

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - PPGAG

YANIRA LIZZETH LIMÓN CARRIÓN

**ISOLAMENTO, BIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
BACTERIÓFAGOS PARA O MANEJO DA MURCHA-BACTERIANA DO
TOMATEIRO**

ALEGRE – ES

2022

YANIRA LIZZETH LIMÓN CARRIÓN

**ISOLAMENTO, BIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
BACTERIÓFAGOS PARA O MANEJO DA MURCHA-BACTERIANA DO
TOMATEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia- PPGAG, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, na área de concentração Produção Vegetal, Linha de Pesquisa Proteção Sustentável de Plantas (Fitopatologia).

Orientador: Prof. Dr. André da Silva Xavier

Coorientadores: Prof. Dr. Willian Bucker Moraes

Dra. Fernanda Pereira da Silva

ALEGRE – ES

2022

YANIRA LIZZETH LIMÓN CARRIÓN

**ISOLAMENTO, BIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
BACTERÍOFAGOS PARA O MANEJO DA MURCHA-BACTERIANA DO
TOMATEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, na área de concentração Produção Vegetal, Linha de Pesquisa Proteção Sustentável de Plantas (Fitopatologia).

Aprovada em 11 de fevereiro de 2022.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Willian Bucker Moraes
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno - PPGAG-Ufes

Profa. Dra. Cíntia dos Santos Bento
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Externo - PPGM-Ufes

Profa. Dra. Ana Elisa Silvera Pérez
Universidade da República Uruguay
Membro Externo - UDeLaR (Uruguay)

Prof. Dr. André da Silva Xavier
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Dedico

A Deus; sem ele eu não teria força e determinação para desenvolver este trabalho.

Aos meus pais Máximo e Reyna, pois graças aos seus esforços, hoje posso concluir o meu curso de pós graduação.

Ao meu orientador, o professor Dr. André da Silva Xavier, sem o qual não teria conseguido concluir esta difícil tarefa.

A quem colaborou diretamente comigo, minha coorientadora, a Dra. Fernanda Silva, sem a qual eu não teria concluído este projeto.

Todo sucesso é fruto de um grande trabalho em equipe. A todos meus amigos da pós-graduação e parceiros do Laboratório de Virologia e Biocontrole de Doenças de Plantas (LAVIB) que fizeram a minha jornada mais completa e feliz.

Dedico este trabalho a todos os que me ajudaram ao longo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Devo minha conquista a Deus, meu coração exulta de gratidão e alegria por mais esta vitória alcançada. Este triunfo não é apenas meu, mas antes é teu Deus!

Aos meus pais, devo tudo, tudo mesmo. Foram eles que me proporcionaram esse caminho que me levou a tantas vitórias!

Querida mãe Maria del Carmen Carrión Maldonado (Reyna), a sua dedicação e o seu amor são os maiores responsáveis pela pessoa que eu me tornei. Eu imagino que muitas vezes não foi fácil seguir, sei que cansou muitas vezes. Hoje eu agradeço por, apesar de todos os obstáculos, ter sempre seguido.

Querido Pai Maximo Limón Salazar, obrigado por ser a minha base, minha inspiração a seguir na luta, você me mostrou seu amor e me deu tudo o que eu poderia pedir a Deus. Sei que abdicou de muitas coisas para cuidar de mim, para me apoiar e para me dar condições financeiras de seguir com os meus sonhos. Obrigado pais por me amarem e terem dedicado tanta energia! Amo vocês com todas as minhas forças.

À minha família, especialmente meus irmãos Daniela, Max Fernando e Carlos Eduardo por acreditarem em mim, meus tios que me deram seu apoio Genaro, Rosa, Vilma e Teresa.

Aos meus amigos de longa data que sempre estiveram comigo me dando força, apesar da distância e do tempo, Vanessa Medrano, Yonny Santos, Gustavo Fernandez (Tato), Miriam Deusy, Noel Gonzales e Lidy Lizarazu.

Aos amigos Donato Montañó, Lucho Gadea, Juan Carlos Alvarez e Ana Isabel Ortiz da Bolívia, que acreditaram no meu potencial e me incentivaram a realizar o sonho de fazer o mestrado no Brasil.

Aos meus professores e especialmente ao meu orientador Prof. Dr. André da Silva Xavier pela ajuda, pelo tempo despendido, pelo conhecimento fornecido e pela valiosa mentoria.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Willian Bucker Moraes e Dra. Fernanda Silva, pela orientação e disponibilidade.

Às minhas amigas Emily Olive, Laura Vaillant e Vanessa Sessa pelo companheirismo e amizade e pelos melhores cafés da tarde, sempre tão dispostas a escutar as lamentações, apoiar-me e tornar os dias mais leves.

À University of Wisconsin-Madison (UW), Université Laval (UL) e Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo apoio financeiro e suporte com a infraestrutura para condução de alguns experimentos.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Agronomia e às agências de fomento a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pelo suporte e a oportunidade para o desenvolvimento desta pesquisa científica.

Ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAÉ-Ufes) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação.

Ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), pelos recursos financeiros e infraestrutura disponibilizados para a condução do projeto.

À comissão examinadora, pela disponibilidade e contribuição na melhoria deste trabalho.

O sucesso não se alcança sozinho, agradeço á todos que me apoiaram e permitiram que este trabalho fosse realizado com sucesso no Brasil, a cada uma das pessoas que me animaram no longo de meu caminho, colegas de laboratório, lunch e café, o apoio que senti ao longo das rotinas de trabalho, dedicação a cada um dos professores deste curso de pós-graduação, a quem dedico este trabalho.

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

Obrigada!

“Teu pior inimigo é a tua própria mente, porque ela é quem sabe todas tuas debilidades.”

(Ever Espinoza)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
INTRODUÇÃO GERAL	15
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO I	23
Isolamento, biologia e caracterização molecular de novos bacteriófagos que infectam isolados do Complexo <i>Ralstonia solanacearum</i> em solos do Espírito Santo, Brasil	23
RESUMO	24
ABSTRACT	26
1.	27
2.	29
2.1 Isolados bacterianos	31
2.1.1 Coleta e obtenção de isolados do Complexo <i>Ralstonia solanacearum</i>	31
2.1.2 Extração de DNA genômico bacteriano	31
2.1.3 "Phylotype-specific multiplex PCR" (Pmx-PCR)	32
2.1.4 Teste de patogenicidade para isolados de <i>R. solanacearum</i> oriundos do Espírito Santo	33
2.1.5 Sequenciamento do mutante RsB70-PC e análises genômicas	33
2.1.5.1	33
2.1.5.2 Seleção dos genes para estudo e busca no genoma de isolado referência	34
2.1.5.3	34
2.1.5.4 Análise comparativa de loci determinantes para a produção de cápsula (EPS)	35
2.2 Isolados virais	35
2.2.1 Coleta das amostras de água e solo	35
2.2.2 Detecção de bacteriófagos através de Spot Test	36
2.2.3 Isolamento, propagação, purificação parcial das partículas virais e preservação	36
2.2.4 Cinética de infecção dos bacteriófagos	37
2.2.5 Gama de hospedeiros dos oitos bacteriófagos	38
2.2.6 Extração e caracterização dos ácidos nucleicos dos bacteriófagos	38
2.2.7 Sequenciamento e análise preliminar dos genomas dos bacteriófagos	39
2.2.8 Análise filogenética	40
2.3 Análises Estatísticas	40

3.	40	
3.1	<i>Os isolados do CRS oriundos do ES pertencem à espécie Ralstonia solanacearum</i>	41
3.2	<i>Distintos solos do ES contém bacteriófagos líticos que infectam Ralstonia solanacearum</i>	42
3.3	<i>Bacteriófagos líticos oriundos do ES apresentam distintos perfis de agressividade</i>	43
3.4	<i>Bacteriófagos oriundos do ES infectam isolados das espécies R. solanacearum e R. pseudosolanacearum e possuem mecanismos de infecção contrastantes</i>	45
3.5		46
3.6	<i>Bacteriófagos oriundos do ES são isolados de uma putativa nova espécie relacionada aos taxa do gênero Bakolyvirus (Família: Myoviridae)</i>	47
4.	CONFLITO DE INTERESSES	49
5.	AGRADECIMENTOS	49
6.	REFERÊNCIAS	50
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

BDB: Blood disease bacterium

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CPG: Cultura Caseína-Peptonas- Glicose 1,5% ágar

CRS: Complexo *Ralstonia solanacearum* ou (RSSC)

DNA: Deoxyribonucleic acid

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Int.: proteína chamada de integrase

SDS: Sulfato Dodecyl de Sódio

SM Buffer: Suspension Buffer (S Buffer)

LAVIB: Laboratório de Virologia Microbiana e Biocontrole de Doenças de Plantas

NCBI: The National Center for Biotechnology Information

NUDEMAFI: Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças

O.D.: Optical Density

PC: “Phenotypic Conversion”

