 4 °C.

Para a precipitação 2 mL de polietilenoglicol (PEG 50%) e 2 mL de cloreto de sódio (NaCl) foi adicionado a 16 mL do filtrado de fago e incubado a 4 °C durante a noite. Após a incubação a amostra foi submetida a centrifugação a 4 °C por 30 minutos a 14.000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 35,7 µL de tampão TENS. Em seguida, 55,5 µL de tampão DNase e 5,55 µL de DNase foi adicionado e incubado a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação a enzima foi inativada a 65 °C por 10 minutos. Posteriormente, 50 µL de Proteinase K foi adicionada e incubada a 37 °C por 30 minutos sob agitação de 500 RPM. 500 µL de clorofórmio e 250 µL de fenol foi adicionado e homogeneizado até emulsificar, em seguida, foi centrifugado por 5 min a 13.400 RPM. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 500 µL de clorofórmio foi adicionado, novamente homogeneizado e centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 500 µL de isopropanol 100% foi adicionado. A amostra foi mantida no freezer por 5-10 minutos e centrifugada por 10 minutos a 14.000 RPM. O sobrenadante foi descartado por inversão e 1 mL de etanol foi adicionado, homogeneizado e centrifugado sob as mesmas condições. O

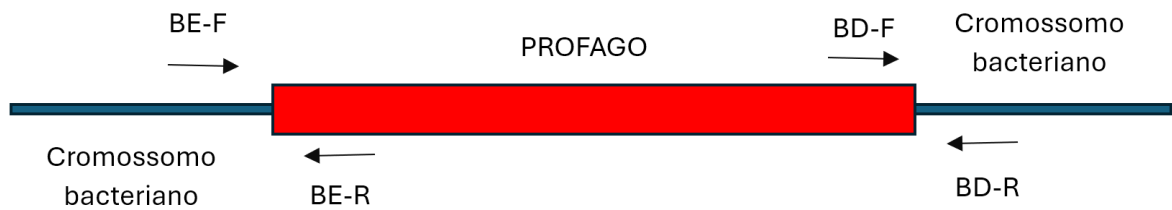
sobrenadante foi descartado, o pellet foi secado em uma centrifuga a vácuo e ressuspensão em água ultrapura. A concentração de DNA foi verificada utilizando *Nanodrop*.

#### **4.15 Sequenciamento de bacteriófagos**

O sequenciamento completo do genoma dos bacteriófagos foi realizado utilizando-se o protocolo *Nanopore Protocol Genomic DNA by Ligation* (SQK-LSK109). Uma amostra composta contendo DNA total extraído dos bacteriófagos F1, F2, F3, F4 e F5 foi submetida ao sequenciamento em uma *flowcell* de *MinION* (*Oxford Nanopore*). Os dados foram analisados na plataforma e *Galaxy Project* ([usegalaxy.org](http://usegalaxy.org)). Nesta plataforma, a classificação taxonômica das sequências foi realizada utilizando o programa *Kraken2* e a montagem do genoma empregando-se o programa *Flye*. A presença de sequências de bacteriófagos também foi verificada utilizando-se os programas *Phaster* ([phaster.ca](http://phaster.ca)) e *Phastest* ([phastest.ca](http://phastest.ca)).

#### **4.16 PCR para confirmação da presença de bacteriófago incorporado no genoma de linhagens *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum***

Um possível bacteriófago da família Inoviridae encontrado pelo sequenciamento de DNA apresentou similaridade próxima de 100% com profagos incorporados nos genomas de cinco linhagens de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* depositados no *GenBank* (CFBP 8695, RS 489, RS 488, UY031 e UW72). A análise das sequências que flanqueiam o profago mostrou que este está inserido na mesma posição nas cinco linhagens da bactéria. Desta forma, para verificar se este fago se encontra incorporado no genoma de alguma das linhagens utilizadas no presente estudo, dois pares de primers foram desenvolvidos com base nas sequências das bordas do fago e dos segmentos genômicos que o flanqueiam (Figura 1). As sequências destes primers foram: BE-F (5' GGCCGTAATCAGCGTATTGA 3'), BE-R (5' CGGCATCTGTACTGGCATATC 3'), BD-F (5' TTGACGTCTGACAACCAAGTAG 3') e BD-R (5' GCATTTGTTGGGCCGTTTAG 3'). O tamanho do amplicon esperado para a borda esquerda (BE) foi de 635 pb e para a borda direita (BD), de 504 pb.



**Figura 1:** Estratégia para verificação da presença do profago RPSI-IB01 incorporado no genoma bacteriano. PCRs com os primers BE (borda esquerda) e BD (borda direita) devem gerar produtos em caso de incorporação ao genoma.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação dos filotipos de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*

O sequenciamento da região espaçadora entre os genes ribossomais 16S e 23S, resultou na identificação dos isolados de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* utilizados neste estudo como pertencentes ao filotipo I (IBSBF 3228), filotipo IIA (IBSBF 2385) e filotipo IIB (IBSBF 2140 e 2477). Desta forma, o isolado IBSBF 3228 pertence à espécie *Ralstonia pseudosolanacearum*, enquanto as demais permaneceram com a identificação de *R. solanacearum*.

### 5.2 Isolamento de bacteriófagos de *R. pseudosolanacearum*

Foram obtidos bacteriófagos em dez tentativas de isolamento a partir de amostras de batata e de solo de um total de treze amostras analisadas (Figura 2, Tabela 2). A purificação dos bacteriófagos foi realizada com sucesso para todos os isolados (Figura 3).

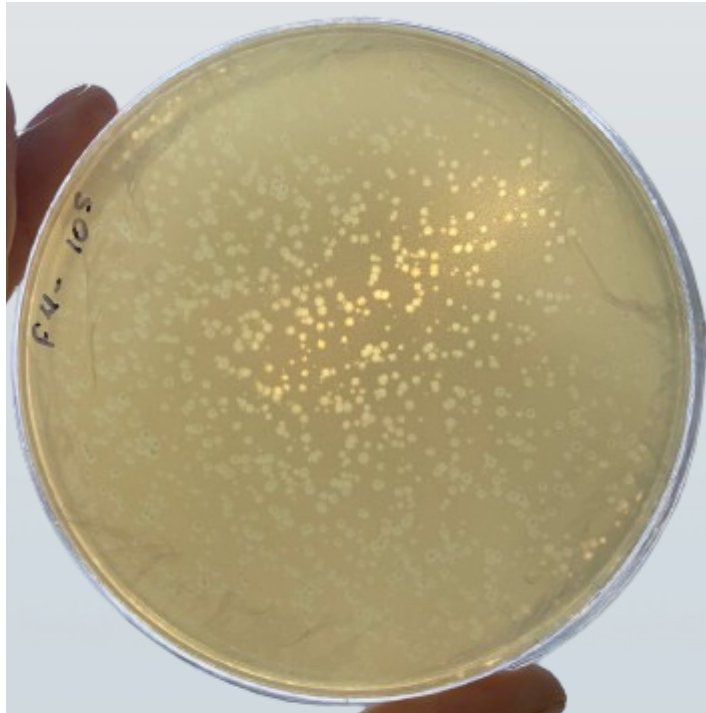
Todos os bacteriófagos demonstraram especificidade à linhagem virulenta IBSBF-3228.

