

FERNANDA PEREIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE UM
BACTERIÓFAGO ESPECÍFICO PARA *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV.
*CAMPESTRIS***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586c
2015
Silva, Fernanda Pereira da, 1986-
Caracterização biológica e molecular de um bacteriófago
específico para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* /
Fernanda Pereira da Silva. – Viçosa, MG, 2015.
viii, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Poliane Alfenas Zerbini.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Xanthomonas campestris*. 2. Bactérias fitopatogênicas.
3. Controle biológico. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em
Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.26

FERNANDA PEREIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE UM
BACTERIÓFAGO ESPECÍFICO PARA *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV.
*CAMPESTRIS***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2015.

José Rogério de Oliveira

Sérgio Oliveira de Paula

Poliane Alfenas Zerbini

(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade e à Capes pelo apoio financeiro;

A minha orientadora Poliane Alfenas Zerbini pela orientação, confiança e amizade;

Assim, como aos meus co-orientadores e conselheiros, Prof^a. Marisa Vieira de Queiroz, Prof. Eduardo S. G. Mizubuti, Prof. José Rogério de Oliveira, Prof. Sérgio Oliveira de Paula e Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior, pelo auxílio e valiosas sugestões na condução e finalização deste trabalho;

Aos professores e funcionários do departamento de Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos disponibilizados e amizade; Em especial a secretária Nilcéia, pela agilidade, simpatia e carinho.

Ao Prof. Murilo Zerbini Junior e Acelino Couto Alfenas, por permitir a utilização dos laboratórios de Virologia Vegetal Molecular e de Patologia Florestal respectivamente;

Wagner, Karla e Gilmar pela disponibilidade e colaboração durante as atividades realizadas no núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV;

Ao Lívio e a Nilmara pela disponibilidade e material cedidos.

Aos profissionais do BIOAGRO, Rita (técnica de laboratório), Danilo (almoxarifado), Paulo (autoclave), Paulo (portaria), Maria (limpeza), Hugo (técnico), Evandro (técnico) e Camila (técnica) pelos serviços atendidos e momentos agradáveis.

Às “meninas da Poli”, Laiane e Lina (02), por todos os momentos tensos, engraçados e inesquecíveis de estudos. Espero que sigam bem nas novas jornadas.

Ao amigo e parceiro de laboratório André, por tanta disposição, paciência e cuidado. “*Só digo isso*”: Que Deus possa retribuir suas boas ações “*Enff*”. Assim como aos colegas de laboratório, Fernandinha, Flávia, Ana Paula, Marcos, Chaiane e Diego pela troca de experiência e auxílio.

Aos colegas de todos os laboratórios do BIOAGRO e de disciplinas, pela aprendizagem, colaboração e “cafezinhos” em conjunto.

Ao meu namorado Kenner, pela sensatez, alegria e apoio constantes;

Aos antigos professores (graduação/UNEMAT), que instigaram o desejo de atuar na pesquisa e docência.

Aos familiares e amigos de Cuiabá, Tangará da Serra, Campo Novo, Juína Governador Valadares e Umuarama, pelo carinho e apoio mesmo distantes.

Aos amigos das “resenhas caseiras”, pelos risos e momentos de família;

Em especial aos meus pais, Dijanira Z. Pereira da Silva, Manoel Pereira (*in memória*) e Miguel de Souza Magalhães, pela compreensão, força e amor incondicional.

Ao meu irmão Danilo e sua família pelo apoio, incentivos e suporte.

E acima de tudo, a Deus e Nossa Senhora de Aparecida, pela graça de tornar esse sonho real.

INDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. CLASSIFICAÇÃO DOS VÍRUS QUE INFECTAM PROCARIOTOS	4
1.2. BACTERÍOFAGOS QUE INFECTAM BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS	5
1.3. USO DE BACTERÍOFAGOS PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS EM PLANTAS	6
1.4. XANTOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS (XCC).....	8
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE UM BACTERÍOFAGO ESPECÍFICO PARA XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS.	12
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Isolados de bactérias e condições de cultivo	16
Isolamento de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	16
Detecção de bacteriófagos.....	17
Purificação e caracterização de partículas virais	18
Titulação de bacteriófagos	19
Extração e caracterização de ácidos nucleicos	19
Susceptibilidade de isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ao bacteriófago	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
Isolamento de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	21
Detecção e isolamento de bacteriófagos	22
Caracterização do bacteriófago isolado.....	23
Susceptibilidade de isolados de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> à infecção pelo bacteriófago	25
AGRADECIMENTOS	28
TABELAS.....	29
LEGENDA DAS FIGURAS	31
FIGURAS.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CONCLUSÃO	37

RESUMO

SILVA, Fernanda Pereira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Caracterização biológica e molecular de um bacteriófago específico para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. Orientadora: Poliane Alfenas Zerbini. Co-orientadores: Marisa Vieira de Queiroz e Eduardo S. G. Mizubuti.

Os vírus que infectam bactérias são denominados bacteriófagos, sendo também referidos como “fagos”. Os bacteriófagos que infectam bactérias fitopatogênicas, tem despertado crescente interesse devido ao seu potencial para o biocontrole. A bactéria Gram negativa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, é o agente causal da podridão negra das brássicas (*Brassicaceae*), sendo responsável por perdas econômicas, resultantes do difícil controle. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar o isolamento e a caracterização biológica e molecular de bacteriófagos infectando *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Para isso, plantas da família *Brassicaceae* apresentando sintomas da podridão negra e solo rizosférico, foram coletados em campos de cultura em Coimbra-MG e triados para a presença de bacteriófagos adotando a técnica de formação de placas de lise por meio da sobrecamada de ágar. Das nove amostras analisadas, uma amostra apresentou placas de lise persistente nos quatro ciclos de propagação. O fago foi denominado ϕ Xacp1 e apresentou cabeça icosaédrica de aproximadamente 30 ± 5 nm de diâmetro e uma cauda curta com $6 \pm 0,2$ nm de comprimento e $7 \pm 0,2$ nm de diâmetro. O bacteriófago possui ácido nucleico composto por uma única molécula de DNA fita dupla (dsDNA) com tamanho estimado em 65 Kpb. De acordo com a morfologia e tipo de genoma, o bacteriófago ϕ Xacp1 foi classificado na família *Podoviridae* (Ordem *Caudovirales*). A sequência do genoma completo do fago está sendo analisada e será utilizada para estudar o relacionamento filogenético com outros bacteriófagos que infectam *Xanthomonas campestris*. O bacteriófago mostrou capacidade em infectar apenas isolados de *Xanthomonas*

campestris pv. *campestris* no teste de susceptibilidade, apresentando placas de lise com coloração, tamanho e formato padrão. Isolados bacterianos relacionados e não relacionados a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* não foram suscetíveis à infecção. Em conjunto esses resultados demonstram que ϕ Xacp1 apresentou características ideais de especificidade e virulência que motivam futuros estudos para sua utilização como uma ferramenta biotecnológica para a utilização no biocontrole da podridão negra em brássicas.

ABSTRACT

SILVA, Fernanda Pereira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Biological and molecular characterization of a bacteriophage specific for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. Adviser: Poliane Alfenas Zerbini. Co-adviser: Marisa Vieira de Queiroz and Eduardo S. G. Mizubuti.

Viruses that infect bacteria are termed bacteriophages, and also referred to as “phage”, or “bacteriovirus”. The bacteriophages that infect bacteria plant pathogens, has attracted increasing interest due to its potential for biocontrol. The gram-negative bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is causal agent of black rot of crucifers (*Brassicaceae*), accounting for economic losses resulting from difficult to control. This study had objective perform the isolation and molecular characterization of biological and bacteriophage infecting *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. For this, plants of the family *Brassicaceae* showing symptoms of black rot and rhizosphere soil were collected in crop fields in Coimbra-MG and screened for the presence bacteriophage adopting the technique of forming plaques by agar overlay. The analyzed nine samples, one sample showed signs of Persistent lysis in four cycles of the spread. The phage was named ϕ Xacp1 and icosahedral head showed approximately 30 ± 5 nm in diameter and a tail short- ± 5 nm in length and 0.7 ± 0.3 4 nm diameter. The bacteriophage has nucleic acid consists of a single double stranded DNA molecule (dsDNA) with size estimated at 65 kbp. According to the morphology and type of genome, bacteriophage ϕ Xacp1 scored in Podoviridae family (Order *Caudovirales*). The sequence the complete genome of the phage is being analyzed and will be used to study the phylogenetic relationships with other bacteriophages that infect *Xanthomonas campestris*. The bacteriophage showed ability to infect only *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in susceptibility testing, presenting plaques staining, size and pattern shape. Isolated bacterial related and unrelated to *Xanthomonas campestris*. Country were not susceptible to infection.

Together these results demonstrate that ϕ Xacp1 presented ideal characteristics of specificity and virulence that motivate future studies for its use as a biotechnological tool for use in biocontrol of black rot in crucifers.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os vírus são micro-organismos que infectam todos os organismos vivos. Os vírus que infectam bactérias são denominados bacteriófagos, sendo também referidos como “fagos” (Flint *et al.* 2009, Tortora *et al.* 2012). Os bacteriófagos são considerados as micro-organismos mais abundantes na Terra, podendo ser isolados a partir de diferentes ambientes, como esgoto, fezes, solo ou água (Haq *et al.* 2012). Contribuem de diversas maneiras nos diferentes ecossistemas, como por exemplo, atuando como agente mutagenico biológico (Gill *et al.* 2003, Haq, Chaudhry, Akhtar, Andleeb and Qadri 2012), e na determinação da diversidade microbiana de um determinado ecossistema (Orlova 2012).