PEG: Polietilenoglicol

Pmx-PCR: método de PCR multiplex

PVDF: Fluoreto de polivinilideno hidrofílico

RPM: Rotações Por Minuto

RNA: Ribonucleic acid

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TAE: Tris-Acetato-EDTA

ToBYMV: Tomato bright yellow mosaic virus

ToBYMoV: Tomato bright yellow mottle virus

ToYYSV: Tomato yellow vein streak virus

UFC: Unidade formadora de colônias

UFP: Unidade formadora de placas de lise

Rs: *Ralstonia solanacearum*

Rps: *Ralstonia pseudosolanacearum*

RESUMO

A murcha-bacteriana ou murchadeira é uma fitobacteriose causada por isolados de no mínimo três espécies de *Ralstonia* pertencentes a um grupo taxonômico heterogêneo conhecido como complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (CRS). É uma das mais importantes fitobacterioses que ocorre em diversas culturas de importância agrônômica como tomateiro, batata inglesa, banana, pimentão, tabaco, eucalipto, dentre outras. Os agentes etiológicos do CRS são exímios habitantes dos solos o que agrava a ineficiência do manejo, pois sobrevivem por longos períodos na ausência da planta hospedeira. Outro fator crítico para o manejo é a ampla diversidade genética das bactérias do CRS e ampla gama de hospedeiros, a antiga classificação hierárquica divide o CRS em quatro grupos filogenéticos que possuem alta correlação com a origem geográfica, indicados como: Filotipo I – Ásia; Filotipo IIA/IIB – Américas; Filotipo III – África e Filotipo IV – Indonésia. Atualmente os quatro filotipos foram elevados à categoria de espécie. No Brasil não existem antibióticos ou qualquer agroquímico registrado para o controle das espécies do CRS presentes nas Américas (*Ralstonia solanacearum* (Filotipo II) e *R. pseudosolanacearum* (Filotipo I)), sendo o combate a essa doença, realizado por meio do manejo integrado, que inclui ações para evitar ferimentos causados por implementos agrícolas, nematoides e insetos, eliminação de plantas cultivadas e não cultivadas doentes, rotação de culturas, entre outros tratamentos culturais, contudo, o manejo da murcha não é efetivo. Pesquisas realizadas tanto na Ásia quanto na América, indicam a potencialidade de inimigos naturais de bactérias, conhecidos como bacteriófagos (vírus benéficos capazes de infectar bactérias patogênicas), para o controle de fitobactérias. Dessa forma, objetivou-se com a presente pesquisa investigar uma alternativa ecológica baseada em fagoterapia (uso de bacteriófagos para manejo de fitobacterioses) para o manejo das espécies do CRS e fortalecer as escassas estratégias para contornar os efeitos da murcha-bacteriana. Especificamente, a atual pesquisa foi embasada na prospecção e caracterização de bacteriófagos líticos capazes de infectar as espécies *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* no Espírito Santo. Coletas de solo, água e plantas em municípios de estados brasileiros, incluindo alguns do Espírito Santo foram realizadas para observar a atividade bacteriolítica associada à vírus e/ou a presença de *Ralstonia* spp. em áreas de cultivo com plantas hospedeiras, não hospedeiras de espécies do CRS, além de áreas de fragmentos florestal. Paralelamente, isolados de espécies do CRS foram coletados para serem utilizados como hospedeiros-isca na bioprospecção viral. Após a detecção da

atividade lítica, oito bacteriófagos (Phage Canuta, Phage Elisiario, Phage Laurinda, Phage Ortiz, Phage Zilma, Phage Kapixawa, Phage Krenak e Phage Zacimba) foram isolados e caracterizados por meio de abordagens biológicas e moleculares. Os isolados de *Ralstonia* sp. coletados foram caracterizados molecularmente e preservados para o teste de gama de hospedeiros. O teste da gama de hospedeiros com um painel de isolados mundiais do CRS mostrou que os bacteriófagos infectam tanto *R. solanacearum* quanto *R. pseudosolanacearum*, porém são mais agressivos quando inoculados em isolados de *R. solanacearum* oriundos do Brasil e mais especificamente as linhagens do Espírito Santo, de onde são originários. Quanto à agressividade acessada pela magnitude lítica durante a fase exponencial de crescimento de *R. solanacearum* RsB70-PC, os bacteriófagos foram classificados em três grupos (Agressividade Baixa, Moderada e Alta). A análise dos genomas completos de pelo menos sete dos bacteriófagos revelou que se tratam de isolados virais de uma nova espécie a ser catalogada e a reconstrução filogenética permitiu inferir que os sete bacteriófagos isolados do Espírito Santo são estreitamente relacionados aos taxa do gênero Bakolyvirus (Família Myoviridae). Com base nos resultados, pode-se concluir que os bacteriófagos apresentam um interessante perfil de atividade lítica contra isolados de *Ralstonia* spp. com potencial de ser explorado biotecnologicamente para ampliar o portfólio de perspectivas ecológicas para manejo integrado da murcha-bacteriana no campo. Futuras análises de caracterização genômica mais detalhada serão conduzidas e reunirão os elementos necessários para viabilizar a aplicação desses agentes de controle biológico ou de seus derivados.

Palavras chave: Controle biológico, Bactérias fitopatogênicas, Fagoterapia, Vírus, Interação bactéria-vírus.

ABSTRACT

Bacterial wilt is a plant disease caused by bacteria strains of at least three species of *Ralstonia* belonging to a heterogeneous taxonomic group known as *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC). It is one of the most important bacterial plant disease that occurs in several crops of agronomic importance such as tomato, potato, banana, pepper, tobacco, eucalyptus, among others. The etiological agents of RSSC are excellent inhabitants of the soil, which aggravates the inefficiency of management, as they survive for long periods in the absence of the host plant. Another critical factor for management is the wide genetic diversity of the RSSC strains and wide range of hosts, the old hierarchical classification divides the RSSC into four phylogenetic groups that have high correlation with the geographic origin, indicated as: Phylotype I – Asia; Phylotype IIA/IIB – Americas; Phylotype III – Africa and Phylotype IV – Indonesia. Currently the four phlotypes have been elevated to the category of species. In Brazil, there are no antibiotics or any agrochemical registered for the control of RSSC strains present in the Americas (*Ralstonia solanacearum* (Phylotype II) and *R. pseudosolanacearum* (Phylotype I)), and the control of this disease is carried out through integrated management, which includes actions to avoid injuries caused by implements, agricultural, nematodes and insects, elimination of weeds and crops with bacterial wilt symptoms, crop rotation among other cultural treatments, however, wilt management is not effective. Research carried out in both Asia and America indicates the potential of natural enemies of bacteria, known as bacteriophages (beneficial viruses capable of infecting pathogenic bacteria), for the control of phyto-bacteria. Thus, the objective of the present research was to investigate an ecological alternative based on phage therapy (use of bacteriophages to manage bacterial plant disease) for the management of RSSC strains and to strengthen the few strategies to circumvent the effects of bacterial wilt. Specifically, the current research was based on the prospection and characterization of lytic bacteriophages capable of infecting the species *R. solanacearum* and *R. pseudosolanacearum* in Espírito Santo. Soil, water and plant collections in municipalities of the Brazilian states, including some in Espírito Santo, were carried out to observe the bacteriolytic activity associated with the virus and/or the presence of *Ralstonia* spp. in cultivation areas with host plants, non-hosts of RSSC strains, in addition to areas of forest fragments. At the same time, isolates of RSSC were collected to be used as bait hosts in viral bioprospecting. After detection of lytic activity, eight bacteriophages (Phage Canuta,

Phage Elisiario, Phage Laurinda, Phage Ortiz, Phage Zilma, Phage Kapixawa, Phage Krenak and Phage Zacimba) were isolated and characterized using biological and molecular approaches. *Ralstonia* sp. collected were molecularly characterized and preserved for host range testing. The host range test with a panel of RSSC strains worldwide showed that bacteriophages infect both *R. solanacearum* and *R. pseudosolanacearum*, but are more aggressive when inoculated into isolates of *R. solanacearum* from Brazil and more specifically the strains from Espírito Santo, where they come from. As for the aggressiveness assessed by the lytic magnitude during the exponential growth phase of *R. solanacearum* RsB70-PC, the bacteriophages were classified into three groups (Low, Moderate and High Aggressiveness). The analysis of the complete genomes of at least seven of the bacteriophages revealed that they deal with viral isolates of a new species to be cataloged and the phylogenetic reconstruction allowed us to infer that the seven bacteriophages isolated in Espírito Santo are closely related to the taxa of the genus Bakolyvirus (Family Myoviridae). Based on the results, it can be concluded that bacteriophages have an interesting profile of lytic activity against isolates of *Ralstonia* spp. with potential to be explored biotechnologically to expand the portfolio of ecological perspectives for integrated management of bacterial wilt in the field. Future analyzes of more detailed genomic characterization will be conducted and will gather the necessary elements to enable the application of these biological control agents or their derivatives.