**Tabela 2:** Isolados de bacteriófagos e suas origens

Isolado	Amostra	Origem
F1	Composteira	São Paulo - SP
F2	Composteira	Bertioga - SP
F3	Solo cultivo de tomate	São Paulo - SP
F4	Solo cultivo de tomate	São Paulo - SP
F5	Solo cultivo de tomate	São Paulo - SP
F6	Batata	Divinolândia - SP
F7	Batata	Divinolândia - SP
F8	Batata	Divinolândia - SP
F9	Batata	Divinolândia - SP
F10	Batata	Divinolândia - SP



**Figura 2:** Isolamento de bacteriófagos a partir da amostra F1 (A) e F2 (M) de batata contaminada. Formação de placa de lise a partir de inóculo de 20  $\mu$ L de amostra pré-enriquecida, pelo método de dupla camada de ágar na presença de *R. pseudosolanacearum* IBSBF-3228

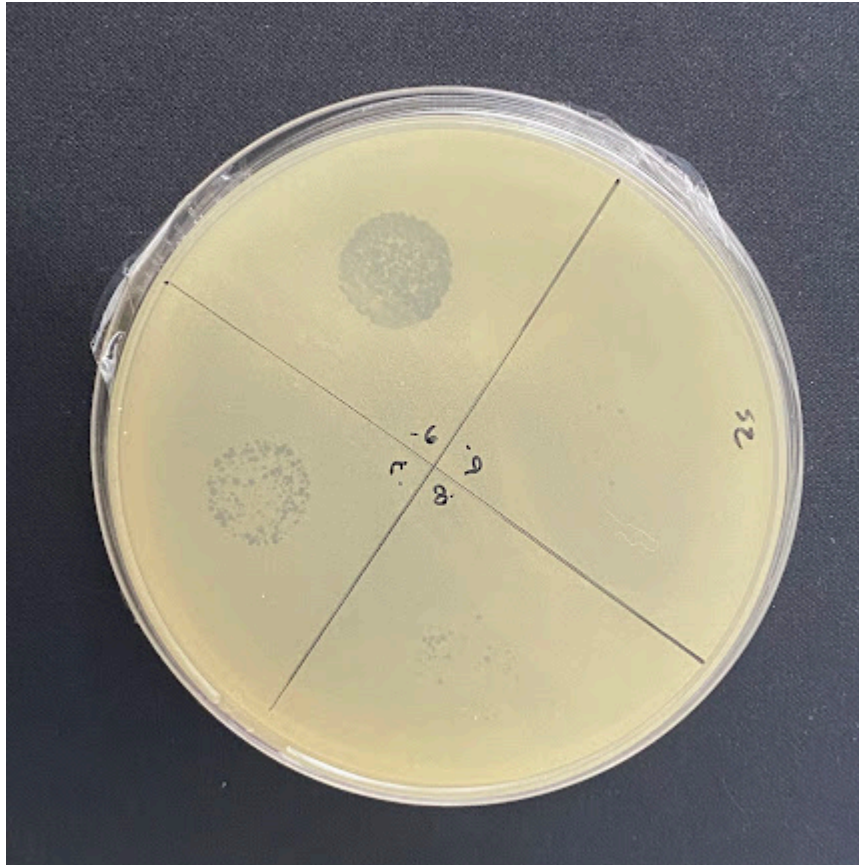


**Figura 3:** Purificação do fago da amostra F4 por meio de diluição seriada. Placas de lise formadas na diluição de  $10^{-5}$ , pelo método de dupla camada de ágar na presença de *R. pseudosolanacearum* IBSBF-3228.

### 5.3 Títulos de bacteriófagos

Para definir os títulos virais foi realizada diluição seriada e contagem de placas de lise pelo método de dupla camada de ágar com microgotas (Figura 4). Os títulos obtidos variaram de  $8,6 \times 10^8$  a  $5,5 \times 10^{10}$  UFP/mL (Tabela 3).





**Figura 4:** Visualização de placas de lise em placas de Petri através do método de sobrecamada. É possível visualizar placas de lise nas diluições  $1 \times 10^{-7}$  (-7),  $1 \times 10^{-8}$  (-8) e  $1 \times 10^{-9}$  (-9).

**Tabela 3:** Avaliação dos títulos das amostras de bacteriófagos que infectam *R. pseudosolanacearum* IBSBF-3228.

Fago	Título (UFP/mL)
F1	$5,5 \times 10^{10}$
F2	$2,6 \times 10^9$
F3	$8,6 \times 10^8$
F4	$2,6 \times 10^{10}$
F5	$1,0 \times 10^{10}$
F6	$1,4 \times 10^8$
F7	$2,0 \times 10^9$
F8	$1,4 \times 10^9$
F9	$3,9 \times 10^9$
F10	$6,5 \times 10^7$

#### 5.4 Determinação da concentração de *R. pseudosolanacearum* efetiva para os experimentos de inoculação

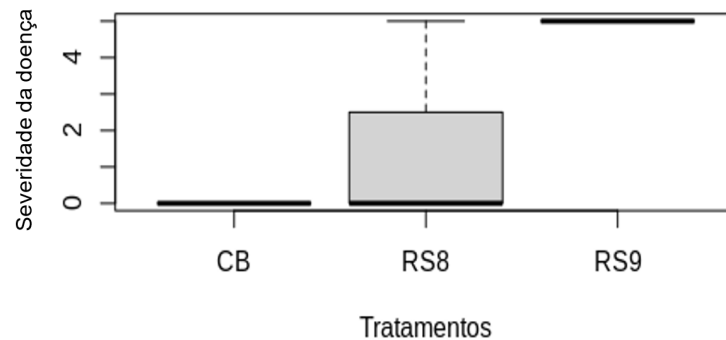
Para determinar a concentração da linhagem de *R. pseudosolanacearum* IBSBF-3228, 12 mL de suspensões nas concentrações de  $1 \times 10^8$  UFC/mL e  $1 \times 10^9$  UFC/mL foram inoculados em vasos com substrato e mudas de tomate (Figura 5). A análise dos dados de severidade da doença através do teste de Tukey indicou que a concentração  $1 \times 10^8$  UFC/ml (RS8) não resultou em diferença significativa em relação a testemunha (T). Em contrapartida, para a concentração de  $1 \times 10^9$  UFC/ml (RS9), foi observada diferença em nível de significância de 5% com relação ao T (Figura 6, Tabela 4).