A descoberta dos bacteriófagos deu-se com os trabalhos do bacteriologista Frederick Twort (1877-1950) na Inglaterra, e do microbiologista Felix d'Herelle (1873-1949) no Instituto Pasteur, na França (Abedon *et al.* 2011). Em 1915, Twort, pesquisando meios para o crescimento artificial de vírus, observou a formação de zonas claras em placas de cultivo de *Micrococcus*, que foi posteriormente denominada “glassy transformation”. Os trabalhos sugeriram que a causa desse fenômeno era um agente filtrável (Duckworth 1976). Posteriormente, em 1917, D'Herelle investigando as causas de uma epidemia de disenteria em Paris, também observou a formação de pontos claros em placas de Petri contendo culturas da bactéria *Shigella dysenteriae*. Em sua publicação denominada, “Um micróbio invisível, antagônico do bacilo disenteria”, D'Herelle, além de propor o termo bacteriófago, relatou que o agente antagonista do bacilo causador da disenteria poderia ser isolado apenas a partir de indivíduos na fase crônica da doença, mantinha-se ativo após filtração, poderia ser propagado entre colônias de bactérias, tinha a capacidade de imunizar coelhos inoculados com o bacilo

Shigella dysenteriae e necessitava obrigatoriamente de uma célula hospedeira para seu cultivo (Abedon, *et al.* 2011, Duckworth 1976, Orlova 2012).

Os bacteriófagos possuem diversas morfologias de partícula, com tamanho também bastante variável (20 a 500 nm de diâmetro), e o genoma pode ser constituído por DNA ou RNA. O capsídeo pode apresentar simetria icosaédrica, filamentosa ou pleomórfica e desempenha importantes funções no ciclo de vida do bacteriófago, tais como proteger o genoma de enzimas que degradam ácidos nucleicos e realizar o reconhecimento extracelular (vírus sem cauda) para efetuar a adsorção do bacteriófago, ou seja, realizar a ligação do vírion à superfície de uma célula bacteriana susceptível (Gill, *et al.* 2003).

O ciclo de infecção dos bacteriófagos pode ser separado em etapas, sendo uma delas a etapa extracelular, onde vírions difundem-se em meio aquoso na busca de uma célula hospedeira susceptível. Neste contexto, danos físicos e químicos devem ser evitados para manter a viabilidade das partículas virais. Na fase intracelular a célula hospedeira sintetiza os componentes necessários à multiplicação viral (Gill, *et al.* 2003).

A propagação viral envolve cinco etapas que estão didaticamente organizadas em: ligação, penetração, síntese, montagem e liberação (Abedon 2006). A ligação, ou adsorção, é um processo específico e depende de interações físicas, químicas e bioquímicas entre o vírion e a célula bacteriana hospedeira e ocorre por meio de receptores localizados na superfície de ambos. Na bactéria, estes receptores normalmente são elementos estruturais da membrana, como glicoproteínas e os lipopolissacarídeos. A adsorção dos bacteriófagos pode ocorrer de forma reversível ou irreversível. No primeiro caso, após o contato inicial entre o fago e a bactéria, pode haver a perda da interação entre os receptores, culminando com a não infecção da célula. Na etapa de penetração (injeção), a parede celular da bactéria é permeabilizada pela

ação de enzimas presentes na cauda ou no capsídeo e o vírion ou ácido nucléico é inoculado no citoplasma da célula hospedeira (Abedon 2006, Madigan *et al.* 2010, Rossi and Almeida 2010).

Os bacteriófagos podem se multiplicar de diferentes maneiras, sendo denominados ciclos de replicação líticos, lisogênicos, crônico ou pseudolisogênicos (Weinbauer 2004). No ciclo lítico, a expressão dos genes virais é regulada de modo a redirecionar a maquinaria de síntese do hospedeiro, favorecendo a síntese de ácidos nucleicos e proteínas virais. Os novos vírions são montados e liberados como resultados da lise (morte) celular, mediada por hidrolases e holinas, como no caso dos bacteriófagos com cauda T-pares (T2, T4 e T6) (Ackermann 2001, Madigan, *et al.* 2010). A lise celular pode ser visualizada como uma zona clara em placa de Petri com uma camada de células bacterianas em crescimento, convencionalmente denominada de “placa de lise”, que pode ser obtida através do ensaio de formação de placas de lise, com a técnica de sobrecamada de ágar. Este ensaio além de permitir o isolamento de linhagens virais puras, é utilizado para determinar o título de uma amostra viral (Gallet *et al.* 2011). Os bacteriófagos que adotam o ciclo lítico podem ser utilizados como ferramenta biotecnológica no controle de doenças bacterianas (Ahern *et al.* 2014).

No ciclo lisogênico (ou temperado), os bacteriófagos tem um relacionamento genético estável com o hospedeiro, assumindo um estado denominado de lisogenia, onde o genoma viral se integra no cromossomo do hospedeiro formando o “profago”. O profago replica em conjunto com o cromossomo do hospedeiro sem interferir no seu ciclo e pode ser transferido para as células filhas na divisão celular. Esse processo é possível, desde que a expressão dos genes que controlam as funções líticas do bacteriófago permaneçam reprimidas. Contudo, em determinadas condições, como a exposição a agentes mutagênicos químicos, raios ultravioletas (UV) ou ionizantes,

dessecação, os fagos lisogênicos podem reverter à via lítica, iniciando a replicação de forma lítica. A lisogenia representa importância para a recombinação gênica, conferindo novas propriedades para células bacterianas como, por exemplo, conferindo virulência para bactérias patogênicas. Neste caso, os bacteriófagos codificam fatores de virulência que podem converter células não patogênicas em patogênicas, através de um processo chamado de “conversão lisogênica” (transferência de genes dos fagos para bactérias) (Madigan, *et al.* 2010). Podem ser também utilizados como ferramenta de estudos evolutivos, devido à presença de sequências virais integradas permanentemente nos cromossomos bacterianos (Haq, *et al.* 2012, Madigan, *et al.* 2010).

Infecções crônicas ocorrem quando uma célula é infectada e a progênie viral é constantemente liberada por brotamento ou extrusão, sem que haja lise celular, como ocorre em alguns fagos filamentosos e fagos que infectam *Mycobacterium*, que são liberados da célula hospedeira sem destruí-la. Enquanto no ciclo pseudolisogênico, a infecção ocorre em parte da população e o genoma viral não é integrado no bacteriano, podendo manter-se como na forma de um plasmídeo, comumente descrito nos vírus que infectam *Pseudomonas aeruginosa* e espécies do gênero *Halobacterium* (Weinbauer 2004).

1.1. Classificação dos vírus que infectam procariotos

A classificação dos vírus de procariotos é baseada na morfologia da partícula viral e composição do genoma (King *et al.* 2012). De acordo com Ackermann and Prangishvili (2012), existem pelo menos 6.300 espécies, sendo que 6.196 correspondem aos vírus que infectam organismos classificados na divisão *Bacteria* e 88 na divisão *Archaea*. Aproximadamente 96,3% dos vírus que infectam procariotos estão

classificados na ordem *Caudovirales*, que é caracterizada pela presença de uma cauda na partícula.

A ordem *Caudovirales* possui três famílias morfologicamente e filogeneticamente distintas: *Myoviridae*, que inclui os vírus de cauda longa, contrátil; *Siphoviridae*, caracterizada pela presença de uma cauda longa, não contrátil; e *Podoviridae*, composta pelos vírus de cauda curta, não contrátil (Abedon 2006, Ackermann and Prangishvili 2012, King, *et al.* 2012).

Quanto à frequência e distribuição, os bacteriófagos já foram descritos em 12 filos procarióticos, ocorrendo em 16 gêneros do domínio *Archaea*, incluindo quase que exclusivamente hipertermófilos ou extremófilos halófilos e 163 de *Bacteria* com destaque para os gêneros classificados nos filos Proteobacteria e Firmicutes (Ackermann & Prangishvili 2012).

1.2. Bacteriófagos que infectam bactérias fitopatogênicas

Já foram descritos diversos bacteriófagos capazes de infectar bactérias fitopatogênicas de importância econômica como *Xanthomonas campestris* (Lin *et al.* 1999), *Ralstonia solanacearum* (Yamada *et al.* 2007), *Xilrella fastidiosa* (Ahern, *et al.* 2014), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Ahmad *et al.* 2014b, Ahmad *et al.* 2014a) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Hung *et al.* 2002).

Os bacteriófagos que infectam bactérias fitopatogênicas podem causar diversas alterações fisiológicas nas células hospedeiras. Segundo (Ahmad, *et al.* 2014b), a infecção lisogênica do fago filamento XacF1 em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, resultou em baixos níveis na produção de polissacarídeo extracelular, redução da taxa de crescimento, diminuição da motilidade pulsante, drástica redução da virulência e desenvolvimento das lesões em folhas de citrus.

A infecção do bacteriófago lítico ϕ L7, em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), resultou na morte do hospedeiro e estudos sobre a interação do fago ϕ L7 com seu hospedeiro, demonstraram que a mutação do gene *xanA* do hospedeiro, requerido para a síntese de xantana e lipopolissacarídeo, reduz de maneira drástica a adsorção do fago na célula hospedeira (Hung, *et al.* 2002, Hung *et al.* 2003).

A infecção por bacteriófago pode ser específica ou estender-se para outras bactérias filogeneticamente relacionadas, como por exemplo, fagos isolados de *Xylella fastidiosa*, mostraram-se eficientemente capazes de infectar *Xanthomonas* spp (Ahern, *et al.* 2014). Enquanto que os fagos Cp1 e Cp2 são tão específicos que são utilizados para distinção de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* de diferentes regiões do Japão, onde os isolados que são suscetíveis ao fago (Cp1s), não são sensíveis ao fago (Cp2) e vice-versa (Ahmad, *et al.* 2014a). O bacteriófago PBSPCA1, capaz de infectar bactérias da espécie *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* também é específico e tem sido utilizado como ferramenta para a identificação de diferentes patovares de *Pseudomonas* de difícil distinção. O PBSPCA1 mostrou infectar todos os isolados de *P. cannabina* pv. *alisalensis* originados de várias localizações geográficas e de diversas crucíferas sintomáticas, e não foi capaz de infectar *P. syringae* pv. *maculicola*, um patovar muito similar (Schofield *et al.* 2012).