Keywords: Biological control, Plant pathogenic bacteria, Phage therapy, Virus, Bacteria-virus interaction.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum L.*) é uma hortaliça de alto valor comercial, mundialmente conhecida e pertencente à família das solanáceas (Shirahige, 2010). O cultivo dessa espécie pode ser acometido por diversos fatores, como condições edafoclimáticas e bióticos que influenciam a produção e qualidade dos frutos. Alternativas para contornar essas condições adversas têm sido o cultivo em ambientes protegidos e a ampla variabilidade fenotípica da cultura que permitem a produção em diferentes climas suprindo a demanda do produto em épocas menos favoráveis à sua produção (Pereira 2012). Os frutos são de interesse na culinária, consumo “in natura”, e para o preparo de derivados. Sua produção ocorre em praticamente todas as regiões geográficas do mundo (Naika et al., 2006). É uma cultura com alto valor econômico no Brasil, que tem se destacado nos últimos anos, como um dos dez maiores países produtores desta hortaliça no mundo, com uma produção estimada em 4,0 milhões de toneladas de acordo com a safra de 2020 (IBGE, 2021).

É uma cultura altamente suscetível à fitopatógenos como vírus, fungos, oomicetos, nematoides e bactérias que causam sintomas em diferentes partes da planta, incluindo folhas, frutos, caules, sistema vascular e raízes ocasionando redução da produtividade e/ou a morte da planta. Dentre os principais grupos de doenças podemos destacar as fitonematoses (*Meloidogyne* spp.), Cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), geminiviroses (complexo de espécies do gênero *Begomovirus*, *Tomato bright yellow mosaic virus* (ToBYMV), *Tomato bright yellow mottle virus* (ToBYMoV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYYSV), dentre outros), Murcha-bacteriana (complexo de espécies *Ralstonia solanacearum*), Murcha-de-fusário (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*), Requeima (*Phytophthora infestans*), dentre outras (Naika et al., 2006; Brown et al., 2015).

Dentre as fitobacterioses, a murcha-bacteriana tem sido um problema em determinadas áreas da Região Serrana do estado do Espírito Santo, causando grandes danos nas lavouras de tomate, hortaliça de maior expressão social e econômica no Estado (IBGE, 2008; Borel et al., 2010).

Essa fitobacteriose é de abrangência mundial, ocorrendo em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo. A doença afeta a produção de tomate, batata, amendoim, banana, tabaco dentre outras culturas e é causada independentemente por por no mínimo três espécies de *Ralstonia*, *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* e *R. syzygii*, correspondentes a quatro filotipos pré-estabelecidos do Complexo *R. solanacearum* (CRS). De acordo com Fegan & Prior (2005), os quatro filotipos podem ser diferenciados a partir dos *loci* cromossômicos correspondentes aos genes que codificam os RNAs ribossômicos 16S e 23S. Os filotipos I, II e III são encontrados na Ásia, América e África, respectivamente, enquanto o filotipo IV é encontrado principalmente na Indonésia, Japão, Austrália e Filipinas. Na classificação de Fegan & Prior (2005), o filotipo IV, sendo o mais diverso, agregava as espécies *R. solanacearum*, *R. syzygii* e BDB (blood disease bacterium) que atualmente são reconhecidas subespécies de *R. syzygii*, já os filotipos I, II e III agregavam apenas a espécie *R. solanacearum*, porém foram reestruturados taxonomicamente e agora, os filotipos I e III, são reconhecidos com *R. pseudosolanacearum* e o filotipo II permanece como *R. solanacearum*.

A murcha-bacteriana trata-se de uma doença de difícil manejo devido a várias características intrínsecas dos agentes etiológicos, tais como: sobrevivência por longos períodos no solo (Rossato, 2016), ampla gama de hospedeiros (Genin & Denny, 2012; Rossato, 2016) e uma grande capacidade de dispersão. O principal sintoma da doença é resultante da interrupção parcial ou total do fluxo de água desde as raízes até parte aérea da planta em função da colonização das células bacterianas no tecido vascular. Ao infectar

a planta hospedeira, as fitobactérias se alojam no xilema (Lopes, 2009) e uma vez instaladas, não existem tratamentos curativos (Romeiro, 2005). Essa doença destrutiva, é favorecida pela alta temperatura e umidade do solo, existem relatos de elevadas perdas que variam de acordo com a cultura e genótipos dos patógenos. As bactérias sobrevivem no solo e entram nas raízes das plantas novas através de ferimentos, principalmente ocasionados pelos tratos culturais, a saber, cultivo, transplante, e além disso, insetos ou certos fitonematoides. A disseminação dessas bactérias ocorre por meio da água de irrigação, pela movimentação do solo ou, durante o transplante, através do transporte de plantas infectadas, além de solo contaminado aderido a maquinário e implementos agrícolas ou até mesmo impregnado em calçados (Lopes, 2009).

No Brasil não existem antibióticos ou qualquer agroquímico registrado para o controle de *R. solanacearum* ou *R. pseudosolanacearum* e o brometo de metila utilizado durante vários anos para reduzir populações desses patógenos em solos e substratos foi proibido com base no Protocolo de Montreal, pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Roskopf et al., 2005). Na ausência de medidas eficientes para a supressão desses patógenos, uma vez infectadas as plantas precisam ser eliminadas, porém estratégias como a rotação de culturas, solarização do solo, manejo da água, sanitização do material utilizados nos tratos culturais têm auxiliando na redução dos impactos dessa fitobacteriose no campo (Romeiro, 2005; Kurozawa et al., 2005).

O biocontrole de fitobacterioses utilizando vírus (bacteriófagos) surge na agricultura como um potencial recurso para integrar o manejo complexo dessas doenças e vem sendo explorado nos últimos anos. Atualmente, já existem disponíveis no mercado alguns biopesticidas produzidos pela empresa OmniLytics, registrados nos Estados Unidos como o AgriPhage™ da Certis USA, AgriPhage™-Bactericide, AgriPhage™-

CMM, AgriPhage™-Fire Blight e o AgriPhage™-Citrus Canker (Business Wire, 2018), mas nenhum desses produtos tem por alvo as espécies do CRS.

O potencial de alguns bacteriófagos em limitar eficientemente a colonização de espécies do CRS e garantir a proteção contra a doença (Fujiwara et al., 2011; Addy et al., 2012) tem aumentado gradativamente as expectativas para implementação dessa alternativa no manejo da murcha-bacteriana na Ásia e recentemente na América (Xavier et al., 2018).

Os bacteriófagos são vírus que infectam exclusivamente bactérias, e podem ser encontrados e coletados em várias amostras ambientais, como água, solo, material vegetal, rochas, dentre outras fontes. Ecologicamente, atuam no controle populacional bacteriano e os mais abundantes da biosfera, os caudados, possuem uma estrutura de capsídeo complexa, formada por uma cabeça, uma cauda e fibras da cauda. Na cabeça está localizado o material genético, já a cauda e as fibras da cauda estão relacionadas com o reconhecimento e ejeção do material genético no interior do citoplasma da célula hospedeira (Calzadilla, 2014).

O termo "comedor de bactérias (Inglês: Bacteriophage)" deriva da capacidade de atuarem como "nanopredadores" que podem romper células do hospedeiro ou mesmo coexistir com ele, dependendo do tipo de ciclo viral. Existem bacteriófagos que apresentam ciclo estritamente lítico, conhecidos como virulentos esses vírus multiplicam-se e causam a lise (ruptura) da célula hospedeira antes da liberação da nova progênie viral, sem integrar-se no cromossomo bacteriano. Já outros bacteriófagos apresentam um ciclo conhecido como lisogênico, nesse caso, o genoma viral integra-se ao cromossomo bacteriano durante a infecção e ambos, genoma viral e DNA cromossomal da bactéria hospedeira, passam a coexistir ao longo do subsequente crescimento bacteriano, como um "parasita molecular", sendo conhecidos como profagos. Existem bacteriófagos que

apresentam tanto ciclo lítico quanto lisogênico, em um estilo de vida alternado, no qual, além de causarem lise do hospedeiro sob determinados estresses/estímulos externos ainda podem integrar-se ao DNA da bactéria, estes são conhecidos como bacteriófagos temperados (Calzadilla, 2014). Na fagoterapia, é crucial que se tenha conhecimento sobre a potencialidade de integração do bacteriófago ao genoma bacteriano, pois essa atividade pode ter consequências negativas para o manejo da fitobacteriose. Por esse motivo, a caracterização genômica de bacteriófagos deve ser um dos primeiros passos antes das propostas de coquetéis virais, pois possibilita identificar se um bacteriófago é unicamente lítico ou se o mesmo apresenta a capacidade de integrar-se ao genoma bacteriano, pois quando lisogênicos, possuem assinaturas genômicas de integração, como por exemplo, o grupo de genes que codificam proteínas Integrase (Int), essas enzimas são mediadoras de eventos recombinogênicos entre o DNA do bacteriófago e o de seu hospedeiro em sítios específicos (Khal, 2016).