**Figura 5:** Avaliação de concentração da linhagem de *Ralstonia pseudosolanacearum* IBSBF 3228 em plântulas de tomate. Planta testemunha não-inoculada (T) e planta com sintomas de murcha, inoculada com a bactéria na concentração de  $1 \times 10^9$  UFC/mL (RS9).

**Tabela 4:** Severidade de sintomas em mudas de tomate inoculadas com duas concentrações de *R. pseudosolanacearum* IBSBF 3228.

Tratamentos	Severidade
Testemunha	0,0 b
10 <sup>8</sup>	1,6 ab
10 <sup>9</sup>	5,0 a



**Figura 6:** Verificação da severidade da doença em mudas de tomate após inoculação de *Ralstonia pseudosolanacearum* IBSBF-3228 em duas concentrações. RS8 –  $1 \times 10^8$  UFC/mL, RS9 –  $1 \times 10^9$  UFC/mL, T-testemunha (água esterilizada).

### 5.6 Bacteriófagos na prevenção de murcha bacteriana

Neste ensaio, bactéria e fago foram inoculados nas plantas de tomate, um em seguida do outro. O controle positivo, inoculado somente com a bactéria, apresentou sintomas a partir do décimo dia e permitiu que o ensaio fosse avaliado. De sete preparações de bacteriófagos (F1 a F7) duas resultaram em redução significativa da doença (Tabela 5).

A preparação de fago F2 preveniu o aparecimento de sintomas de murcha bacteriana em 100% e a preparação F3, reduziu em 80,11% (Figura 7). As demais preparações também reduziram o aparecimento de murcha, porém o teste estatístico utilizado não apontou diferença significativa.

**Tabela 5:** Efeito de preparações de bacteriófagos na redução da severidade de sintomas em plantas de tomate inoculadas com *R. pseudosolanacearum*. As médias foram comparadas por teste de Duncan.

Tratamentos	Média <sup>1</sup>	Redução do aparecimento de sintomas murcha (%)
Testemunha	0,00 b	-
Controle Positivo	3,57 a	-
F1	0,00 b	100
F2	1,85 ab	48,17
F3	0,71 b	80
F4	1,42 ab	60,22
F5	2,00 ab	43,97
F6	1,42 ab	60,22
F7	1,28 ab	35,85

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5%.



**Figura 7:** Redução da severidade de sintomas causados por *R. pseudosolanacearum* IBSBF 3228 pelo tratamento com a preparação de bacteriófago F2 (vaso à direita).

Embora coquetéis de bacteriófagos sejam recomendados para prevenir o problema da resistência bacteriana, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os bacteriófagos individualmente. Idealmente, esses coquetéis contêm bacteriófagos variados com diferentes especificidades de hospedeiro, mecanismos de replicação e/ou ciclos de infecção

(GILL; ABEDON, 2003). Exemplo disso foi o estudo em que um coquetel de seis bacteriófagos líticos foi aplicado no solo, resultando na redução da incidência de murcha bacteriana em cerca de 10-20% (KALPAGE; DE COSTA, 2014). Todavia, já foi demonstrado que um coquetel de bacteriófagos não resolve necessariamente o problema de resistência (FUJIWARA et al., 2011). Um método alternativo de controle seria utilizar variantes de um único bacteriófago altamente lítico em vez de um coquetel. Dessa forma, as células bacterianas podem não ser completamente eliminadas, mas um estado sustentável de coexistência fago-bactéria poderia ser mantido (ADAMS, 2009).

No presente trabalho foi possível observar o efeito das preparações de bacteriófagos F1 e F3 em prevenir ou reduzir os sintomas de murcha bacteriana. Porém, a literatura mostra que outros efeitos também poderiam ser observados. Um exemplo é o bacteriófago filamentosso  $\Phi$ RSS1, que alterou o comportamento da bactéria hospedeira, aumentando a patogenicidade bacteriana (ADDY et al., 2012; YAMADA et al., 2007). Além disso, alguns bacteriófagos podem transportar genes de resistência a antibióticos ou de virulência (SHOUSA et al., 2015; TANG et al., 2024). Desta forma, é importante conhecer detalhadamente os efeitos dos bacteriófagos sobre a bactéria alvo, antes de considerar sua aplicação como agentes de controle biológico.

Por outro lado, as funções biológicas dos bacteriófagos, como a detecção, reconhecimento e ligação a hospedeiros suscetíveis, também são afetadas por fatores abióticos. Esses fatores incluem dessecação, temperatura, radiação UV, disponibilidade de nutrientes e minerais no solo, além do pH (ENEBE; ERASMUS, 2024; FIERER, 2017; HALAWA, 2023). Ainda, autores afirmam que a diversidade de plantas, o uso e heterogeneidade temporal e espacial do solo, a distribuição da comunidade bacteriana (GÓMEZ et al., 2015; LIANG et al., 2019; LIAO et al., 2022), bem como as modificações estruturais emergentes nas células hospedeiras, também influenciam na capacidade de infecção pelos bacteriófagos (KOSKELLA; BROCKHURST, 2014). Variáveis que podem ter ocorrido no presente trabalho, ocasionando pouca ou nenhuma eficiência no controle de *R. pseudosolanacearum*.

### **5.7 Precipitação, extração de DNA e sequenciamento dos bacteriófagos**

A extração e purificação de DNA utilizando cloreto de zinco foi a que apresentou os melhores resultados. Utilizando o *Nanodrop*, verificou-se que as concentrações

de DNA extraídos de bacteriófagos variaram entre 11,60 ng/μL e 29 ng/μL, dos fagos F5 e F2 respectivamente (Tabela 6).

**Tabela 6:** Concentrações de DNA extraído a partir das amostras de bacteriófagos utilizando cloreto de zinco.

Amostras	ng/μL
F1	27,90
F2	29,84
F3	20,68
F4	17,87
F5	11,60

Os DNAs extraídos das cinco amostras de bacteriófagos foram agrupados e sequenciados em uma “*flow cell*” de *MinION*. Foram obtidas 1.704.350 sequências com tamanho médio de 962 pb, correspondendo a um total de 1.640 Mbp (1,64 bilhões de pares de bases) sequenciadas.

Por meio do programa *Phaster*, foi possível detectar a presença de sequências com similaridade aos bacteriófagos RSY1, RSS0 e RS138 de *R. solanacearum*. A análise taxonômica das sequências pelo programa *Kraken2* identificou 27.393 sequências potencialmente de origem viral, dentre as quais um grande número com similaridade a sequências de bacteriófagos de *R. solanacearum* como RSA1, RSY1 e RsoM1USA (família *Myoviridae*, gênero *Aresaunavirus*) (ADDY; AHMAD; HUANG, 2019; ASKORA et al., 2017; FUJIWARA et al., 2008); GP4 (família *Podoviridae*, gênero indeterminado) (ZHENG et al., 2022); RS138 (família *Siphoviridae*, gênero indeterminado) (VAN TRUONG THI et al., 2016); RS603 e RSS1 (família *Inoviridae*, gênero *Restivirus*) (ADDY et al., 2012a; VAN et al., 2014), p12J, RS611, RSS0, RSS20, RSS30 e RSS-TH (família *Inoviridae*, gênero indeterminado). Entretanto, diversas linhagens de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* contêm esses bacteriófagos incorporados em seus genomas e este parece também ser o caso para a linhagem IBSBF-3228. Estas sequências com similaridade a bacteriófagos têm como origem, provavelmente, o DNA genômico bacteriano que deveria estar presente em altas proporções junto ao DNA purificado dos bacteriófagos.