1.3. Uso de bacteriófagos para controle biológico de doenças em plantas

Alguns bacteriófagos, que infectam bactérias patogênicas, causam alterações fisiológicas em seus hospedeiros que culminam com uma redução da virulência e conseqüentemente afetam o estabelecimento da doença. Considerando que o uso de bactericidas é ambientalmente preocupante e que o manejo de algumas fitobactérias como Xcc, está restrito a métodos preventivos, como uso de sementes livres do

patógeno e eliminação total das plantas contaminadas (Silva 2006), esses bacteriófagos despertam grande interesse para o uso no controle doenças de plantas causadas por bactérias, uma tecnologia conhecida como “fagoterapia” (Ahern, *et al.* 2014, Balogh *et al.* 2010).

O termo fagoterapia foi inserido desde 1990 e vários estudos de aplicação foram realizados. Muitos bacteriófagos já demonstraram potencial para o controle de diversas fitobactérias economicamente importantes, incluindo, *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Erwinia* spp., *Ralstonia* spp. e *Streptomyces* spp., (Balogh, Jones, Iriarte and Momol 2010).

Chae *et al.* (2014), isolaram 34 bacteriófagos a partir de campos de arroz de vários pontos da Coreia infectando *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), agente causal da mancha foliar bacteriana. Em teste de patogenicidade, foi observado que a incidência da mancha foliar bacteriana em plantas de arroz, sofreu redução com a aplicação de uma mistura de bacteriófagos com leite desnatado, sugerindo a utilização desta como um método de controle alternativo para aumentar a eficácia de controle da doença e reduzir o uso de agroquímicos no meio ambiente.

Frampton *et al.* (2014), isolou um elevado número de bacteriófagos a partir de pomares de kiwi em vários locais da Nova Zelândia, infectando *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* uma bactéria reemergente causadora do cancro bacteriano do kiwi. Do total de 275 bacteriófagos isolados, 258 mostraram-se ativos contra *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, e os testes de adequabilidade para o biocontrole avaliando especificidade, estabilidade, ausência de lisogenia e transdução, sugerem que os fagos representam características adequadas para a formulação de agentes de biocontrole contra o cancro bacteriano do kiwi.

O primeiro bacteriófago disponível para comercialização foi registrado na Agência de Proteção Ambiental dos EUA em 2005, e foi designado para o tratamento da mancha bacteriana do tomateiro e da pinta bacteriana da pimenta causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* respectivamente (Balogh, *et al.* 2010).

Foi demonstrado que a viabilidade dos bacteriófagos no meio ambiente, pode ser ampliada com o uso de substâncias protetoras para o vírus, como a sacarose, leite desnatado e formulação a base de farinha de milho, visto que, o ambiente externo é desafiador para a manutenção dos bacteriófagos em função das inconstantes condições ambientais, como temperatura, umidade, pH, incidência de luz ultravioleta e componentes químicos liberados pelas plantas (Jones *et al.* 2012).

A eficiência da utilização de bacteriófagos no controle do hospedeiro pode ser maximizada com o uso integrado de ativadores de plantas (que induzem sistemas de defesa da planta), ou com agentes antagonistas, como antibióticos (Balogh, *et al.* 2010). Borah *et al.* (2000), eliminou a população de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignaeradiatae* (Xav), das sementes do feijão mungo (*Vigna radiata* cv. Pusa Baisakhi), aplicando o bacteriófago lítico XMP-1 em combinação com estreptomicina demonstrando o sucesso desse sinergismo.

1.4. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)

Xanthomonas campestris pv. *campestris*, é uma bactéria Gram-negativa, agente causadora da podridão negra em brássicas (Santos *et al.* 2008). Destaca-se pela produção em larga escala de um exopolissacarídeo denominado goma xantana, que é essencial para a virulência e patogenicidade, e que também tem aplicações na indústria

alimentícia, cosmética e agrícola como agente emulsificante, espessante, estabilizante e de suspensão (Hung, *et al.* 2002).

A podridão negra das brássicas é uma doença com distribuição em nível mundial, e é caracterizada pela presença de lesões amarelas em forma de “V”, com o vértice voltado para o centro, que progridem para a nervura principal, tornando-se necrosadas (Santos, *et al.* 2008).

A manutenção da Xcc no campo ocorre a partir de água de irrigação, águas das chuvas, utilização de ferramentas e maquinário contaminados, plantas remanescentes infectadas, brássicas silvestres infectadas e insetos. Normalmente o controle, inicia-se com a prevenção, a partir de sementes tratadas, eliminação de restos de cultura, desinfecção de ferramentas e maquinarias, tratamento da água de irrigação e rotação de cultura (Silva 2006). Assim, medidas alternativas e eficazes de controle são necessárias.

Neste contexto, a caracterização de bacteriófagos, capazes de infectar bactérias fitopatogênicas é relevante devido o potencial que os bacteriófagos têm demonstrado no controle biológico, representando uma alternativa ambientalmente segura, em relação aos agentes químicos convencionalmente adotados.

Referencias Bibliográficas

- Abedon, S.T.** (2006) *The bacteriophages* 2 edn. Oxford, New York: Oxford University Press.
- Abedon, S.T., Thomas-Abedon, C., Thomas, A. and Mazure, H.** (2011) Bacteriophage prehistory: Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage*, **1**, 174-178.
- Ackermann, H.-W.** (2001) Bacteriophages: Tailed. In *eLS*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Ackermann, H.W. and Prangishvili, D.** (2012) Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol*, **157**, 1843-1849.
- Ahern, S.J., Das, M., Bhowmick, T.S., Young, R. and Gonzalez, C.F.** (2014) Characterization of novel virulent broad-host-range phages of *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas*. *J Bacteriol*, **196**, 459-471.
- Ahmad, A.A., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M. and Yamada, T.** (2014b) The filamentous phage XacF1 causes loss of virulence in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causative agent of citrus canker disease. *Front Microbiol*, **5**, 321.

- Ahmad, A.A., Ogawa, M., Kawasaki, T., Fujie, M. and Yamada, T.** (2014a) Characterization of bacteriophages Cp1 and Cp2, the strain-typing agents for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Appl Environ Microbiol*, **80**, 77-85.
- Balogh, B., Jones, J.B., Iriarte, F.B. and Momol, M.T.** (2010) Phage therapy for plant disease control. *Curr Pharm Biotechnol*, **11**, 48-57.
- Borah, P.K., Jindal, I. and Verma, J.P.** (2000) Biological management of bacterial leaf spot of mungbean caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignaeradiatae*. *Indian Phytopath*, **53**, 384-394.
- Chae, J.C., Hung, N.B., Yu, S.M., Lee, H.K. and Lee, Y.H.** (2014) Diversity of bacteriophages infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in paddy fields and its potential to control bacterial leaf blight of rice. *J Microbiol Biotechnol*, **24**, 740-747.
- Duckworth, D.H.** (1976) "Who discovered bacteriophage?". *Bacteriol Rev*, **40**, 793-802.
- Flint, S.J., Racaniello, V.R., Enquist, L.W. and Skalka, A.M.** (2009) *Principles of virology* 3 edn. Washington, DC.
- Frampton, R.A., Taylor, C., Holguán Moreno, A.V., Visnovsky, S.B., Petty, N.K., Pitman, A.R. and Fineran, P.C.** (2014) Identification of bacteriophages for the biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.
- Gallet, R., Kannoly, S. and Wang, I.N.** (2011) Effects of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC Microbiol*, **11**, 181.
- Gill, J.J., Svircev, A.M., Smith, R. and Castle, A.J.** (2003) Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2133.
- Haq, I., Chaudhry, W., Akhtar, M., Andleeb, S. and Qadri, I.** (2012) Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal*, **9**, 9.
- Hung, C.H., Wu, H.C. and Tseng, Y.H.** (2002) Mutation in the *Xanthomonas campestris* xanA gene required for synthesis of xanthan and lipopolysaccharide drastically reduces the efficiency of bacteriophage (phi)L7 adsorption. *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 338-343.
- Hung, C.H., Yang, C.F., Yang, C.Y. and Tseng, Y.H.** (2003) Involvement of tonB-exbBD1D2 operon in infection of *Xanthomonas campestris* phage phi L7. *Biochem Biophys Res Commun*, **302**, 878-884.
- Jones, J.B., Vallad, G.E., Iriarte, F.B., Obradović, A., Wernsing, M.H., Jackson, L.E., Balogh, B., Hong, J.C. and Momol, M.** (2012) Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage*, **2**, 208-214.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J.** (2012) *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* London, UK: Elsevier.
- Lin, N.T., Liu, T.J., Lee, T.C., You, B.Y., Yang, M.H., Wen, F.S. and Tseng, Y.H.** (1999) The adsorption protein genes of *Xanthomonas campestris* filamentous phages determining host specificity. *J Bacteriol*, **181**, 2465-2471.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P.** (2010) *Microbiologia de Brock* 12 edn.
- Orlova, E.V.** (2012) Bacteriophages and Their Structural Organisation, Bacteriophages. In *BACTERIOPHAGES* (Kurtboke, D.I. ed: InTech.
- Rossi, L.P.R. and Almeida, R.C.C.** (2010) Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **69**, 151-156.

- Santos, L.A.a.d., Bandeira, D.d.A., Silva, J.P.d., Silveira, E.B.d., Gomes, A.a.M.A. and Mariano, R.d.L.R.** (2008) Caracterização de isolados de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* de sistemas de produção orgânico e reação de brássicas à podridão-negra. *Horticultura Brasileira*, **26**, 486-491.
- Schofield, D.A., Bull, C.T., Rubio, I., Wechter, W.P., Westwater, C. and Molineux, I.J.** (2012) Development of an engineered bioluminescent reporter phage for detection of bacterial blight of crucifers. *Appl Environ Microbiol*, **78**, 3592-3598.
- Silva, M.R.** (2006) Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Brasil. In *Fitopatologia*. Viçosa: Universidade Federal de Viços, pp. 80.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L.** (2012) *Microbiologia*.
- Weinbauer, M.G.** (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev*, **28**, 127-181.
- Yamada, T., Kawasaki, T., Nagata, S., Fujiwara, A., Usami, S. and Fujie, M.** (2007) New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Microbiology*, **153**, 2630-2639.