A potencialidade desses agentes terapêuticos e a crescente demanda por práticas sustentáveis estimulam a ressurgência no interesse pela utilização desses vírus benéficos na agricultura, particularmente à luz do aumento da resistência bacteriana aos antibióticos e o acúmulo de resíduos advindos do uso indiscriminado dos agrotóxicos (Balogh et al., 2010). Atualmente, apesar da importância da murcha-bacteriana no país, o controle biológico mediado por vírus na agricultura não tem sido amplamente investigado, expondo uma lacuna científica sobre uma prática que tem potencial de fortalecer o manejo integrado de fitobacterioses em território nacional.

REFERÊNCIAS

1. Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. (2012). Loss of virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by ϕ RSM filamentous phages. *Phytopathology* 102, 469–477.
2. Balogh, B., Jones, J. B., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2010). Phage therapy for plant disease control. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 48-57.
3. Borel, R. M. A., Abaurre, M. E. O., & CARMO, C. (2010). Características socioeconômicas do cultivo do tomateiro no estado do Espírito Santo. *Tomate*. Vitória-ES: Incaper, 69-84.
4. Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C. & Varsani, A. (2015). Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 160(6), 1593-1619.
5. Business Wire, AgriPhage™-Fire Blight and AgriPhage™-Citrus Canker Approved for Use to Control Bacterial Disease in Citrus and Pome Fruit. 2018. Disponível em: <
<https://www.businesswire.com/news/home/20181009005359/en/AgriPhage%E2%84%A2-Fire-Blight-and-AgriPhage%E2%84%A2-Citrus-Canker-Approved-for-Use-to-Control-Bacterial-Disease-in-Citrus-and-Pome-Fruit>>
6. Calzadilla, R. E. H., & González, L. C. (2014). Uso de los bacteriófagos en el sector agropecuario. *Revista Científica Agroecosistemas*, 2(2).
7. da Silva Xavier, A., da Silva, F. P., Vidi gal, P. M. P., Lima, T. T. M., de Souza, F. O., & Alfenas-Zerbini, P. (2018). Genomic and biological characterization of a new member of the genus Phikmvirus infecting phytopathogenic *Ralstonia* bacteria. *Archives of Virology*, 163(1 2), 3275-3290.
8. Fegan, M., & Prior, P. (2005). How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*, 1, 449-61.
9. Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4155-4162.

10. Genin, S., & Denny, T. P. (2012). Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 67-89.
11. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: levantamento sistemático da produção agrícola: estatística da produção agrícola 2021. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>.
12. IBGE. Quantidade produzida, valor da produção, área plantada e área colhida da lavoura temporária: tomate. Espírito Santo, 2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>.
13. Khal, A. (2016). Isolamento e caracterização genômica de bacteriófagos quanto ao seu potencial de uso terapêutico em infecções causadas por enterobactérias (Doctoral dissertation)
14. Kurozawa, C., Pavan, M. A. Krause-Sakate, R. (2005) Doenças das solanáceas. In: Kimati, H., Amorin, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A., Rezende J. A. M. (eds). Manual de Fitopatologia- Doenças das plantas cultivadas. p 589-596 . Editora Ceres, São Paulo, Brasil.
15. Lopes, C. A. (2009). Murcha-bacteriana ou murchadeira: uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
16. Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., & Griffiths, M. W. (2001). Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 64(7), 927-933.
17. Naika, B. V., Goffau, M. D., Lidth de Jeude, J. V., & Dam. (2006). A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. Agrodok.
18. Pereira, F. (2012). Produção de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) reutilizando substratos sob cultivo protegido no município de Iranduba-AM, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.
19. Romeiro, R. S. Bactérias Fitopatogênicas. (2005) 2^a. ed. Viçosa: Editora UFV, 417p.

20. Rossato, M. (2016) Espécies de *Ralstonia* no Brasil: caracterização fenotípica, molecular, novas fontes de resistência em tomateiro e patogenicidade em cafeeiro.
21. Roskopf, E. N., Chellemi, D. O., Kokalis-Burelle, N., & Church, G. T. (2005). Alternatives to methyl bromide: A Florida perspective. *Plant Health Progress*, 6(1), 19.
22. Shirahige, F. H., de Melo, A. M., Purquerio, L. F. V., Carvalho, C. R. L., & de Melo, P. C. T. (2010). Produtividade e qualidade de tomates Santa Cruz e Italiano em função do raleio de frutos. *Horticultura Brasileira*, 28, 292-298.

CAPÍTULO I

Isolamento, biologia e caracterização molecular de novos bacteriófagos que infectam isolados do Complexo *Ralstonia solanacearum* em solos do Espírito Santo, Brasil

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Brazilian Journal of Microbiology*
seção: *Soil and Agricultural Microbiology*

Isolamento, biologia e caracterização molecular de novos bacteriófagos que infectam isolados do Complexo *Ralstonia solanacearum* em solos do Espírito Santo, Brasil

Yanira Lizzeth Limón Carrión^{1,3}, Connor G. Hendrich^{2,3}, Fernanda Pereira da Silva¹, Lucas Romao Gava¹, Vanessa Sessa Dian¹, Olivia Steidl², Alícia Dutra de Oliveira Moreira¹, Wilian Rodrigues Ribeiro¹, Willian Bucker Moraes¹, Caitilyn Allen^{2*} and André da Silva Xavier^{1,4*}

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 29500-000, Brazil

²Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, 53706, USA

³Esses autores tiveram contribuição equivalente.

*Autores para correspondência: andre.s.xavier@ufes.br (André da Silva Xavier) e caitilyn.allen@wisc.edu (Caitilyn Allen)

RESUMO

A murcha-bacteriana é uma fitobacteriose que ocorre em importantes espécies cultivadas, como o tomateiro, batata, banana e eucalipto. Um dos principais entraves para o manejo dessa doença é a ausência de métodos eficazes para a supressão dos agentes etiológicos, membros das espécies do Complexo *Ralstonia solanacearum* (CRS). Como uma abordagem sustentável, a fagoterapia, que utiliza vírus específicos para combater bactérias, conhecidos como bacteriófagos, vem se mostrando promissora contra diversas fitobacterioses em diferentes continentes, incluindo a murcha-bacteriana em solanáceas. Dessa forma, objetivou-se com esta pesquisa isolar e caracterizar bacteriófagos capazes de infectar as espécies do CRS que ocorrem na América (*R. solanacearum* (Rs) e *R. pseudosolanacearum* (Rps)). Coletas de solo, água e plantas foram conduzidas nos Estados de Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES) e Pernambuco (PE) para acessar a atividade bacteriolítica nas respectivas fontes amostrais. Das noventa e duas amostras Estados de Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES) e Pernambuco (PE) para acessar a atividade bacteriolítica nas respectivas fontes amostrais. Das noventa e duas amostras filtradas e submetidas a ensaios de Spot test em CPG dupla camada contendo isolados- isca de Rs, dez demonstraram forte atividade lítica, indicando a presença viral. Apenas oito bacteriófagos foram recuperados e preservados após os procedimentos de detecção, isolamento e purificação para os testes subsequentes. Em homenagem a líderes e princesas de origem africana escravizados em terras capixabas, quilombolas, povos

originários e lideranças femininas ao longo da história do Espírito Santo, coube a equipe envolvida nessa pesquisa, nomear os oito bacteriófagos isolados como: Phage Zacimba, Phage Laurinda, Phage Ortiz, Phage Kapixawa, Phage Krenak, Phage Zima, Phage Elisiario e Phage Canuta. A caracterização biológica dos oito bacteriófagos compreendeu caracterização morfológica das placas de lise, gama de hospedeiros e monitoramento da agressividade viral. Os bacteriófagos apresentam placas de lise de diâmetro variando entre 1,5-2,4mm e infectam ambas espécies Rs e Rps em um painel de isolados mundiais do CRS, no entanto são mais agressivos quando inoculados em isolados de Rs do Brasil, especificamente os oriundos do ES. Quanto à agressividade, foram classificados em três grupos: Baixa, Moderada e Alta de acordo com a magnitude lítica para declinar a densidade óptica bacteriana durante a fase exponencial do hospedeiro RsB70-PC. Os ácidos nucleicos de sete bacteriófagos, com exceção do Phage Zacimba, devido a limitações encontradas para o isolamento do material genético, foram caracterizados como DNAs de fita dupla (dsDNA), após tratamento enzimático com RNase, DNase e S1 nuclease. O sequenciamento e a montagem do genoma dos sete bacteriófagos permitiu inferir sobre os comprimentos aproximados dos genomas, em torno de 46.000 pb. Análises de similaridade nucleotídica (%) utilizando a ferramenta BlastN da plataforma NCBI com os genomas completos indicam que os sete bacteriófagos devem se tratar de isolados de uma nova espécie da família Myoviridae, estreitamente relacionada com membros do gênero Bakolyvirus. A filogenia utilizando a conservada proteína capsidial principal “Major Capsid protein” reconstruída com taxa pertencentes a várias famílias virais reforçou as observações prévias do posicionamento taxonômico provisório. Análises genômicas complementares irão fornecer elementos importantes sobre um potencial novo agente de controle biológico que poderá auxiliar nas propostas de manejo sustentável da murcha-bacteriana.