De fato, utilizando o programa *Flye*, de montagem de genomas a partir de sequências longas, foram obtidos 16 *contigs/scaffolds* que somados atingem um total de 5.764.413 bp, valor dentro da faixa reportada para o genoma completo de outras linhagens de *R. solanacearum* já sequenciadas (5,1 a 6,5 Mbp) (Tabela 7).

**Tabela 7:** *Contigs* e *scaffolds* obtidos pela montagem das sequências com o programa *Flye*.

<b>Contig</b>	<b>Tamanho (bp)</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Circular</b>	<b>Presença de sequências repetitivas</b>
contig_1	1.517.276	290	N	N
scaffold_2	1.075.497	302	N	N
contig_5	991.152	287	N	N
contig_4	962.937	293	N	N
contig_7	606.364	280	N	N
contig_3	369.073	304	N	N
contig_20	189.960	294	N	N
contig_21	18.768	559	N	Y
contig_24	13.052	520	N	Y
contig_25	8.733	711	Y	Y
contig_17	4.474	290	N	Y
contig_22	2.863	297	N	Y
contig_11	1.530	121	N	N
contig_10	1.157	87	N	N
contig_15	848	97	N	Y
contig_18	729	192	N	N
<b>Total</b>	<b>5.764.413</b>			

As sequências de bacteriófagos detectadas pelo programa Kraken2 estão presentes em diferentes segmentos destes *contigs*, confirmando serem de profagos incorporados ao genoma bacteriano. Uma exceção foi o *contig* 25, de 8.733 bp, de natureza circular e com maior nível de cobertura de sequenciamento, que apresentou segmento de cerca de 1.000 bp com similaridade de até 88% com bacteriófagos filamentosos da família Inoviridae, como RSS-TH1 e RSS1, e com os plasmídeos pJTSP1 e RS-N. O plasmídeo pJTSP1 está associado à

avirulência de *R. solanacearum* (SHIMIZU et al., 1999), enquanto o fago RSS1 acentua a virulência desta bactéria (ADDY et al., 2012).

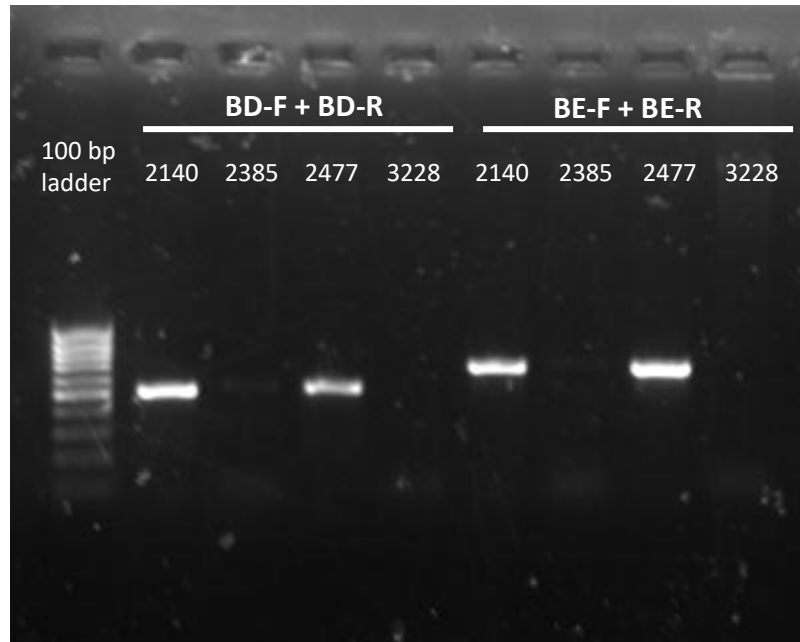
Por meio de *Megablast* na base de dados do NCBI, foi observado que sequências praticamente idênticas (99,89% de similaridade) ao *contig 25* estão incorporadas nos genomas de cinco linhagens de *R. solanacearum* cujos genomas foram sequenciados completamente: CFBP 8695 (batata, Irã), RS 489 (tomate, Brasil), RS 488 (tomate, Brasil), UY031 (batata, Uruguai) e UW72 (batata, Grécia).

Interessantemente, a análise por *Megablast* das sequências da região espaçadora 16S-23S dos isolados de *R. solanacearum* utilizados neste estudo mostraram 100% de similaridade de IBSBF 2140 e 2477 com as linhagens UY031 (Uruguai) e UW72 (Grécia). Desta forma, levantou-se a hipótese de que o *contig 25* corresponde a um fago da família Inoviridae que se encontrava inativo e incorporado aos genomas dos isolados IBSBF 2140 e/ou 2477 e que, durante o processo de isolamento dos bacteriófagos a partir do material de compostagem, solo e batata, foi ativado e passou a infectar o isolado IBSBF 3228. Lembrando que no processo de isolamento dos bacteriófagos, foi utilizada mistura dos quatro isolados bacterianos, visando aumentar as chances de sucesso. Este fago recebeu aqui a denominação de RPSI-IB01 (*Ralstonia pseudosolanacearum* Inoviridae – Instituto Biológico 01).

Uma característica dos bacteriófagos da família Inoviridae é o fato de não serem líticos, com as partículas virais sendo produzidas por montagem na superfície bacteriana. As supostas placas de lise observadas no processo de isolamento do fago, eram provavelmente somente regiões de crescimento bacteriano mais lento.

A PCR utilizando primers para confirmação do profago inserido no genoma foi positiva para as linhagens IBSBF 2140 e 2477 (Figura 8).