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE UM
BACTERÍO FAGO ESPECÍFICO PARA *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV.
CAMPESTRIS.**

Fernanda P. Silva¹, André da S. Xavier² & Poliane A. Zerbini¹

¹Dep. de Microbiologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG
36570-000, Brasil

²Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brasil

#Autor para correspondência: Poliane Alfenas Zerbini

Fone: (+55-31) 3899-2953; Fax: (+55-31) 3899-2240; E-mail: palfenas@ufv.br

INTRODUÇÃO

Bacteriófagos (fagos) são descritos como vírus que infectam bactérias. Constituídos essencialmente pelo ácido nucleico (DNA/RNA) e pelo capsídeo, são entidades extremamente pequenas, visíveis apenas em microscópio eletrônico.

Os bacteriófagos foram oficialmente descritos em 1915 infectando a bactéria *Micrococcus* (Duckworth 1976), e desde sua descoberta trabalhos tem descrito sua importância em diversas áreas do conhecimento, e ultimamente tem havido crescente interesse na aplicação dos bacteriófagos como uma alternativa ambientalmente aceitável, no controle de doenças bacterianas de plantas (Ahern *et al.* 2014).

Atualmente, são descritos pelo menos 6300 espécies de bacteriófagos, isolados a partir de procariotos bacterianos (6196) e arqueanos (88). Aproximadamente 96% dessas espécies, são classificadas na ordem *Caudovirales*, que abrange três famílias morfologicamente e filogeneticamente distintas, *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* (Ackermann and Prangishvili 2012).

Os bacteriófagos propagam-se no interior de uma bactéria hospedeira suscetível. Bacteriófagos virulentos (líticos) promovem a lise (morte) do hospedeiro no final da multiplicação. Devido a este mecanismo, os fagos líticos despertaram interesse para o uso na fagoterapia de bactérias patogênicas de alimentos, plantas e animais (Andrade 2010, Balogh *et al.* 2010, Haq *et al.* 2012).

Os fagos temperados seguem o ciclo lisogênico, com a formação do *profago* e a divisão bacteriana não é alterada. A lisogenia tem importância para a variabilidade genética tanto do hospedeiro quanto do bacteriófago, e apesar de não levar à lise celular, também desperta interesse para fagoterapia, devido à modulação da fisiologia que pode resultar na redução da virulência bacteriana (Abedon 2006). (Ahmad *et al.* 2014a)

(2014b), observaram alterações na patogenicidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, infectada lisogenicamente com o fago filamento XacF1, que resultou em baixos níveis na produção de polissacarídeo extracelular, redução da taxa de crescimento, diminuição da motilidade pulsante, drástica redução da virulência e desenvolvimento das lesões em folhas de citrus.

Vários bacteriófagos com potencial para uso na fagoterapia foram descritos a partir de fitobactérias. Dentre eles destacam-se os fagos (phi)Lf de *Xanthomonas campestris* (Lin et al., 1999), os fagos (phi)RSL, (phi)RSA, (phi)RSM e (phi)RSS de *Ralstonia solanacearum* (Yamada et al. 2007), os fagos Sano, Salvo, Prado e Paz *Xillella fastidiosa* e *Xanthomonas* (Ahern, 2014), fagos Cp1 e Cp2 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Ahmad et al. 2014b, Ahmad, et al. 2014a), o fago XacF1 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Ahmad, et al. 2014b, Ahmad, et al. 2014a)

Esta alternativa de controle permite o uso de um agente antagonista ambientalmente seguro devido sua especificidade ao hospedeiro e a capacidade de co-evolução com células resistentes (Hung et al. 2002, Lin et al. 1999, Schofield et al. 2012, Su et al. 1999).

Bactérias fitopatogênicas são agentes responsáveis por grandes perdas em diversos tipos de culturas em todo o mundo. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), é uma bactéria Gram negativa, agente causador da podridão negra das brássicas. É um organismo agricolamente e industrialmente importante, que produz um exopolissacarídeo (EPS) denominado goma xantana, que é essencial para o estabelecimento da doença (Hung, et al. 2002, Santos et al. 2008). A podridão negra das brássicas é caracterizada pela presença de lesões amarelas em forma de “V”, com o vértice voltado para o centro, que progridem para a nervura principal, tornando-se necrosadas (Santos, et al. 2008). Seu controle normalmente está relacionado aos hábitos

de prevenção, como, desinfecção de ferramentas e maquinário, rodizio de cultura, eliminação de plantas remanescentes e tratamento da água de irrigação.

Neste trabalho, um bacteriófago lítico capaz de infectar isolados de Xcc, foi isolado a partir de folhas de couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) com sintomas da podridão negra. De acordo com as características morfológicas e genotípicas, este bacteriófago foi classificado na família *Podoviridae* (ordem *Caudovirales*). Análises de especificidade de hospedeiro mostraram que o bacteriófago isolado infecta eficientemente diferentes isolados de Xcc, mas, não é capaz de infectar isolados de gêneros filogeneticamente relacionados. Estudos genômicos estão em andamento, e as informações obtidas a partir das análises das sequencia serão importantes para confirmar o posicionamento taxonômico, além de fornecer informações para o uso como agente de biocontrole.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de bactérias e condições de cultivo

Os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* utilizados neste trabalho (Tabela 02) foram obtidos a partir das seguintes coleções: Coleção de Culturas de Micro-organismos do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CCMLF/UFRPE), gentilmente cedidos pela Dr^a. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE) (Albuquerque *et al.* 2014), e da Coleção de Culturas do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Viçosa (CCLB/UFV), gentilmente cedidos pelo professor Dr. José Rogério de Oliveira (UFV). Os isolados de bactérias não relacionados com Xcc foram obtidos a partir das duas coleções citadas acima e da Coleção de Culturas de Micro-organismos do Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (CCMLPF/UFV), gentilmente cedidos pelo professor Dr. Acelino Couto Alfenas (UFV). O isolado XccDMB001 foi obtido e caracterizado neste trabalho. Os isolados foram cultivados em meio 523 (Kado and Heskett 1970), contendo sacarose (10g.L⁻¹), triptona (8g.L⁻¹), extrato de levedura (4g.L⁻¹), fosfato de potássio dibásico (2g.L⁻¹), sulfato de magnésio héptahidratado (0,3g.L⁻¹) e ágar (15g.L⁻¹) à 28 °C sob agitação (200-300 rpm).

Isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Para o isolamento da Xcc.DMB001, quatro discos da transição da doença no limbo foliar, foram desinfestados previamente de acordo com (Paz 2009) e macerados em água destilada esterilizada, e a suspensão resultante foi utilizada para realização da técnica de esgotamento por estria composta em meio 523 (Madigan *et al.* 2010). Análise macroscópica da colônia foi realizada e as colônias isoladas com aspectos típicos de Xcc foram crescidas em meio líquido para a extração de DNA utilizando-se o Wizar^R

Genomic DNA Purification Kit (Invitrogen), de acordo com recomendações do fabricante. O DNA extraído foi utilizado para a amplificação por PCR utilizando a enzima GoTaq DNA polimerase (Promega) e os oligonucleotídeos específicos para Xcc descritos por (Park *et al.* 2004). Para confirmar a patogenicidade do isolado, plantas de couve manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) foram inoculadas como descrito por (Moers *et al.* 2012) utilizando a Xcv e água destilada esterilizada como controles negativos, e os sintomas foram observados oito e 15 dias após a inoculação. Antes da inoculação as plantas foram cobertas com um saco plástico durante 12 horas a fim de facilitar a infecção por aberturas naturais da folha (estômatos e hidatódios). Após inoculação as plantas foram incubadas em uma câmara de crescimento a 28°C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, durante três semanas.

Detecção de bacteriófagos

As amostras de solo, folha de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*), couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) e repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L), e flor de couve-flor, foram coletadas em campo de cultivo de brássicas em Coimbra-MG, totalizando nove amostras. As amostras foram coletadas em áreas com incidência de podridão negra, especificamente em solo rizosférico de plantas sintomáticas e assintomáticas. Para detectar a presença de bacteriófagos, aproximadamente um grama de solo foram ressuspensos em 8 mL de água destilada esterilizada, e quatro gramas de folha ou de flor foram maceradas em igual volume. A suspensão foi centrifugada a 10.000 g por 5 minutos e em seguida filtrada em filtro com membrana PVDF de 0,22 µm (Millex-GV Syringe Filter, Merck Millipore) e armazenadas a 4 °C. Alíquotas de 100 µL do filtrado de cada amostra, foram utilizadas para o ensaio de detecção de placas de lise em sobrecamada com meio 523 semi-sólido 0,7%, utilizando o isolado

XccDMB001 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, como hospedeiro isca para a propagação.

Purificação e caracterização de partículas virais

O bacteriófago foi purificado por quatro ciclos de propagação a partir de uma única placa de lise (2 mm), através do *ensaio* de formação de placas de lise, com a técnica de *sobrecamada* de ágar (Adams, 1959), utilizado como hospedeiro para propagação o isolado XccDMB001, cultivado em meio 523 durante 12 horas a 28 °C sob agitação (200-300 rpm). Após 12 horas, a cultura bacteriana foi diluída 100 vezes em meio 523 fresco, em erlenmeyers de 500 mL. Quando essas culturas atingiram a densidade ótica (DO₆₀₀) de 0,2 U, 100 µl da suspensão purificada do bacteriófago foi adicionada. Após 48 horas de crescimento adicional as células foram removidas por centrifugação a 8.000 g durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi filtrado utilizando filtro de membrana PVDF de 0,22 µm (Millex-GV Syringe Filter, Merck Millipore). Em seguida as partículas virais foram precipitadas na presença de 0,5 M NaCl e 5% de polietileno glicol 6000 (p/v) e centrifugadas a 15.000 g durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em Tampão SM (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ e 0,01% de gelatina) a 4°C. As partículas virais purificadas foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) (Zeiss Libra 109), mediante contrastação negativa com acetato de uranila 0,5%.