Palavras chave: Bactérias fitopatogênicas, Murcha-bacteriana, Fagoterapia, Myovírus, Interação bactéria-vírus.

ABSTRACT

Bacterial wilt is a plant disease that occurs in important crop species, such as tomato, potato, banana and eucalyptus. One of the main obstacles to the management of this bacterial plant disease is the lack of effective methods for suppressing the etiological agents, members of the species of the *Ralstonia solanacearum* Complex (RSSC). As a sustainable approach, phage therapy, which uses specific viruses to fight bacteria, known as bacteriophages, has shown promise against several bacterial plant disease on different continents, including bacterial wilt in nightshades. Thus, the objective of this research was to isolate and characterize bacteriophages capable of infecting RSSC strains that occur in America (*R. solanacearum* (*Rs*) and *R. pseudosolanacearum* (*Rps*)). Soil, water and plant collections were carried out in the states of Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES) and Pernambuco (PE) to assess the bacteriolytic activity in the respective sample sources. Of the ninety-two samples filtered and subjected to Spot test assays in double layer CPG containing *Rs*-bait strains, ten showed strong lytic activity, indicating the presence of viruses. Only eight bacteriophages were recovered and preserved after detection, isolation and purification procedures for subsequent tests. In honor of African leaders and princesses enslaved in Espírito Santo lands, quilombolas, native peoples and female leaders throughout the history of Espírito Santo, the team involved in this research was responsible for naming the eight isolated bacteriophages as: Phage Zacimba, Phage Laurinda, Phage Ortiz, Phage Kapixawa, Phage Krenak, Phage Zima, Phage Elisario and Phage Canuta. The biological characterization of the eight bacteriophages comprised morphological characterization of lysis plaques, host range and monitoring of viral aggressiveness. Bacteriophages present lysis plaques with a diameter ranging from 1.5-2.4mm and infect both *Rs* and *Rps* species in a panel of RSSC strains worldwide, however they are more aggressive when inoculated into *Rs* strains from Brazil, specifically those from ES. As for aggressiveness, they were classified into three groups: Low, Moderate and High according to the lytic magnitude to decline bacterial optical density during the exponential phase of the host *Rs*B70-PC. Nucleic acids from seven bacteriophages, with the exception of Phage Zacimba, due to limitations found in phage nucleic acid isolation procedures, were characterized as double-stranded DNA (dsDNA), after enzymatic treatment with RNase, DNase and S1 nuclease. The sequencing and assembly of the genome of the seven bacteriophages allowed inferences about the approximate lengths of the full genome, around 46,000 bp. Nucleotide similarity analyzes (%) using the BlastN tool of the NCBI platform with complete genomes indicate that the seven bacteriophages must deal with isolates of a new species of the *Myoviridae* family, closely related to members of the *Bakolyvirus* genus. The phylogeny using the conserved major capsid protein reconstructed with taxa belonging to several viral families reinforced the previous observations of the provisional taxonomic positioning. Complementary genomic analyzes will provide important insights into a potential new biological control agent that could assist in proposals for the sustainable management of bacterial wilt.

Key words: Plant pathogenic bacteria, Bacterial wilt, Phage therapy, Myoviruses, Bacterial-virus interaction.

1. INTRODUÇÃO

Ralstonia solanacearum compreende um complexo bacteriano denominado de Complexo *Ralstonia solanacearum* (CRS), constituído por três espécies, *R. syzygii*, *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* (Fegan & Prior, 2005). O CRS é geneticamente composto por quatro filotipos que podem ser diferenciados a partir dos *loci* cromossomais correspondentes aos genes que codificam os RNAs ribossomais 16S e 23S. Os filotipos I, II e III são encontrados na Ásia, América e África, respectivamente, enquanto o filotipo IV é encontrado principalmente na Indonésia, Japão, Austrália e Filipinas. Na classificação de Fegan & Prior (2005), o filotipo IV, abrigava o mais diverso painel de isolados, agregava as espécies *R. solanacearum*, *R. syzygii* e BDB (blood disease bacterium), que atualmente são reconhecidas subespécies de *R. syzygii*. Já os filotipos I, II e III que agregam apenas isolados da espécie *R. solanacearum*, foram reestruturados taxonomicamente e agora, os filotipos I e III, são reconhecidos com *R. pseudosolanacearum* e o filotipo II permanece como *R. solanacearum* (Paudel et al., 2020).

As bactérias pertencentes às espécies *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* desempenham um importante papel econômico em uma ampla gama de hospedeiros no mundo todo. São mais de 200 espécies de plantas acometidas, dentre elas o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), causando a doença conhecida como murcha-bacteriana (Prior et al., 2016). O ciclo da doença se inicia quando as bactérias infectam as plantas por meio das raízes, colonizam o sistema vascular (xilema), e por meio de diversos mecanismos fisiológicos obstruem os vasos causando a murcha (Prior et al., 2016).

O estabelecimento da murcha-bacteriana no campo se deve às particularidades de espécies do CRS, como a sobrevivência por longos períodos em associação com hospedeiros alternativos no campo, facilidade de disseminação pelo solo, água de irrigação, água de superfície, equipamentos agrícolas e material biológico infectado, além da ampla gama de hospedeiros (Mansfield et al., 2012). Os métodos existentes para realizar o manejo da murcha-bacteriana possuem eficácia limitada, o que dificulta o manejo que continua a ser um problema economicamente sério para a produção em muitas regiões do mundo, especialmente as tropicais e subtropicais (Wicker et al., 2007; Sagar et al., 2014; Wei et al., 2017).

No Brasil não existem antibióticos ou qualquer agroquímico registrado para o controle de *R. solanacearum* ou *R. pseudosolanacearum* e o brometo de metila utilizado durante vários anos para reduzir populações desses patógenos em solos e substratos foi proibido com base no Protocolo de Montreal, pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Roskopf et al., 2005). Não existem medidas adequadas para o manejo dessa fitobacteriose e uma vez infectadas as plantas precisam ser eliminadas. (Romeiro, 2005; Kurozawa, Krause-Sakate, 2005).

Considerando as dificuldades encontradas para realizar o controle de fitopatógenos de importância agrícola como *R. solanacearum*, propostas de biocontrole tem ganhado destaque, dentre elas a aplicação de bacteriófagos líticos, por meio de um método denominado de fagoterapia (Doss, et al., 2017). A fagoterapia é um método de controle de fitobacterioses mediado por vírus (bacteriófagos) que se automultiplicam em células bacterianas e são altamente específicos (Modi, 2001). O potencial de alguns bacteriófagos em limitar eficientemente a colonização dessas bactérias e garantir a proteção contra a doença (Fujiwara et al., 2011; Addy et al., 2012) tem aumentado gradativamente as expectativas para implementação dessa alternativa no manejo da murcha-bacteriana na Ásia e recentemente na América (da Silva Xavier et al., 2018).

Existem inúmeros estudos relatando uma alta diversidade de bacteriófagos que infectam isolados de *R. solanacearum* isoladas. Em um dos trabalhos foram relatados 72 fagos na Coreia e dentre eles, o bacteriófago RpY1, pertencente à família *Podoviridae*, que possui uma ampla gama de hospedeiros (Lee SY, et al., 2021). Na América, o fago denominado de Jumbo RsoM2USA foi isolado em solo de um campo de tomateiro na Flórida (EUA), pertencente à família *Myoviridae*, demonstrou uma ampla especificidade pelo hospedeiro e foi eficaz na supressão de isolados do CRS (Ahmad AA et al., 2021). Outro fago lítico capaz de infectar *R. solanacearum* foi completamente sequenciado, na China, um podovírus denominado de RSP11 (Su J. et al., 2017). Três bacteriófagos líticos vRsoP-WF2, vRsoP-WM2 e vRsoP-WR2, membros da família *Podoviridae*, provocaram reduções na incidência da murcha-bacteriana em tomateiro (Álvarez et al., 2019). Em outra pesquisa foi feito um coquetel (P1) de doze bacteriófagos líticos P-PSG-1, P-PSG-2, P-PSG-3, P-PSG-4, P-PSG-5, P-PSG-6, P-PSG 7, P-PSG-8, P-PSG-9, P-PSG-10, P-PSG-11 e P-PSG-12 obtidos de diferentes fontes de águas no Quênia e na China, foi eficaz na prevenção da murcha-bacteriana (Wei C. et al., 2017).