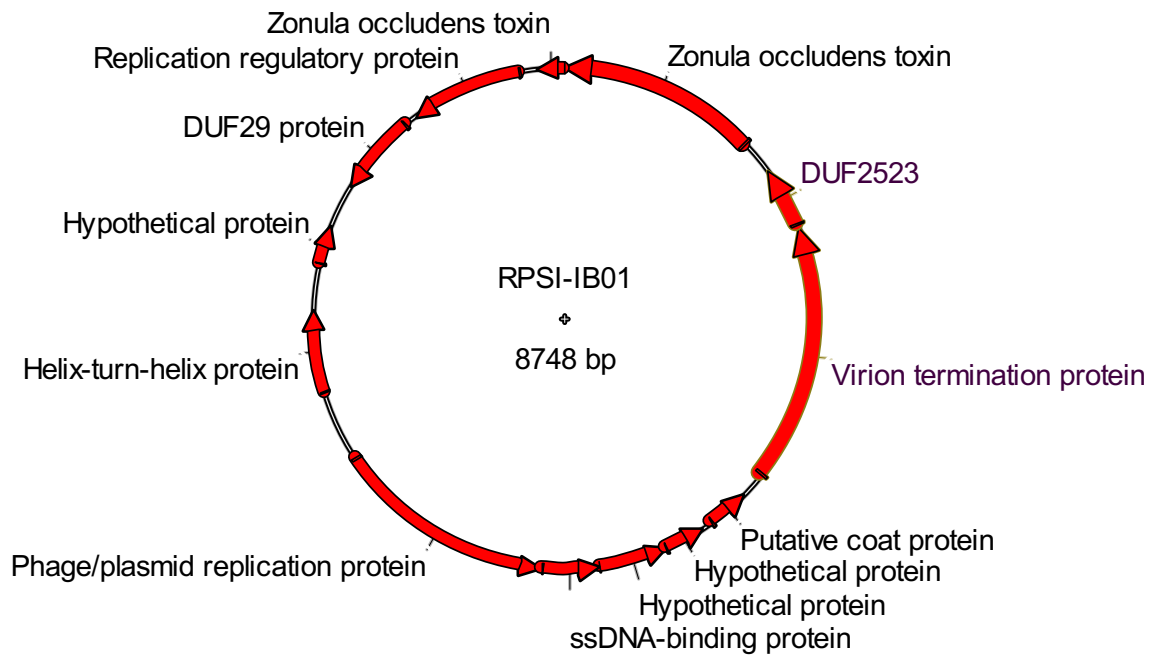
**Figura 8:** Confirmação da presença do fago RPSI-IB01 incorporado nos genomas das linhagens IBSBF 2140 e 2477 de *Ralstonia solanacearum*, por PCR.

A comparação da sequência do fago RPS-IB01 com as sequências incorporadas aos genomas de linhagens que foram completamente sequenciadas, indicou a necessidade de correções, principalmente inserções de nucleotídeos. Isto se deve provavelmente à tendência ao erro do sequenciamento na plataforma MinION em regiões homopoliméricas (com o mesmo nucleotídeo repetido várias vezes). Essas correções foram realizadas manualmente a fim de obter as ORFs contínuas e, após as correções, o genoma do fago passou a ser constituído por 8.748 nt. Entretanto, ainda há necessidade de confirmação desse tamanho por meio de sequenciamento pelo método de Sanger.

A análise das regiões codificadoras de RPSI-IB01, permitiu a observação de 12 possíveis ORFs, das quais 10 apresentaram similaridade com genes descritos em outros bacteriófagos (Tabela 8) (Figura 9).

**Tabela 8:** Possíveis ORFs encontradas no genoma do fago RPSI-IB01

<b>Descrição do gene</b>	<b>Posição no genoma</b>	<b>Outros bacteriófagos ou plasmídeos com genes semelhantes</b>	<b>Maior similaridade (%) / Cobertura(%)</b>
Zonula occludens toxin/extrusion of phage particles/pI	rev:8593..1119	Vf33 (Vibrio)	45/58
DUF2523	rev:1310..1654	Vf33 (Vibrio)	40/71
Virion termination protein/pIII	rev:1664..3121	RS611, RS603, RSIBR3, NP2014	69/26
Putative coat protein	rev:3268..3504	Silver pheasant (swab cloacal), V5 (Vibrio)	50/58
Hypothetical protein	rev:3559..3792		
Putative minor coat protein	rev:3792..4178	p12J, RSM3, RSM1, RS603, PE226, Rs551	43/80
ssDNA-binding protein/pV	rev:4178..4504	If1 (E. coli)	32/87
Phage/plasmid replication protein/pII	rev:4514..5743	Somente incorporado no genoma bacteriano	100/100
Helix-turn-helix protein	6144..6611	RSS20, RSS-TH1, RSS30, RSBg, RSS0, RS611	64/100
Hypothetical protein	6872..7090		
DUF29 protein	rev:7338..7796	RSS0, RSBg, RSS-TH1	94/94
Replication regulatory protein	rev:7865..8497	RSS-TH1, RSS0, RSBg, pJTPS1, p12J	58/91