Titulação de bacteriófagos

Foram realizadas diluições seriadas da suspensão de bacteriófago em tampão SM, obtendo diluições no máximo de 10^{-12} . As alíquotas foram plaqueadas em meio 523 através da técnica de *sobrecamada* de ágar, (descrito anteriormente) e após solidificação as placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas. Após este período foi observada a formação de placas de lise. Para a obtenção do título viral, foram consideradas as diluições com o número de placas de lise entre 30 a 300 e o título viral foi expresso em unidades formadoras de placas/mL (UFP/mL⁻¹) por meio da fórmula abaixo.

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{número de placas de lise} \times \text{fator de diluição}}{\text{Volume da diluição (mL)}}$$

Extração e caracterização de ácidos nucleicos

O ácido nucleico viral foi isolado a partir de partículas virais purificadas utilizando-se o método de extração com fenol-clorofórmio (Sambrook and Russell 2001). Para confirmar a natureza do ácido nucleico extraído, foram realizados tratamentos do DNA [1µg/µl] com as nucleases RNase A, DNase I e S1 nuclease de acordo com as instruções do fabricante. O tamanho e o número de componentes genômicos foi determinado por Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE). As amostras foram carregadas em gel de agarose 1% em TBE 0,5X (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8,3), executado a 6 V/cm em temperatura constante de 14°C, com um intervalo switch de 1s (T_{inicial}) a 15s (T_{final}) entre dois campos elétricos cuja orientação diferiu em um ângulo de 120°C, durante 16 horas.

Suscetibilidade de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* ao bacteriófago

O espectro de ação do bacteriófago foi avaliado contra diversos isolados de Xcc, utilizando o método de sobrecamada com meio 523 semi-sólido (0,7%). O título viral da suspensão usada para infectar os isolados foi de 10^6 UFP.mL¹. A ocorrência de placas de lise na sobrecamada de meio 523 semi-sólido após incubação a 28°C durante 24 horas, foi interpretada como suscetibilidade e a ausência como resistência. O diâmetro das placas de lise foi medido com o auxílio de uma régua milimétrica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Um isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* foi obtido a partir de folha de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) com sintomas de podridão negra das brássicas (Figura 1A). A partir de folhas sintomáticas maceradas foram obtidas colônias com características típicas de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, de cor amarela e formato mucóide (figura 1B). Colônias isoladas foram cultivadas em meio líquido e as culturas foram utilizadas para extração de DNA total. Quando foi utilizado DNA total do isolado obtido, bem como do isolado Xcc.BRA1.2, da coleção CCMLF/UFRPE, foi observada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 500 pb correspondente a uma região do gene *hrpF*, específico de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Não foi observado a amplificação de DNA quando foram utilizados DNA extraídos do isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* da coleção CCMLF/UFRPE, ou do isolado de *Xanthomonas vesicatoria*, confirmando que a bactéria obtida é um isolado de Xcc (Figura 1C), o qual foi denominado Xcc.DMB001.

Para confirmar a patogenicidade do isolado Xcc.DMB001, foi realizado um teste de patogenicidade. Foram observados os sintomas típicos da infecção por Xcc nos isolados XccBRA1.2 e Xcc.DMB001, caracterizado pela presença de lesões amarelas em forma de “V”, com o vértice voltado para o centro, que progridem para a nervura principal, tornando-se necrosadas (Figura 1D e E). Não foram observados sintomas nas plantas inoculadas com Xcv e na planta não inoculada, utilizadas como controle negativo. A partir das plantas infectadas foi feito um novo isolamento, onde foi possível obter colônias típicas de Xcc, e a identidade foi novamente confirmada por PCR, (Figura 1F).

Deteccão e isolamento de bacteriófagos

O isolamento de bacteriófagos foi realizado a partir de nove amostras (Tabela 01) coletadas em dois pontos com distância de 200 metros na mesma propriedade, sendo que apenas nas amostras de couve-flor doente (ponto 1), e solo de brócolis doente (ponto 2), foi possível observar a formação de placas de lise utilizando-se o isolado Xcc.DMB001 como isca. A ausência de placas de lise em sete das nove amostras analisadas pode ser justificada pela utilização de um único isolado como hospedeiro isca, para a proliferação dos bacteriófagos, visto que, mecanismos relacionados com a suscetibilidade da bactéria, podem ter impedido o sucesso da infecção (Romero-Suarez *et al.* 2012).

A partir da amostra de folha de couve-flor apresentando sintomas da doença (amostra 3) foi possível observar nítidas placas de lise, com tamanho aproximado a 2,5mm de diâmetro e formato regular (Figura 2A). Também foram observadas placas de lise de coloração opaca a partir da amostra de solo rizosférico de brócolis sintomáticos (amostra 9). Placas de lise isoladas de ambas amostras foram utilizadas para a propagação, sendo que somente bacteriófagos isolados a partir da amostra de couve-flor doente (amostra 3) se mantiveram persistentes durante o ciclo de quatro propagações.

A morfologia das placas de lise pressupõe algumas propriedades dos bacteriófagos, sendo que o pequeno tamanho das mesmas é indicativo para membros da família *Podoviridae*, enquanto grandes placas de lise são típicas de vírus da família *Siphoviridae*, que usualmente está associado com a rapidez nos níveis de adsorção e curtos períodos de latência (Abedon 1989). É possível que a perda da capacidade em gerar placas de lise durante a propagação observada na amostra de solo rizosférico de brócolis (amostra 09), pode ser resultado da integração do genoma do bacteriófago no hospedeiro, tornando-o resistente no ciclo de infecção seguinte (Gallet *et al.* 2011).

Mutações em genes relacionados com os receptores do bacteriófago ou do hospedeiro também resultam nesse tipo de evento (Romero-Suarez, *et al.* 2012). Placas de lise com centro claro e limitação nítida são típicas de fagos virulentos, como resultado da eficiente infecção e lise bacteriana, iniciando em um ponto central da camada de células hospedeiras e migrando para todas as direções (Abedon and Yin 2009, Gallet, *et al.* 2011, Liew and Alvarez 1981).

Caracterização do bacteriófago isolado

Após quatro passagens de propagação o bacteriófago isolado se mostrou estável, como pode ser observado pela formação de nítidas placas de lise (Figura 3A). A estabilidade lítica do bacteriófago é uma característica importante para a sua utilização como ferramenta biotecnológica para o controle de doenças, considerando que a capacidade dos bacteriófagos persistirem na filosfera por períodos prolongados é limitada por muitos fatores, incluindo a irradiação solar (especialmente na zona da luz UV), temperatura, dessecação, e exposição a componentes químicos (Iriarte *et al.* 2007). Assim, essa característica de se manter estável, na forma lítica pelo menos em condições de cultivo *in vitro* é considerada importante para uso como ferramenta no controle biológico. Neste contexto, estudos *in vivo* de estabilidade lítica ainda devem ser realizados. Algumas estratégias têm sido recomendadas para auxiliar a persistência do bacteriófago no ambiente, como o uso de bactérias atenuadas e aplicação de misturas estabilizantes (Iriarte *et al.* 2012).

O título da suspensão de bacteriófago foi determinado através da diluição seriada e *ensaio* de formação de placas de lise, com a técnica de *sobrecamada* de ágar. A amostra foi serialmente diluída 16 vezes em tampão SM. Após o período de incubação, as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , com o número de placas de lise dentro do limite padrão de contagem foram analisadas (30-300 UFP/mL⁻¹). O título viral foi determinado a

partir da contagem do número de placas de lise da diluição 10^{-6} , e resultou em $6,1 \times 10^8/\text{mL}^{-1}$.

Para analisar a morfologia da partícula viral, após quatro passagens de propagação seguida de purificação, as partículas virais foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão. O bacteriófago isolado possui cabeça icosaédrica de aproximadamente 30 ± 5 nm de diâmetro e uma cauda curta, provavelmente não contrátil com cerca de 6 ± 2 nm de comprimento x 7 ± 2 nm largura e aparente ausência de fibras (Figura 3B). A partir da mesma purificação utilizada para análise da morfologia, foram extraídos ácidos nucléicos totais e a natureza do ácido nucléico viral foi analisada. O ácido nucleico viral foi tratado com as nucleases Dnase I, Rnase A e S1 nuclease. Nas alíquotas tratadas com Rnase A e S1 nuclease permaneceram integras. Na alíquota tratada com Dnase I foi observada a degradação do ácido nucleico viral, mostrando que o genoma viral é constituído por uma molécula de dsDNA linear (Figura 3C). A análise de PFGE mostrou que o genoma do bacteriófago isolado possui uma única molécula de DNA com tamanho estimado em 65 kpb (Figura 3D).