A potencialidade desses agentes terapêuticos e a crescente demanda por práticas sustentáveis estimulam a ressurgência no interesse pela utilização desses vírus benéficos na agricultura, particularmente à luz do aumento da resistência bacteriana aos antibióticos e o acúmulo de resíduos advindos do uso indiscriminado dos agrotóxicos (Balogh et al. 2010). Apesar da importância da doença no país, o controle biológico mediado por vírus na agricultura não tem sido investigado.

Os bacteriófagos são considerados seguros e eficientes contra diversas doenças bacterianas (Wei et al., 2017; Doss et al., 2017) o que tem refletido atualmente em um crescente número de biopesticidas disponíveis no mercado, produzidos pela empresa OmniLytics, registrados nos Estados Unidos para o controle de bacterioses em hortaliças e fruteiras, como o AgriPhage™ da Certis USA, AgriPhage™ Bactericida, AgriPhage™ CMM, AgriPhage™ Fire Blight, AgriPhage™ Citrus Canker (Business Wire, 2019). Porém ainda não existe produtos comerciais para o CRS, o Brasil não tem adquirido essas formulações à base de bacteriófagos pois a alta especificidade desses agentes de controle biológico impossibilita na maioria dos casos que esses produtos sejam efetivos contra isolados dos patógenos nativos de outros países e/ou continentes.

Considerando que *R. solanacearum* é um patógeno importante para diversas culturas, que as dificuldades encontradas para o manejo no campo persistem, e que os solos do Espírito Santo ainda não foram investigados quanta a presença de bacteriófagos capazes de infectar espécies do CRS, objetivou-se com este trabalho isolar e caracterizar bacteriófagos líticos capazes de infectar *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*, em solos do Estado do Espírito Santo, visando a futura aplicação desses vírus selecionados ou mesmo de seus derivados bioengenhierados para o manejo da murcha-bacteriana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), município de Alegre (20°45' S; 41°29' W), sul do estado do Espírito Santo. A primeira etapa do trabalho foi conduzida no laboratório de Virologia e Biocontrole de Doenças de Plantas (LAVIB) do CCAUE/UFES, e a segunda etapa foi realizada em parceria com colaboradores internacionais da University of Wisconsin-Madison (EUA).

2.1 Isolados bacterianos

2.1.1 Coleta e obtenção de isolados do Complexo *Ralstonia solanacearum*

Amostras de solo e plantas de tomateiro contendo sintomas de murcha-bacteriana para prospecção de bacteriófagos foram coletadas em cultivos de tomateiro localizados no município de Afonso Cláudio e Venda Nova do Imigrante no estado do Espírito Santo. Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia e Biocontrole de Doenças de Plantas (LAVIB) do CCAE/UFES, Alegre-ES para que fosse realizado o isolamento direto de *Ralstonia* spp. O isolamento foi feito em placas de Petri contendo meio de cultura Caseína-Peptona-Glicose (CPG) 1,5% agar + TTC (2,3,5 - Triphenyltetrazolium chloride).

2.1.2 Extração de DNA genômico bacteriano

O DNA genômico dos isolados bacterianos foi extraído a partir de isolados bacterianos cultivados por 48 horas em meio de cultura Caseína-Peptona- Glicose 1,5% ágar, os quais foram recuperados em microtubos de 1,5 mL contendo 500µL de *Suspension Buffer* (S Buffer) (10% Sacarose, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 50 mM NaCl). Após a homogeneização em vórtex por 3 min, foram adicionados 20 µL de *Lisozima* (10 mg /ml) na suspensão de células e incubados em banho-maria a

37°C por 45 min, realizando-se vigorosas inversões em intervalos de 15 min, seguido pela adição de 5µL de *Proteinase K* (20 mg/ml) e novamente incubados a 37°C por 45 min. Em seguida, adicionou-se 50 µL de SDS (20% p/v) e incubados novamente em banho-maria a 65°C por 45 min. O lisado foi centrifugado a 11.000 x g por 3 min a 20°C com o propósito de sedimentar os detritos celulares no fundo dos microtubos para então ser realizada a coleta e a transferência do sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL contendo 20 µL de *RNAse A* (5 mg/ml) com posterior incubação em banho-maria a 37°C por 45 min.

Para promover a precipitação de proteínas celulares e outros resíduos celulares foi adicionado o equivalente a 0,35X de acetato de potássio 2,5 M (pH 8,0) e realizados de 15 a 20 suaves inversões para retomar para a centrífuga em rotação baixa (6500 x g) e alta (8000 x g) a 20°C por 3 min a fim de promover a sedimentação do precipitado. O sobrenadante foi novamente coletado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL com o mesmo volume de sobrenadante coletado de isopropanol, sendo realizadas suaves inversões e incubando por 5 min em temperatura ambiente. Após a incubação a solução foi centrifugada a 11.000 x g a 4°C por 20 min para haver a sedimentação do DNA e para o descarte do sobrenadante. Os *pellets* de DNA foram lavados duas vezes com 200µL etanol 70% e após cada adição os microtubos foram levados para a centrífuga a 11.000 x g a 4°C por 2 min e posterior descarte do sobrenadante. Uma nova centrifugação a 11.000 x g a 4°C por 2 min foi realizada para que ocorra a descida do etanol 70% remanescente presente nas paredes dos microtubos. Após esse procedimento os microtubos foram deixados em aberto para a finalização da secagem em capela durante 10 min e os *pellets* ressuspendidos em 50µL de TE (pH 8,0) e armazenados a -20 °C.

2.1.3 "*Phylotype-specific multiplex PCR*" (*Pmx-PCR*)

Para a identificação de espécies (filotipos) a nível molecular dos isolados bacterianos coletados, utilizou-se o método de PCR multiplex (*Pmx-PCR*), adaptado por Albuquerque et al. (2014). Para o mix de oligonucleotídeos, foi feita uma solução de 500µL contendo 10µL de cada um dos oligonucleotídeos: Nmult;21:IF (100µM), Nmult 21:2F (100µM), Mult:23:AF (100µM), Nmult:22:InF (100µM) e Nmult:22:RR (100µM),

5µL dos oligonucleotídeos 759 (100µM) e 760 (100µM) e 440µL de água ultrapura esterilizada. O mix da reação de *Pmx-PCR*, foi preparado para o volume final de 25µL contendo 3,75µL de água ultrapura, 12,50µL de *FIREPOL 5X Master Mix* 12.5mM da marca *Solis Biodyne*, 2,50µL do mix de oligonucleotídeos e 2,00µL de DNA (10 ng/µL). O programa de ciclagem em termociclador foi constituído de uma etapa de desnaturação inicial, tendo apenas 1 ciclo e a condição foi de 96°C/ 5 min, na etapa de desnaturação a temperatura foi de 94°C/30s, na de anelamento a condição foi de 59 °C/90s e na etapa de extensão a temperatura foi de 72°C/90s (em conjunto, essas três etapas tiveram 30 ciclos).

Os fragmentos amplificados foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,8%. Os amplicons foram carregadas em gel de acordo com as seguintes proporções de componentes (15µL das reações + 1 µL de *GelRed* 1:100 +2µL de *6x loading dye*) e a corrida em TAE 1X a 80V e 400mA por 3 horas. As amostras e os perfis genômicos foram verificados sob transiluminação UV (254 nm) e comparados ao perfil de bandamento dos isolados referência para os filotipos que ocorrem nas Américas.

2.1.4 Teste de patogenicidade para isolados de R. solanacearum oriundos do Espírito Santo

Após a caracterização molecular, foi realizado um teste adicional de patogenicidade em casa de vegetação, utilizando-se plantas de tomateiro cv. Bonne best para observar se os isolados bacterianos locais preservam a habilidade de causar doença e quais deles apresentavam maior agressividade ao infectar as plantas. Utilizamos um método de inoculação mais aproximado do contexto das infecções no campo, adicionando-se o inóculo inicial no próprio solo a uma concentração de 5×10^7 UFC/mL. O mesmo solo foi utilizado para o plantio de mudas de tomateiro e as plantas foram monitoradas por um período de 15 dias. A avaliação da incidência (ID) da murcha bacteriana no experimento foi feita com base em escala diagramática com valores de 0 a 5, onde: 0 = ausência de sintomas; 1 = apenas uma folha parcialmente murcha; 2 = duas ou três folhas murchas; 3 = todas as folhas murchas exceto duas ou três; 4 = todas as folhas murchas; 5 = planta morta.