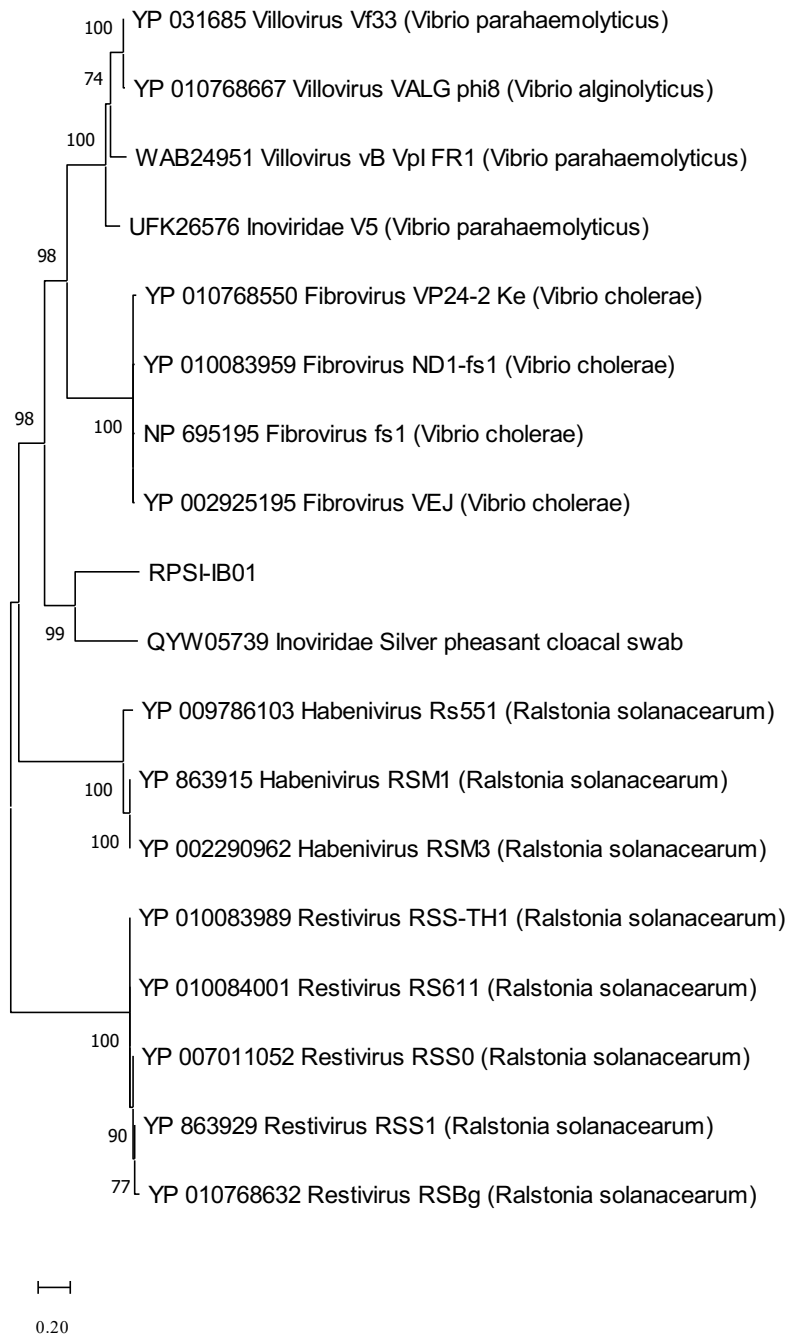


**Figura 9:** Mapa do bacteriófago RPSI-IB01 com suas ORFs putativas

Uma busca por profagos incorporados nos genomas de 120 linhagens do complexo de espécies *R. solanacearum* completamente sequenciadas encontraram 49 bacteriófagos completos dentre 379 elementos semelhantes a profagos (GONÇALVES et al., 2021). Desses, 29 profagos pertenciam à família Inoviridae, sendo 15 pertencentes a novas espécies putativas. Entretanto, apesar das linhagens CFBP 8695, RS 489, RS 488, UY031 e UW72, com fago RPSI-IB01 incorporado em seus genomas, terem sido incluídas nesse levantamento, a metodologia utilizada não permitiu sua detecção. Isso se deve ao fato do programa PHASTER, utilizado no estudo, não reconhecer a sequência do RPSI-IB01 como sendo um fago.

Dentre os bacteriófagos da família Inoviridae, somente a proteína pI, responsável pela montagem e exportação dos vírions, se destaca como sendo altamente conservada e característica para o grupo (HAY; LITHGOW, 2019). Esta proteína possui um domínio conservado N-terminal denominado Zonula occludens toxin (Zot), devido ao papel na virulência de linhagens de *Vibrio cholerae* que carregam o fago CTX. Porém, esse domínio não é o responsável pela toxicidade, mas sim a região C-terminal não-conservada da proteína. Apesar disso, a denominação desta proteína como Zonula occludens toxin tem sido propagada nas anotações dos genomas dos bacteriófagos Inoviridae, resultando inclusive na suposição errônea de uma toxicidade de qualquer fago que a possua.

O fato da proteína pI ser conservada na família Inoviridae, permite que seja utilizada como base para a classificação de bacteriófagos deste grupo (HAY; LITHGOW, 2019). A árvore filogenética construída com sequências desta proteína dos bacteriófagos mais semelhantes ao RPSI-IB01, agrupou-o a um fago presente em *swab* cloacal de faisão prateado da China, separadamente de outros clados de bacteriófagos de *Vibrio* e *Ralstonia* (Figura 10). Essa elevada divergência em relação a outros bacteriófagos conhecidos provavelmente explica o fato de não ser reconhecido pelos programas *Phaster* e *Phastest*.



**Figura 10:** Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining com sequências da proteína pI de bacteriófagos da família Inoviridae.

## 6. CONCLUSÕES

- Bacteriófagos foram obtidos a partir de dez amostras de solo e batata infectados por *Ralstonia solanacearum*;

- O sequenciamento de uma mistura de DNAs extraídos de cinco preparações destes bacteriófagos permitiu a identificação de somente uma espécie não descrita de bacteriófago da família Inoviridae, denominado RPSI-IB01;
- O emprego de mistura de quatro linhagens de bactérias do complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* e *Ralstonia pseudosolanacearum* para o isolamento dos bacteriófagos pode ter resultado na ativação de profago presente nas linhagens IBSBF 2140 e 2477 que passou a infectar a linhagem 3288;
- Ensaio de controle biológico demonstraram eficácia no uso de duas preparações de bacteriófagos para o controle de murcha bacteriana causada por *R. pseudosolanacearum* em plântulas de tomate.

## REFERÊNCIAS

- ABEDON, S. T. et al. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 66–85, 2011.
- ACKERMANN, H. W. Bacteriophage classification. Em: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. (Eds.). **Bacteriophages: Biology and Applications**. Boca Raton - FL: CRC Press, 2005. p. 169–187.
- ACKERMANN, H. W. Phage classification and characterization. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 501, p. 127–140, 2009.
- ADAMS, H. T. Contemporary trends in bacteriophage research. **Nova Science Publishers**, 2009.
- ADAMS, M. H. **Bacteriophages**. New York: Interscience Publishers, 1959.
- ADDY, H. S. et al. The Filamentous Phage  $\phi$ RSS1 Enhances Virulence of Phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on Tomato. **Bacteriology**, v. 102, n. 3, p. 244–251, 2012.
- ADDY, H. S.; AHMAD, A. A.; HUANG, Q. Molecular and biological characterization of ralstonia phage RsoMIUSA, a new species of P2virus, isolated in the United States. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- AHMAD, A. A. et al. Molecular and biological characterization of  $\phi$ Rs551, a filamentous bacteriophage isolated from a race 3 biovar 2 strain of *Ralstonia solanacearum*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, 2017.
- AHMAD, A. A.; ADDY, H. S.; HUANG, Q. Biological and Molecular Characterization of a Jumbo Bacteriophage Infecting Plant Pathogenic *Ralstonia solanacearum* Species Complex Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.
- ALLEN, H. K. et al. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 3, p. 114–119, 2013.
- ÁLVAREZ, B.; BIOSCA, E. G. Bacteriophage-based bacterial wilt biocontrol for an environmentally sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.
- ÁLVAREZ, B.; LÓPEZ, M. M. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. Em: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. 2. ed. Valencia, Espanha: Formatex Research Center, 2010. v. 1p. 267–279.
- ÁLVAREZ, B.; LÓPEZ, M. M.; BIOSCA, E. G. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. **Microbiology (Reading, England)**, v. 154, n. Pt 11, p. 3590–3598, 2008.

ÁLVAREZ, B.; LÓPEZ, M. M.; BIOSCA, E. G. Biocontrol of the Major Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* in Irrigation Water and Host Plants by Novel Waterborne Lytic Bacteriophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

ALVI, I. A. et al. Storage of bacteriophages at 4°C leads to no loss in their titer after one year. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 50, n. 6, p. 2395–2398, 2018.

ASKORA, A. et al. Lysogenic conversion of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* by the P2virus  $\Phi$ RSY1. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

BALOGH, B. et al. Improved Efficacy of Newly Formulated Bacteriophages for Management of Bacterial Spot on Tomato. **Plant Dis.**, v. 87, p. 949–954, 2003.