Com base nas características morfológicas e o tipo de ácido nucléico, o bacteriófago isolado foi classificado como um vírus da família *Podoviridae* (Ordem *Caudovirales*) que inclui os fagos com genoma de dsDNA, cabeça icosaédrica e cauda curta (Ackermann and Prangishvili 2012), e foi denominado de ϕ Xacp1. A ordem *Caudovirales* representa cerca de 96% dos vírus procarióticos, um grupo caracterizado pela presença de cauda, e que inclui três famílias, *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*, assim classificados de acordo com as diferenças morfológicas, química e bioquímica da cauda (Ackermann and Prangishvili 2012). Membros da família *Podoviridae*, tem cauda não contrátil, com cerca de 20 x 8 nm e durante a replicação

observa a montagem da cabeça inicialmente seguido do agregamento. Esta família foi recentemente revisada e agrupa duas subfamílias e seis gêneros com bases nos dados de proteômica disponíveis, propriedades biológicas que incluem organização morfológica, genoma, mecanismos de organização de dsDNA e a presença de genes no genoma que codificam para a DNA-polimerase (subfamília *Picovirinae*) ou RNA-polimerase (subfamília *Autographivirinae*) (King *et al.* 2012). Essas características em conjunto, sugerem a classificação do fago ϕ Xacp1 na família *Podoviridae*, no entanto, o posicionamento taxonômico correto deve ser definido com base no sequenciamento genômico.

O fago ϕ Xacp1 apresentou semelhanças morfológicas com alguns fagos descritos em *Xanthomonas campestris*, no entanto, curiosamente, não se observa similaridade nos padrões de medidas das partículas correlacionadas. Como no caso dos fagos descritos por (Romero-Suarez, *et al.* 2012), que apresentam diâmetro da cabeça entre 71,4 \pm 1 nm e 42,8 \pm 1 nm e comprimento da cauda entre 38,6 \pm 3 nm e 7,5 \pm 1 nm, superior às medidas observadas no fago ϕ Xacp1. O mesmo é observado para os fagos descritos por (Ahern, *et al.* 2014), com diâmetro da cabeça entre 68 (\pm 1.1) nm e 69 (\pm 1,4) nm (não avaliou o comprimento da cauda) e tamanho do genoma variando entre 43,9 a 43,8 Kpb.

Suscetibilidade/Susceptibilidade de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* à infecção pelo bacteriófago

Para determinar a especificidade do fago ϕ Xacp1 isolados de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* e isolados bacterianos não relacionados filogeneticamente com Xcc, foram utilizados para o teste de suscetibilidadesusceptibilidade (Tabela 02). O padrão de especificidade do bacteriófago frente aos isolados testados foi relativamente

alto, havendo infecção em apenas quatro dos 10 isolados de Xcc e nenhuma nos isolados não relacionados. O padrão de suscetibilidadesusceptibilidade dos isolados bacterianos foi classificado de acordo com o número de ufp/ml, sendo que isolados muito suscetíveis foram aqueles em que o número de ufp/ml variou entre 80-150, isolados moderadamente suscetível, de 20 a 80 ufp/ml e pouco suscetível, ufp/ml <20; e resistentes (ausência de placas de lise). O isolado Xcc-MG (Sudeste) foi muito suscetível ao fago ϕ Xacp1, e interessantemente apresentou maior número de ufp/ml do que o isolado Xcc.DMB001 utilizado na purificação e propagação do fago ϕ Xacp1. Os isolados X03 (Sul) e Xcc.AL (Sudeste) apresentaram moderada suscetibilidadesusceptibilidade e o isolado Xcc.BRA.1.2 (Nordeste) foi pouco susceptível. Observa-se uma relação entre região de origem dos isolados e os níveis de suscetibilidadesusceptibilidade ao fogo ϕ Xacp1, pois a suscetibilidadesusceptibilidade foi maior nos isolados pertencentes à mesma região do isolado Xcc.DMB001 ou em regiões vizinhas (Tabela 2).

O alto grau de especificidade exibido pelo bacteriófago é comum, visto que o fago utiliza receptores específicos na célula hospedeira para realizar a adsorção. Em bactérias Gram negativas como a Xcc, os receptores comumente utilizados pelos bacteriófagos, são os componentes expostos na superfície da membrana externa (Heller 1992). Tem sido demonstrado que os dois principais componentes da membrana externa que atuam como receptores são os LPS e as proteínas. Segundo (Hung, *et al.* 2002), isolados de Xcc, mutantes para o gene *xanA*, requerido para a síntese de xantana e lipopolissacarídeo, resulta em drástica redução na eficiência de adsorção do bacteriófago phiL7.

Os receptores específicos do bacteriófago também são responsáveis na determinação da especificidade do fago. De acordo com (Tseng *et al.* 1990), o fago

filamentoso phiLf que infecta especificamente Xcc, possui um gene (gIII) que codifica uma proteína essencial na adsorção do bacteriófago. O local exato de início da transcrição para esse gene e a sequência N-terminal da proteína resultante, foi revisada e determinada por (Lin, *et al.* 1999).

Um das características mais relevantes para a aplicação dos bacteriófagos no controle de bactérias fitopatogênicas está relacionado com o nível de especificidade que o fago exerce em relação ao hospedeiro, visto que este parâmetro reduz os riscos de alteração não desejada no patossistema em tratamento (Balogh, Jones, Iriarte and Momol 2010). Assim, a não suscetibilidadesusceptibilidade dos isolados não relacionados filogeneticamente com Xcc, é um fator positivo para possível aplicação do bacteriófago ϕ Xacp1 no controle da podridão negra das brássicas, visto que este possui a capacidade de infectar apenas os isolados de interesse, não alterando os microorganismos presente no patossistema onde ocorre a podridão negra das brássicas (Balogh et al., 2010).

Com relação à morfologia das placas de lise formadas por isolados de Xcc no teste de suscetibilidade ao bacteriófago (Figura 03), observou-se que estas apresentaram um padrão de tamanho e forma similar às observadas no isolado Xcc.DMB001. Existem vários fatores relacionados ao bacteriófago e a bactéria hospedeira que podem influenciar na morfologia, tamanho e coloração das placas de lise, como a taxa de difusão do fago, nível de adsorção, isolado bacteriano, lisogenia e adição de antibióticos no meio de cultura (Abedon and Yin 2009, Gallet, *et al.* 2011, Santos *et al.* 2009). No entanto, apesar dos isolados de Xcc pertencerem a diferentes regiões, os aspectos morfológicos das placas de lise nos diferentes isolados de Xcc, mantiveram-se padrão com relação a coloração, tamanho e forma.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida a primeira autora e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro. Agradecemos também a Dr^a. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE), ao Dr. José Rogério de Oliveira (UFV) e ao Dr. Acelino Couto Alfenas (UFV), por gentilmente cederem os isolados bacterianos utilizados nesse estudo, assim, como também a Dr^a. Marisa Vieira de Queiroz (UFV) e ao núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pela disponibilidade e colaboração.

TABELAS

Tabela 1. Amostras coletadas no campo com culturas de brássicas (*Brassicaceae*) com e sem sintomas de podridão bacteriana, na cidade de Coimbra-MG – Brasil.

Nº	Amostra	Sintomas	Presença de bacteriófago
1	Folha de brócolis (ponto 1*)	Presente	Ausente
2	Folha de repolho (ponto 1)	Presente	Ausente
3	Folha de couve-flor (ponto 1)	Presente	Presente
4	Folha de brócolis (ponto 1)	Ausente	Ausente
5	Folha de couve-flor (ponto 1)	Ausente	Ausente
6	Flor de couve-flor (ponto 1)	Presente	Ausente
7	Solo rizosférico de repolho (Ponto 1)	Presente	Ausente
8	Solo rizosférico de brócolis (ponto 1)	Presente	Ausente
9	Solo rizosférico de brócolis (ponto 2*)	Presente	Presente

*Ponto1 e Ponto2 estão 200 metros distantes na mesma propriedade.

Tabela 2. Especificidade do bacteriófago ϕ Xacp1 em diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* e isolados não relacionados filogeneticamente.

Isolado	Hospedeiro	Estado/ Região	Bacteriófago		Fonte
			S	R	
ISOLADOS DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>					
X01	Repolho	PR/Sul		+	CCLB/UFV
X03	Couve	SC/Sul	+		CCLB/UFV
UFPR2	Brócolis	PR/Sul		+	CCLB/UFV
UFPR3	Repolho	PR/Sul		+	CCLB/UFV
UFPR4	Repolho	PR/Sul		+	CCLB/UFV
UFPR5	Couve	PR/Sul		+	CCLB/UFV
XCC_AL	Brócolis	MG/Sudeste	+		CCLB/UFV
XCC_MG	Couve-flor	MG/Sudeste	++		CCLB/UFV
XCC-BRA_1.2	Couve-flor	PE/Nordeste	+ -		CCMLF/UFRPE
XCC_2.4	Couve-flor	PE/Nordeste		+	CCMLF/UFRPE
XCC.DMB001	Couve-flor	MG/Sudeste	+		Silva, F. P.
OUTRAS BACTÉRIAS					
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Tomateiro	MG/Sudeste		+	CCMLF/UFRPE
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	Videira	PE/Nordeste		+	Xavier, A. S.
<i>Raltonia solanacearum</i>	Eucalipto	BA/Nordeste		+	CCLB/UFV
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Tomateiro	MG/Sudeste		+	CCLB/UFV
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Tabaco	MG/Sudeste		+	CCLB/UFV
<i>Pectobacterium brasilienses</i>	Batata	MG/Sudeste		+	CCMLPF/UFV
<i>Erwinia psidii</i>	Eucalipto	MS/Sul		+	CCMLPF/UFV
<i>Escherichia coli</i> Stb14 <i>eletromax</i>		+	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> DH10B		+	Invitrogen
Controle com suspensão de XCC.DMB001	Couve-flor	Silva, F. P.
Controle com suspensão do bacteriófago	Silva, F. P.

S Suscetibilidade: (++) Muito suscetível, (+) Moderadamente suscetível, (+-) Pouco susceptível; R (+) Resistência;

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (A) Folhas de brócolis com sintomas típicos da podridão negra das brássicas. (B) Características macroscópicas da colônia de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (C e F) Amplificação específica do gene *hrpF* (535 kbp) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolado em Coimbra-MG. M: 1Kb DNA ladder; Xcv, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*; Xv, *Xanthomonas vesicatoria*; XccBRA 1.2, *Xanthomonas campestris* pv *campestris* BRA 1.2; Xcc.DMB001 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolado em Coimbra-MG; Xcc.DMB001 a, não inoculada no ensaio de Koch; Xcc.DMB001 d, reisolada após a inoculação. (D e E) Teste de patogenicidade em couve manteiga com sintomas da podridão negra das brássicas.