2.1.5 Sequenciamento do mutante RsB70-PC e análises genômicas

O sequenciamento foi realizado em parceria com a Universidade de Wisconsin – Madison, utilizando NGS “Next generation Sequencing” - Sequenciamento de Nova Geração, capaz de superar a limitação de alguns métodos que exigem informação prévia sobre as sequências ou organismos alvo da investigação. Dentre as plataformas de NGS existentes, foi utilizado a Illumina HiSeq 3000, executando o sequenciamento por síntese de base (SBS). O método identificou simultaneamente as bases de DNA enquanto as incorporava a uma cadeia de ácidos nucleicos. Cada base emitiu um sinal fluorescente

único à medida que foi adicionado à cadeia crescente, que foi utilizada para determinar a ordem da sequência de DNA.

2.1.5.1 Montagem e Anotação do genoma do mutante RsB70-PC

Após as leituras obtidas a partir do sequenciamento, o genoma foi montado, ordenado e enumerado em *contigs*, utilizando os *softwares* Geneious 10.1.2 e Spades v. 3.11.1 tendo como referência genomas estritamente relacionados com o do mutante (*R. solanacearum*) presentes no banco de dados públicos de sequências, GenBank. Uma vez a montagem finalizada, as ORFs (“Open reading frame”) foram determinadas após a anotação do genoma montado, utilizando o Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAAP) do NCBI.

2.1.5.2 Seleção dos genes para estudo e busca no genoma de isolado referência

Baseando-se na literatura de acordo com Huang et al., 1995; Clough et al., 1997; Schell, 2000, fez-se a seleção de genes responsáveis pela virulência em *R. solanacearum* e determinantes para a produção de EPSI (cápsula). Os isolados referência do fílotipo II utilizados para análise de sintenia e genômica comparativa foram: CFBP2957 (EMBL: FP885897, FP885907 - [Ralstonia solanacearum CFBP2957 chromosome complete genome - Nucleotide - NCBI](#)) e Po82 (NCBI: CP002819, CP002819.1 - [Ralstonia solanacearum Po82, genoma completo - Nucleotídeo - NCBI](#)).

A partir da plataforma do INRAE (l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, realizou-se a busca dos genes selecionados nos isolados CFBP2957 e Po82 para definir a posição genômica e por meio do software uGene v 1.1, servidor Operon Mapper e plataforma BLAST/NCBI, reportou-se em quais operons estes genes estavam inseridos e suas respectivas sequências.

2.1.5.3 Alinhamento de loci candidatos do mutante RsB70-PC com o isolado referência CFBP2957

Após encontrados os operons, os quais cada gene estava localizado no isolado CFBP2957, a sequência destes foi recortada e alinhada em gaps com a sequência do mutante RsB70-PC. O alinhamento foi feito utilizando o *software* MegaX v. 11.0 para obter a comparação dos *loci* candidatos contendo os genes de interesse previamente descritos no item 2.1.5.2.

2.1.5.4 Análise comparativa de loci determinantes para a produção de cápsula (EPS)

Posteriormente ao item 2.1.5.3, através da comparação dos *loci* feita pelo alinhamento entre o genoma do mutante RsB70-PC e o genoma do isolado referência CFBP2957 previamente depositados no banco de dados (GenBank) do NCBI, foi realizada a análise de sintenia genômica utilizando os softwares/ferramentas de bioinformática MegaX v. 11.0 (www.megasoftware.net) e Reverse Complement (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html). A partir destas análises inferiu-se sobre o(s) tipo(s) de mutação(s), em qual *locus* especificamente ocorreu e as implicações funcionais para o produto do gene mutado.

2.2 Isolados virais

2.2.1 Coleta das amostras de água e solo

As amostras de água e solo foram coletadas em campos de produção de solanáceas e outras culturas tanto hospedeiras quanto não hospedeiras de espécies do Complexo *Ralstonia solanacearum*, com histórico de incidência da murcha-bacteriana e algumas áreas não agricultáveis (fragmentos de floresta) nos Estados de Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES) e Pernambuco (PE). As amostras de solo foram coletadas em solo rizosférico de plantas sintomáticas e assintomáticas. As amostras de água foram

coletadas em vários pontos dos afluentes próximos aos locais de incidência da doença ou não, em percurso aleatório.

2.2.2 Detecção de bacteriófagos através de Spot Test

Para a detecção de bacteriófagos as amostras coletadas, aproximadamente 1 g de solo, foram ressuspensas em 2 mL de água destilada, homogeneizadas no vórtex e em seguida centrifugadas a 12000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro com membrana PVDF 0,22 µm. Para as amostras de água, uma alíquota de 100 µL de cada amostra foi submetida ao método de detecção de placas de lise em sobrecamada de CPG semi-sólido 0,4% (Adams, 1959). O hospedeiro bacteriano utilizado para detecção de bacteriófagos foi um isolado do CRS, *R. solanacearum* RsB70-PC, um mutante avirulento incapaz de produzir cápsula pertencente à bacterioteca LAVIB NUDEMAFI.

2.2.3 Isolamento, propagação, purificação parcial das partículas virais e preservação

Os bacteriófagos detectados foram (“isolados”) a partir de uma única placa de lise isolada, utilizando o isolado *R. solanacearum* RsB70-PC como hospedeiro. Após incubação a 28 °C por 48 horas, placas de lise isoladas foram recortadas e propagadas.

Esse procedimento foi realizado com cada amostra que apresentou atividade lítica é repetido três vezes em sequência para a obtenção das partículas virais isoladas para posteriores análises. Para a propagação dos bacteriófagos, o isolado RsB70-PC foi cultivado em meio de cultura CPG líquido e incubado por 12 horas a 28 °C sob agitação de 200 rpm. Após o período de incubação a bactéria foi diluída em meio de cultura CPG líquido a uma $OD_{600}=0,2$, em seguida submetida à infecção viral e incubada por 12 horas a 28 °C a 200 rpm. Cada um dos bacteriófagos isolados foi propagado na cultura líquida do isolado RsB70-PC e após esse período, as células bacterianas foram removidas por centrifugação a 8000 rpm 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 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado 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 suspensões de partículas virais parcialmente purificadas foram armazenadas a 4°C e adicionalmente criopreservadas com glicerol em ultra-freezer -80°C.

Para determinar a quantidade de Unidades formadoras de placas de lise virais (UFP/ml) nas suspensões virais, foi realizada a titulação viral dos bacteriófagos propagados. Primeiramente, fez-se a diluição seriada das suspensões virais até 10⁻⁹ em tampão SM Buffer (900 µL de SM + 100 µL de bacteriófago). Transferiu-se alíquotas de 250 µL de cada diluição para microtubos de 1,5 mL com 500 µL da cultura do RsB70-PC em fase Log OD₆₀₀ = 0,4, incluindo a amostra sem diluir (10⁰), e esperou-se de 10-15min para que houvesse adsorção do bacteriófago. Após o tempo de adsorção, realizou-se o plaqueamento em sobrecamada de meio CPG semi-sólido (0,4% ágar) adicionando-se os 750µL (volume total) contidos nos microtubos (250 µL da diluição de cada suspensão viral + 500 µL de cultura bacteriana) em 6mL de CPG semi-sólido formando a sobrecamada na placa de Petri com meio sólido (1,5% ágar). As placas foram incubadas *overnight* a 28°C e posteriormente ao período de incubação, para o cálculo do título viral, foi feita a contagem das placas de lise formadas. Para isso, considerou-se as placas de Petri com quantidade de 30-300 placas de lise. Utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de placas de lise} \times \text{Fator de diluição}}{\text{Volume da diluição}} = \text{UFP/mL}$$

2.2.4 Cinética de infecção dos bacteriófagos

A cinética de infecção dos bacteriófagos foi avaliada em culturas líquidas de *R. solanacearum* isolado RsB70-PC para acessar a agressividade viral a partir da quantificação da magnitude viral lítica. Para tanto, alíquotas de 200 µL da suspensão bacteriana com aproximadamente 1x10⁸ UFC/mL (OD₆₀₀=0.2), previamente cultivada em caldo CPG, foram transferidas para microplacas de poliestireno de 96 poços e acrescidas de 50 µL das suspensões virais de cada bacteriófago isolado. A microplaca foi incubada sob agitação (200 rpm) em um leitor de microplacas (*Multiskan GO Elisa (Thermo Scientific)*) à 29 °C por 10 horas. As leituras da densidade óptica (OD_{600nm}) foram realizadas a cada 30 minutos, e os valores obtidos foram utilizados para construir as

curvas de crescimento de *R. solanacearum* RsB70-PC infectadas ou não com os diferentes bacteriófagos. Assim, foram realizados oito tratamentos com as seguintes combinações: RsB70-PC + Phage Zacimba, RsB70-PC + Phage Ortiz, RsB70-PC + Phage Elisiario, RsB70-PC + Phage Zilma, RsB70-PC + Phage Krenak, RsB70-PC + Phage Kapixawa, RsB70-PC + Phage Canuta e RsB70-PC + Phage Laurinda, e dois controles negativos: RsB70-PC (250uL) e CPG 0% (250uL). No total foram realizadas oito repetições por tratamentos.