BARROW, P. A.; SOOTHILL, J. S. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. **Trends in microbiology**, v. 5, n. 7, p. 268–271, 1997.

BIOSCA, E. G.; GONZÁLEZ, M. M. L.; ORTEGA, M. B. A. Method for the prevention and/or the biological control of wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, via the use of bacteriophages suitable for this purpose and compositions thereof. **IVIA**, p. 10–11, 2016.

BUTTNER, C. et al. Bacteriophages and bacterial plant diseases. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

CAMARGO, A. M. M. P. et al. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA AGROINDUSTRIAL DO TOMATE. **Informações econômicas**, v. 36, n. 6, p. 53–65, 2006.

CAO, Y. et al. Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

CASTILLO, D. et al. Bacteriophage Resistance Mechanisms in the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*: Linking Genomic Mutations to Changes in Bacterial Virulence Factors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 1157, 2015.

CONAB. Tomate: Análise dos Indicadores da Produção e Comercialização no Mercado Mundial, Brasileiro e Catarinense. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 21, 2019.

XAVIER, A. S.; et al. Genomic and biological characterization of a new member of the genus Phikmvvirus infecting phytopathogenic *Ralstonia* bacteria. **Archives of Virology**, v. 163, n. 12, p. 3275–3290, 2018.

DE ALMEIDA, J. C. F. et al. Genomic and Biological Characterization of *Ralstonia solanacearum* Inovirus Brazil 1, an Inovirus that Alters the Pathogenicity of the Phytopathogen *Ralstonia pseudosolanacearum*. **Microbial Ecology**, v. 84, n. 2, p. 527–538, 2022.

DIDELOT, X. et al. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 9, p. 601–612, 2012.



DION, M. B.; OECHSLIN, F.; MOINEAU, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 125–138, 2020.

ELHALAG, K. et al. Potential use of soilborne lytic Podoviridae phage as a biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 658–669, 2018.

ELPHINSTONE, J. The Current Bacterial Wilt Situation: A Global View. Em: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex**. 1. ed. St. Paul: Amer Phytopathological Society, 2005. v. 1, p. 9–28.

EL-SHIBINY, A.; EL-SAHHAR, S. Bacteriophages: the possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. **Canadian journal of microbiology**, v. 63, n. 11, p. 865–879, 2017.

EMBRAPA. **Como plantar tomate de mesa**. Acesso em: 5 abr. 2024.

ENEBE, M. C.; ERASMUS, M. Disease suppression in plants: A perspective on the impact of phage-directed soil fertilization in enhancing soil health and sustainability. **Biological Control**, v. 188, p. 105429, 2024.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? Em: ALLEN, C. P. P. H. A. C. (Ed.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. APS Press ed. Sr Paul: Phytopathological Society, 2005. p. 449–461.

FIERER, N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 579–590, 2017.

FRENCH, E. R. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in Potato: Specificity and Temperature Sensitivity. **Phytopathology**, v. 72, n. 11, p. 1408, 1982.

FUJIWARA, A. et al. Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* phage  $\phi$ RSA1 and its related prophage ( $\phi$ RSX) in strain GMI1000. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 1, p. 143–156, 2008.

FUJIWARA, A. et al. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4155–4162, 2011.

GAMACHU, S. B.; DEBALO, M. Review of bacteriophage and its applications. **International Journal of Veterinary Science and Research**, v. 8, n. 3, p. 133–147, 2022.

GILL, J.; ABEDON, S. T. Bacteriophage Ecology and Plants. **APSnet Feature Articles**, 2003.

GÓMEZ, P. et al. The Impact of Resource Availability on Bacterial Resistance to Phages in Soil. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.

GONÇALVES, O. S. Widespread distribution of prophages signaling the potential for adaptability and pathogenicity evolution of *Ralstonia solanacearum* species complex. **Genomics**, v. 113, n. 3, p. 992-1000, 2021.

GRACE, E. R. et al. Seeing the forest for the trees: Use of phages to treat bacterial tree diseases. **Plant Pathology**, v. 70, n. 9, p. 1987–2004, 2021.

HALAWA, E. M. Challenges of bacteriophages application in controlling bacterial plant diseases and how to overcome them. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2023.

HANLON, G. W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International journal of antimicrobial agents**, v. 30, n. 2, p. 118–128, 2007.

HARADA, L. K. et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological research**, v. 212–213, p. 38–58, 2018.

HAY, I. D.; LITHGOW, T. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. **EMBO reports**, v. 20., n. 6, 2019.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. Em: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and the causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. 1. ed. Willingford: CAB International, v. 1p. 9–24, 1994.

HE, L. Y.; ET AL. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. **Plant. Disease**, v. 67, p. 1357–1361, 1983.

HOLTAPPELS, D. et al. The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 68, p. 60–71, 2021.

HONEYCUTT, R. J.; SOBRAL, B. W. S.; MCCLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 141, n. 12, p. 3229–3239, 1995.

HUET, G. Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Estatística da Produção Agrícola**. 2023.

IRIARTE, F. B. et al. Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1704–1711, 2007.

IRIARTE, F. B. et al. Soil-based systemic delivery and phyllosphere in vivo propagation of bacteriophages. **Bacteriophage**, v. 2, n. 4, 2012.

JAKOČIŮNĚ, D.; MOODLEY, A. A Rapid Bacteriophage DNA Extraction Method. **Methods and Protocols**, v. 1, n. 3, p. 27, 2018.

KALPAGE, M. D.; DE COSTA, D. M. Isolation of Bacteriophages and Determination of their Efficiency in Controlling *Ralstonia solanacearum* Causing Bacterial Wilt of Tomato. **Tropical Agricultural Research**, v. 26, n. 1, p. 140-151, 2014.

KEMPE, J. Biological Control of Bacterial Wilt of Potatoes: Attempts to Induce Resistance by Treating Tubers with Bacteria. **Plant Disease**, v. 67, n. 5, p. 499, 1983.

KIM, S. G. et al. Evaluation of Resistance to *Ralstonia solanacearum* in Tomato Genetic Resources at Seedling Stage. **The Plant Pathology Journal**, v. 32, n. 1, p. 58, 2016.

KISAND, V.; LETTIERI, T. Genome sequencing of bacteria: Sequencing, de novo assembly and rapid analysis using open source tools. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2013.

KOSKELLA, B.; BROCKHURST, M. A. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. **FEMS microbiology reviews**, v. 38, n. 5, p. 916–931, 2014.

KUTATELADZE, M.; ADAMIA, R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. **Trends in biotechnology**, v. 28, n. 12, p. 591–595, 2010.

LAANTO, E. et al. Phage-driven loss of virulence in a fish pathogenic bacterium. **PLoS one**, v. 7, n. 12, 2012.

LIANG, X. et al. Viral abundance and diversity vary with depth in a southeastern United States agricultural Ultisol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 137, 2019.

LIAO, H. et al. Response of soil viral communities to land use changes. **Nature Communications** 2022 13:1, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2022.