Figura 02: Características morfológicas e genotípicas do bacteriófago isolado em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. (A) Aspecto morfológico das placas de lise do bacteriófago propagado no isolado Xcc.DMB001 (barra corresponde a 5 mm). (B) Micrografia eletrônica da partícula do bacteriófago, contrastada com acetato de uranila 0,5% (barra corresponde a 200 nm). (C) Digestão enzimática do genoma do bacteriófago (DNA NT, DNA do fago não tratado). (D). PFGE com diferentes concentrações do DNA genômico do bacteriófago (M, Pulse MarkerTM; Fago (a), [400 ng]; Fago, b [800 ng]).

Figura 03: Padrão morfológico da suscetibilidadesusceptibilidade de diferentes isolados de Xcc na infecção do bacteriófago (a) X03 (+); (b) Xcc.DMB001 (+); (c) Xcc_MG (++); (d) Xcc_AL (+); (e) Xcc_BRA1.2 (+ -) e (f) Xcc_ 2.4 - Resistente (+)

FIGURAS

Figura 1

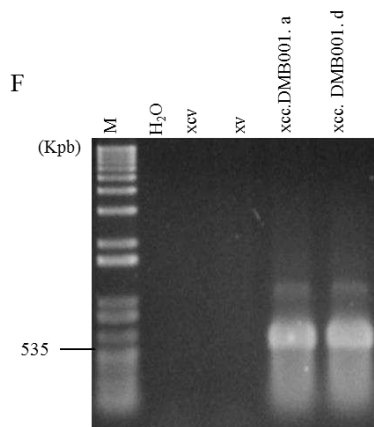
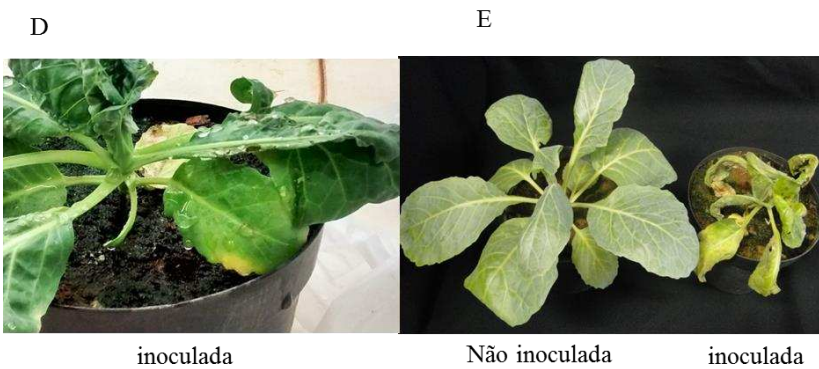
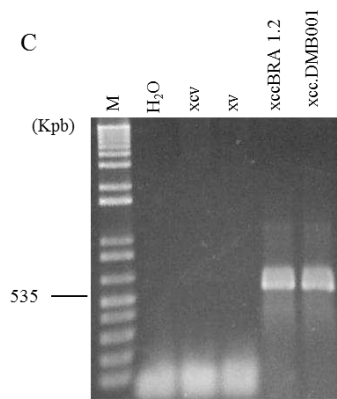
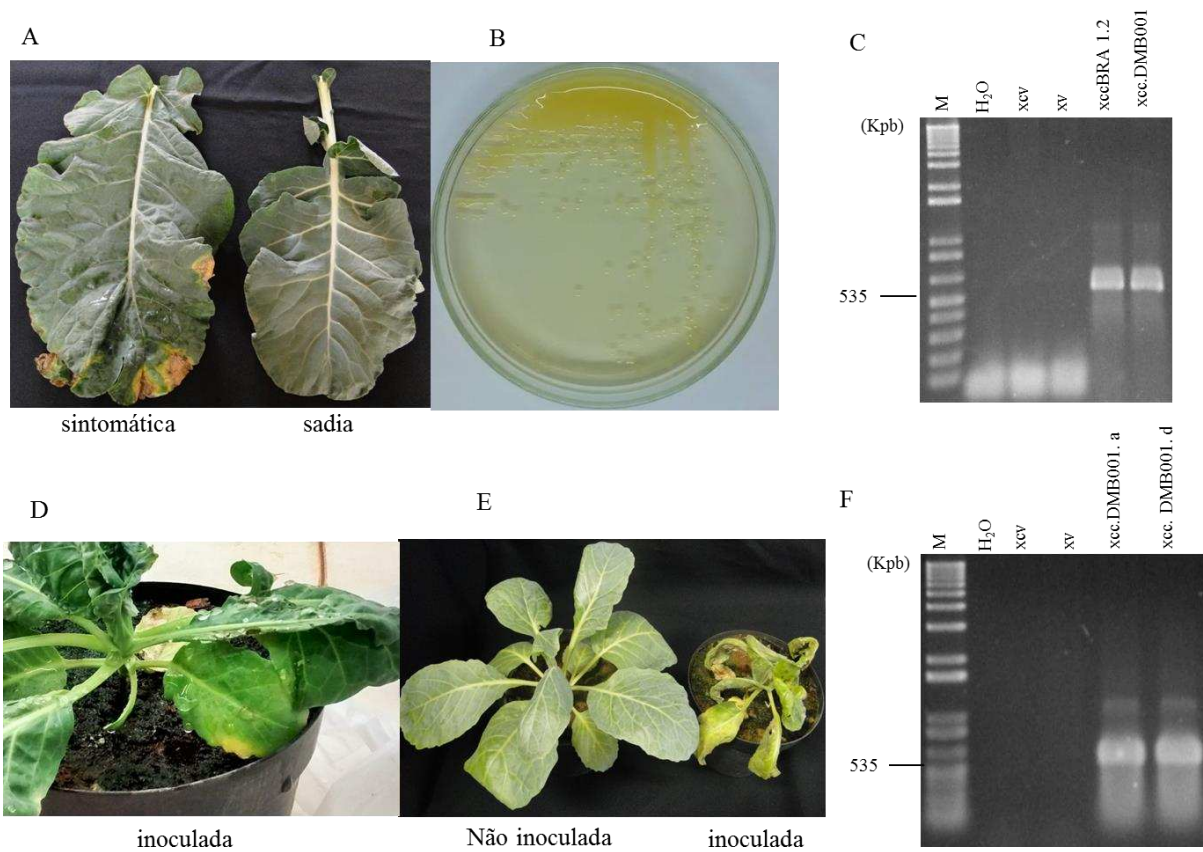


Figura 2

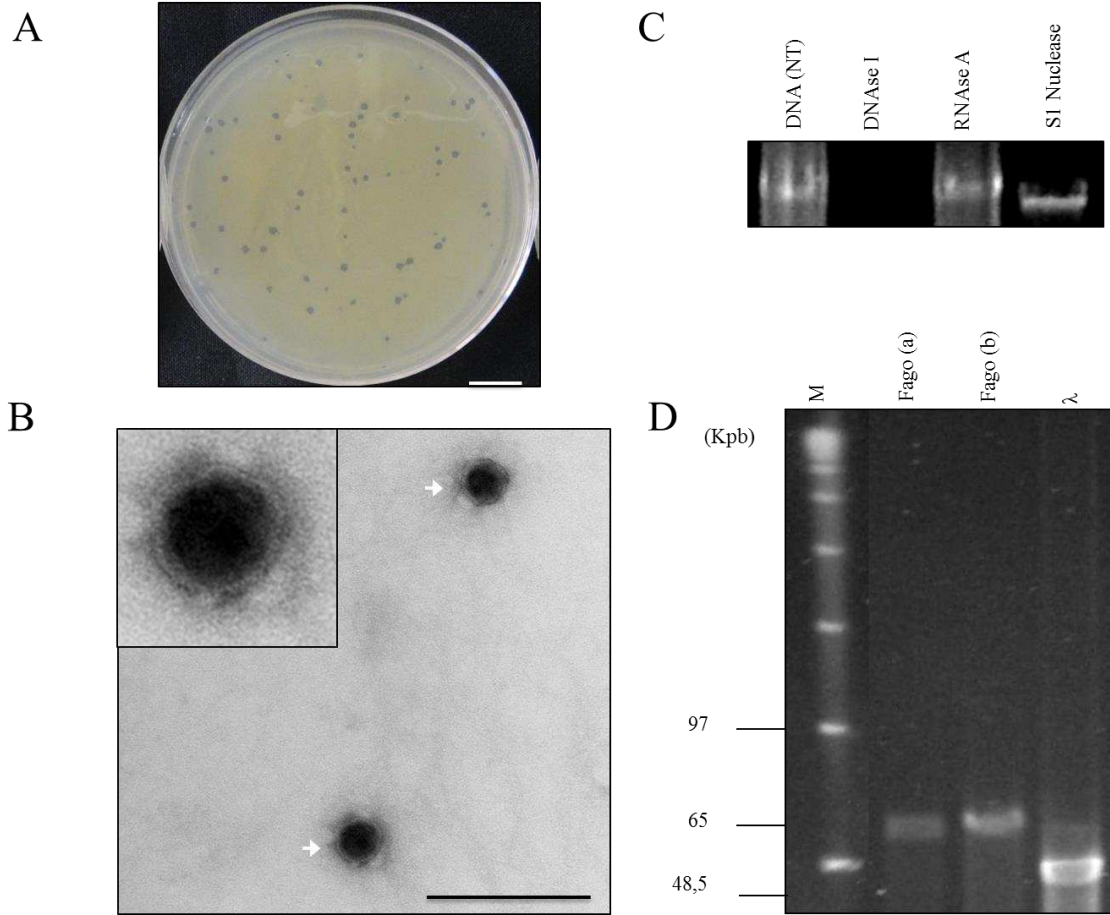
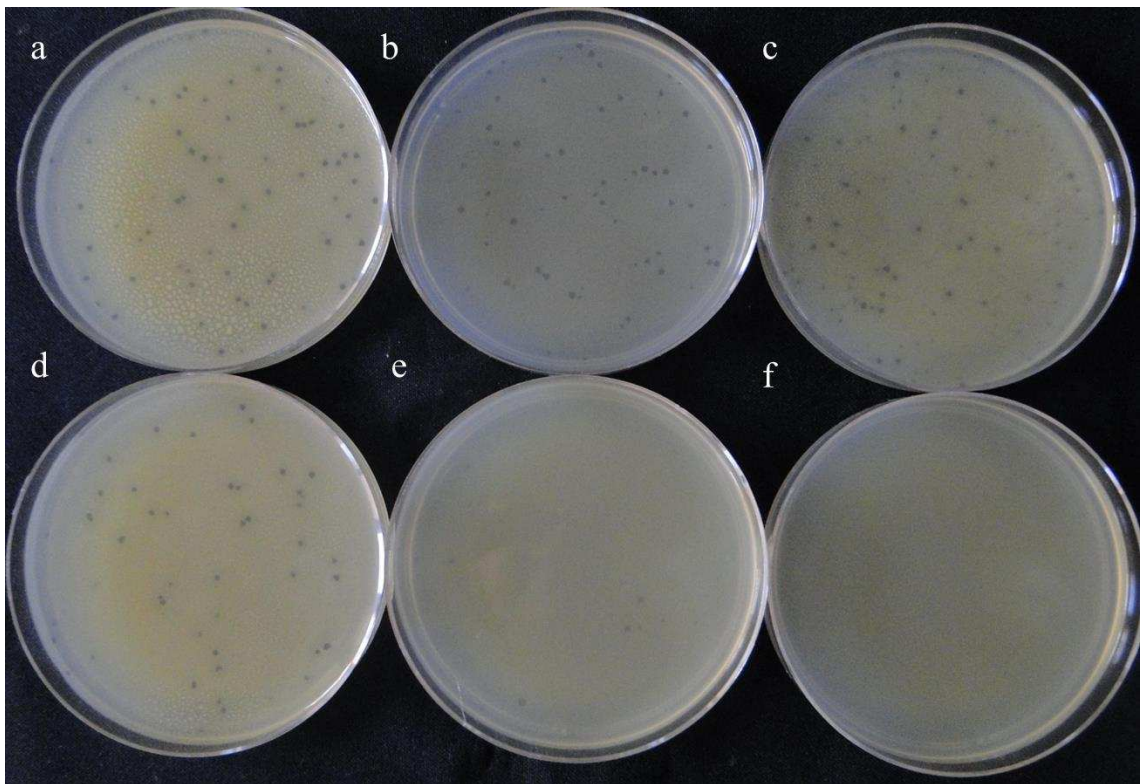