LOPES, C. A. Murcha Bacteriana ou Murchadeira-Uma Inimiga do Tomateiro em Climas Quentes Importância da Doença. **Embrapa Hortaliças**, 2009.

LOPEZ, M. M.; BIOSCA, E. G. Potato bacterial wilt management: new prospects for an old problem. Em: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex**. Saint Paul, MN: APS Press, 2005. p. 205–224.

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

MALLMANN, W. L.; HEMSTREET, C. J. Isolation of an inhibitory substance from plants. **J. Agric. Res.**, p. 599–602, 1924.

MASSOL-DEYA, A. A. et al. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16–23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). **Molecular Microbial Ecology Manual**, p. 289–296, 1995.

MEADEN, S.; KOSKELLA, B.; MOYA, A. Exploring the risks of phage application in the environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.

MIHARA, T. et al. A *Ralstonia solanacearum* phage  $\phi$ RP15 is closely related to Viunalikeviruses and encodes 19 tRNA-related sequences. **Virology Reports**, v. 6, p. 61–73, 2016.

MINA, I. R. et al. The critical role of biofilms in bacterial vascular plant pathogenesis. **Plant Pathology**, v. 68, n. 8, p. 1439–1447, 2019.

MOORE, E. S. D’Herelle’s bacteriophage in relation to plant parasites. **South African Journal of Science**, v. 23, 1926.

MURUGAIYAN, S. et al. Characterization of filamentous bacteriophage PE226 infecting *Ralstonia solanacearum* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 296–303, 2011.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P. et al. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. **Frontiers in Public Health**, v. 4, 2016.

OECHSLIN, F. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. **Viruses**, v. 10, n. 7, 2018.

PAUDEL, S. et al. Taxonomy and Phylogenetic Research on *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. **Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 1–26, 2020.

PERTICS, B. Z.; KOVÁCS, T.; SCHNEIDER, G. Characterization of a Lytic Bacteriophage and Demonstration of Its Combined Lytic Effect with a K2 Depolymerase on the Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain 52145. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 669, 2023.

PHILIPSON, C. W. et al. Characterizing Phage Genomes for Therapeutic Applications. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 188, 2018.

PINHEIRO, C. R. et al. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto a filotipos e sequevares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 6, p. 593–602, 2011.

PIRNAY, J. P. et al. Introducing yesterday’s phage therapy in today’s medicine. **Future Virology**, v. 7, n. 4, p. 379–390, 2012.

PRIOR, P. et al. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2016.

QADIR, M. I.; MOBEEN, T.; MASOOD, A. Phage therapy: progress in pharmacokinetics. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, 2018.

RAMSUBHAG, A. et al. Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains affecting tomato in Trinidad, West Indies. **Plant Pathology**, v. 61, n. 5, p. 844–857, 2012.

ROGOVSKI, P. et al. Uses of Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

RØRBO, N. et al. Exploring the Effect of Phage Therapy in Preventing *Vibrio anguillarum* Infections in Cod and Turbot Larvae. **Antibiotics**, v. 7, n. 2, p. 42, 2018.

SAFNI, I. et al. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3087–3103, 2014.

SALAS, F. J. S.; TÖFOLI, J. G. **Cultura da Batata: Pragas e Doenças**. 1. ed. São Paulo: Instituto Biológico, 2017.

SANCHEZ PEREZ, A. et al. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. **Plant Pathology**, v. 57, n. 2, p. 320–331, 2008.

SHIMIZU, R. et al. Structural Analysis of a Putative Hypovirulent Plasmid, pJTSP1, Found in a Spontaneous Avirulent Mutant of *Ralstonia solanacearum*. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.**, v. 65, p. 184–188, 1999.

SHOUSHA, A. et al. Bacteriophages isolated from chicken meat and the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 14, p. 4600–4606, 2015.

SIEIRO, C. et al. A Hundred Years of Bacteriophages: Can Phages Replace Antibiotics in Agriculture and Aquaculture?. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 493, 7 ago. 2020.

SILVA, L. O. P. DA; NOGUEIRA, J. M. DA R. Use of bacteriophages as an alternative in the control of bacterial infections. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, 2022.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649–659, 2001.

TANJI, Y. et al. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 270–274, 2004.

TROTTEREAU, A. et al. High genomic diversity of novel phages infecting the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*, isolated in Mauritius and Reunion islands. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021.

UMRAO, P. D.; KUMAR, V.; KAISTHA, S. D. Biocontrol potential of bacteriophage  $\phi$ sp1 against bacterial wilt-causing *Ralstonia solanacearum* in Solanaceae crops. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, 2021.

VAN, T. T. B. et al. Genomic characterization of  $\phi$ RS603, a filamentous bacteriophage that is infectious to the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. **Microbiology and immunology**, v. 58, n. 12, p. 697–700, 2014.

VAN TRUONG THI, B. et al. Genomic characterization of *Ralstonia solanacearum* phage  $\phi$ RS138 of the family Siphoviridae. **Archives of virology**, v. 161, n. 2, p. 483–486, 2016.

VIVAS, R. et al. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. **Microb. Drug. Resist.**, v. 25, n. 6, p. 890–908, 2019.

WAGEMANS, J. et al. Going Viral: Virus-Based Biological Control Agents for Plant Protection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 60, n. 1, p. 21–42, 2022.

WEI, C. et al. Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. **Virol. Sinin.**, v. 32, n. 6, p. 476–484, 2017.

WENDLING, C. C. et al. Tripartite species interaction: eukaryotic hosts suffer more from phage susceptible than from phage resistant bacteria. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.

WICKER, E. et al. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 6790–6801, 2007.

WITTEBOLE, X.; DE ROOCK, S.; OPAL, S. M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 226–235, 2014.

WOLFF, J. L. C. **Isolamento de bacteriófagos visando a sua aplicação no controle de fitopatógenos. Instituto Presbiteriano Mackenzie**, 2016.

YAMADA, T. et al. New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. **Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 2630–2639, 2007.

YAMADA, T.; YAMADA, T. Bacteriophages of *Ralstonia solanacearum*: Their Diversity and Utilization as Biocontrol Agents in Agriculture. **Bacteriophages**, 2012.

YULIAR; ASI NION, Y.; TOYOTA, K. Recent Trends in Control Methods for Bacterial Wilt Diseases Caused by *Ralstonia solanacearum*. **Microbes and Environments**, v. 30, n. 1, p. 1–11, 2015.

ZHENG, J. et al. A Capsid Structure of *Ralstonia solanacearum podoviridae* GP4 with a Triangulation Number  $T = 9$ . **Viruses**, v. 14, n. 11, 2022.

ZOHOUNGBOGBO, H. et al. Evaluation of Resistance Sources of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to Phylotype I Strains of *Ralstonia solanacearum* Species Complex in Benin. **Agronomy**, v. 11, n. 8, p. 1513, 2021.