Figura 3



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedon, S.** (1989) Selection for bacteriophage latent period length by bacterial density: A theoretical examination. *Microbial Ecology*, **18**, 79-88.
- Abedon, S.T.** (2006) *The bacteriophages* 2 edn. Oxford, New York: Oxford University Press.
- Abedon, S.T. and Yin, J.** (2009) Bacteriophage plaques: theory and analysis. *Methods in Molecular Biology*, **501**, 161 - 174.
- Ackermann, H.W. and Prangishvili, D.** (2012) Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol*, **157**, 1843-1849.
- Ahern, S.J., Das, M., Bhowmick, T.S., Young, R. and Gonzalez, C.F.** (2014) Characterization of novel virulent broad-host-range phages of *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas*. *J Bacteriol*, **196**, 459-471.
- Ahmad, A.A., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M. and Yamada, T.** (2014b) The filamentous phage XacF1 causes loss of virulence in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, the causative agent of citrus canker disease. *Front Microbiol*, **5**, 321.
- Ahmad, A.A., Ogawa, M., Kawasaki, T., Fujie, M. and Yamada, T.** (2014a) Characterization of bacteriophages Cp1 and Cp2, the strain-typing agents for *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *Appl Environ Microbiol*, **80**, 77-85.
- Albuquerque, G.M., Santos, L.A., Felix, K.C., Rollemberg, C.L., Silva, A.M., Souza, E.B., Cellier, G., Prior, P. and Mariano, R.L.** (2014) Moko Disease-Causing Strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil Extend Known Diversity in Paraphyletic Phylotype II. *Phytopathology*, **104**, 1175-1182.
- Andrade, L.A.F.** (2010) Bacteriófagos e sua aplicabilidade no controle de populações microbianas. In *Programa de Pós-Graduação em Microbiologia*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Balogh, B., Jones, J.B., Iriarte, F.B. and Momol, M.T.** (2010) Phage therapy for plant disease control. *Curr Pharm Biotechnol*, **11**, 48-57.
- Duckworth, D.H.** (1976) "Who discovered bacteriophage?". *Bacteriol Rev*, **40**, 793-802.
- Gallet, R., Kannoly, S. and Wang, I.N.** (2011) Effects of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC Microbiol*, **11**, 181.
- Haq, I., Chaudhry, W., Akhtar, M., Andleeb, S. and Qadri, I.** (2012) Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal*, **9**, 9.
- Heller, K.J.** (1992) Molecular interaction between bacteriophage and the gram-negative cell envelope. *Arch Microbiol*, **158**, 235-248.
- Hung, C.H., Wu, H.C. and Tseng, Y.H.** (2002) Mutation in the *Xanthomonas campestris* xanA gene required for synthesis of xanthan and lipopolysaccharide drastically reduces the efficiency of bacteriophage (phi)L7 adsorption. *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 338-343.
- Iriarte, F.B., Balogh, B., Momol, M.T., Smith, L.M., Wilson, M. and Jones, J.B.** (2007) Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1704.
- Iriarte, F.B., Obradovic, A., Wernsing, M.H., Jackson, L.E., Balogh, B., Hong, J.A., Momol, M.T., Jones, J.B. and Vallad, G.E.** (2012) Soil-based systemic delivery and phyllosphere in vivo propagation of bacteriophages: Two possible strategies for improving bacteriophage persistence for plant disease control. *Bacteriophage*, **2**, 215-224.

- Kado, C.I. and Heskett, M.G.** (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, **60**, 969-976.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J.** (2012) *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* London, UK: Elsevier.
- Liew, k.M. and Alvarez, A.M.** (1981) Biological and morphological characterization of *Xanthomonas campestris* bacteriophages. *Specil Topics*, **71**, 269-273.
- Lin, N.T., Liu, T.J., Lee, T.C., You, B.Y., Yang, M.H., Wen, F.S. and Tseng, Y.H.** (1999) The adsorption protein genes of *Xanthomonas campestris* filamentous phages determining host specificity. *J Bacteriol*, **181**, 2465-2471.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P.** (2010) *Microbiologia de Brock* 12 edn.
- MOERS, E.M., KUHN, O.J., GONÇALVES JR., A.C., FRANZENER, G. and STANGARLIN, J.R.** (2012) Levantamento de doenças na cultura do crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) na região oeste do Paraná. *Scientia Agraria Paranaensis*, **11**, 35-48.
- Park, Y.J., Lee, B.M., Ho-Hahn, J., Lee, G.B. and Park, D.S.** (2004) Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* by PCR using species-specific primers based on *hrpF* gene sequences. *Microbiol Res*, **159**, 419-423.
- Paz, I.C.P.** (2009) As folhas sintomáticas foram maceradas e alíquotas dessa suspensão foram utilizadas para o isolamento da colônia a partir da técnica de esgotamento por estria composta. In *Programa de Pós Graduação em Fitotecnia*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pp. 129.
- Romero-Suarez, S., Jordan, B. and Heinemann, J.A.** (2012) Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the causal agent of walnut blight disease. *World J Microbiol Biotechnol*, **28**, 1917-1927.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001) *Molecular Cloning - A laboratory Manual* 3 edn.: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Santos, L.A.a.d., Bandeira, D.d.A., Silva, J.P.d., Silveira, E.B.d., Gomes, A.a.M.A. and Mariano, R.d.L.R.** (2008) Caracterização de isolados de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* de sistemas de produção orgânico e reação de brássicas à podridão-negra. *Horticultura Brasileira*, **26**, 486-491.
- Santos, S., Carvalho, C., Sillankorva, S., Nicolau, A., Ferreira, E. and Azeredo, J.** (2009) The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC Microbiology*, **9**, 148.
- Schofield, D.A., Bull, C.T., Rubio, I., Wechter, W.P., Westwater, C. and Molineux, I.J.** (2012) Development of an engineered bioluminescent reporter phage for detection of bacterial blight of crucifers. *Appl Environ Microbiol*, **78**, 3592-3598.
- Su, W.C., Tung, S.Y., Yang, M.K. and Kuo, T.T.** (1999) The *pilA* gene of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* is required for infection by the filamentous phage cf. *Mol Gen Genet*, **262**, 22-26.
- Tseng, Y.H., Lo, M.C., Lin, K.C., Pan, C.C. and Chang, R.Y.** (1990) Characterization of filamentous bacteriophage phi Lf from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Gen Virol*, **71 (Pt 8)**, 1881-1884.
- Yamada, T., Kawasaki, T., Nagata, S., Fujiwara, A., Usami, S. and Fujie, M.** (2007) New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Microbiology*, **153**, 2630-2639.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi isolado e caracterizado um novo bacteriófago lítico denominado ϕ Xacp1 a partir da fitobactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, com características semelhantes aos membros da família *Podoviridae*, apresentando alto nível de especificidade e virulência em isolados de Xcc oriundas da mesma regiões geográficas ou próximas. Análise das informações do sequenciamento e teste de patogenicidade poderá sugerir o potencial uso do fago Xacp1 no biocontrole da podridão negra das brássicas.