2.2.5 Gama de hospedeiros dos oitos bacteriófagos

A infectividade dos bacteriófagos foi avaliada contra um painel mundial de isolados de espécies do Complexo *R. solanacearum* dos filotipos (I, II, III e IV), utilizando o método de sobrecamada com meio CPG semi-sólido (0,4%) (Adams, 1959) e o isolado *Ralstonia solanacearum* RsB70-PC. O título viral das suspensões de cada bacteriófago utilizadas para inocular os isolados foram 10^7 , 10^6 e 10^5 UFP/mL⁻¹. A ocorrência de zonas de lise confluentes na sobrecamada de CPG semi-sólido após incubação a 28°C durante 24 horas, foi interpretada como suscetibilidade (S) e a ausência como resistência (R), quando necessário subtipos fenotípicos foram designados dentro de cada reação dos hospedeiros bacterianos.

2.2.6 Extração e caracterização dos ácidos nucleicos dos bacteriófagos

A partir da propagação das partículas virais foram extraídos os ácidos nucleicos. Em 250mL de suspensão do hospedeiro a uma OD₆₀₀= 0,2 foram adicionados 10 mL do filtrado de cada isolado viral em um Erlenmeyer de 500mL. Em seguida as culturas foram incubadas em shaker a 200 rpm na temperatura de 30°C por 9 horas. Após a incubação foi realizada a centrifugação da suspensão a 8000 x g por 15 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro de membrana de 0,22 µm, para a obtenção das partículas virais puras, e armazenado a 4°C até sua utilização. A próxima etapa consistiu em realizar a precipitação das partículas virais utilizando PEG 8000 ou 6000 a 5% acrescido de solução de NaCl até atingir uma concentração final de 1 M. O *pellet* foi dissolvido e em seguida as amostras foram incubadas a 4°C por 48 horas. As amostras, após 48 h armazenadas a 4°C, foram

centrifugadas a 15000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado com cuidado para não perder o precipitado e em seguida o *pellet* formado foi ressuspensionado cuidadosamente, adicionando-se de 2 a 3 mL de solução tampão SM Buffer. Em seguida, foi realizado o tratamento das respectivas amostras de vírus com as enzimas RNase A (clivam moléculas de RNA) e S1 nuclease (clivam moléculas de ssRNA), para a eliminação de qualquer ácido nucleico que não sejam provenientes dos vírus. Para uma suspensão de 500µL de vírus foi adicionado 2,5 U de DNase I juntamente com o tampão 10X da mesma, posteriormente foi adicionado 6,5µg de RNase A, as amostras tratadas com as enzimas foram incubadas por 1 hora a 37°C em banho-maria. Para a inativação das enzimas, adicionou-se um volume de EDTA (pH 8) às amostras até que se atingisse uma concentração final de 15 mM. Novamente as amostras foram incubadas em banho-maria, porém, desta vez a uma temperatura de 75°C por 10 minutos para completar a inativação das enzimas. Esperou-se esfriar por aproximadamente 20 minutos e posteriormente adicionou-se 1,25 µL de *Proteinase K* (50 µg/ µL) e 25 µL SDS 10% para atingir uma concentração final de 0,5%), em seguida, as amostras foram incubadas por 1 hora em banho-maria a 56°C. Os demais procedimentos de extração foram realizados de acordo com o método de extração com fenol-clorofórmio com algumas alterações (Sambrook and Russel, 2001). Após isolamento dos ácidos nucleicos, as amostras foram submetidas ao tratamento enzimático com as enzimas RNase A e S1 nuclease, seguindo as recomendações dos fabricantes.

2.2.7 Sequenciamento e análise preliminar dos genomas dos bacteriófagos

Para o sequenciamento dos genomas, um total de 2 µg de DNA purificado de sete bacteriófagos foi usado para preparar as bibliotecas. O sequenciamento dos genomas completos foi conduzido através de *GridION X5* da Oxford Nanopore com *FLOMIN106 (R 9.4.1) flowcells* na "DNA Facility", Biotecnologia da Iowa State University, EUA. As métricas do controle de qualidade das "reads" foram disponibilizadas utilizando a ferramenta *pycoQC* (<https://github.com/a-sl ide/pycoQC>) a partir dos arquivos de sumário do *Guppy*, e as montagens de longas "reads" foram conduzidas utilizando o *Canu*, uma plataforma de montagem de *contigs* e *scaffolds* para conjunto de dados derivados de tecnologias de sequenciamento da Oxford Nanopore. A busca preliminar

por similaridade utilizando os *contigs* montados, que provavelmente correspondem aos genomas completos de cada isolado viral, foi realizada com a ferramenta BLAST do NCBI.

2.2.8 Análise filogenética

A árvore filogenética foi construída usando sequências de aminoácidos proteína principal do capsídeo (“Major capsid protein”) de membros de alguns gêneros da família *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Autographiridae* e *Siphoviridae* além dos sete bacteriófagos que infectam *Ralstonia* spp. isolados no Espírito Santo. As sequências de nucleotídeos das ORFs que codificam para a proteína capsidial foram extraídas do genoma de cada bacteriófago exclusivamente para a análise filogenética através de uma anotação preliminar (dados não mostrados). Os comprimentos dos ramos da árvore foram dimensionados em termos da fórmula de distância intergenômica do da *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP) baseadas em aminoácidos utilizando a plataforma *VICTOR* (<https://www.dsmz.de/services/online-tools/victor>) (Meier-Kolthoff & Göker, 2017). Comparações de topologias da árvore para checar congruência taxonômica em nível de gênero foram feitas com base na classificação pelo VIRIDIC (Vírus Intergenomic Distance Calculator).

2.3 Análises Estatísticas

Após análise crítica e tabulação dos resultados, os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Quando significativo, foram utilizados o teste de comparação de médias de Skot-Knott, sendo as diferenças consideradas como significativas quando $p \leq 0,05$ para os fatores qualitativos, e análise de regressão para os fatores quantitativos. Os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste t de student, ao nível de 5% de probabilidade e pelo coeficiente de determinação pelo software estatístico SISVAR

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Os isolados do CRS oriundos do ES pertencem à espécie *Ralstonia solanacearum*

Durante o desenvolvimento do trabalho foram realizadas 92 coletas de material vegetal com e sem sintomas de murcha-bacteriana (Figura 1A), para obtenção de isolados de espécies do CRS (Tabela suplementar S1). Após a prospecção de 17 amostras de tomateiro, designadas pelo código SNR (amostragem não-randômica), em apenas sete (S29-NR, S32-NR, S33-NR, S34-NR, S35-NR, S37-NR e S41-NR) foram detectados isolados bacterianos que apresentaram semelhança com base em caracteres morfoculturais que eram similares aos de isolados de espécies do CRS, todos associados à plantas de tomateiro com sintomas de murcha-bacteriana (Figura 1B). A amostragem não randômica indica que a amostragem foi direcionada à focos onde historicamente houve relatos de incidência de murcha-bacteriana ou haviam plantas com sintomas típicos da doença.

Dentre as características morfológicas, os isolados apresentavam colônias de coloração branca, grandes, fluidas e que na presença de TTC (Cloreto Trifenil Tetrazol + CPG), produzem o precipitado Formazan que marca o centro das colônias com uma pontuação vermelha circundada pela coloração esbranquiçada, típica em isolados virulentos do CRS (Figura 1B) (Garcia et al., 2019). Curiosamente, após a caracterização genotípica através de *Pmx*-PCR, dos setes isolados obtidos, apenas cinco foram confirmados como pertencentes ao CRS (Figura 1C).

O resultado dos dois isolados (B71 e B72) bacterianos que não pertenciam ao CRS foi interpretado como falso positivo (Tabela suplementar S1; Figura 1C). Os isolados confirmados foram depositados na Bacterioteca do LAVIB sob os códigos: RsB67, RsB68, RsB69, RsB70-PC e RsB73, e foram classificados como pertencentes ao filotipo II (espécie: *Ralstonia solanacearum*) conforme o perfil genotípico padrão do isolado referência desse mesmo grupo taxonômico (CFBP2957), que apresenta uma banda de 281 bp confirmando pertencer ao CRS e uma banda com comprimento de 372 pb, indicando pertencer ao filotipo II (Fegan & Prior, 2005).

Por meio do teste de patogenicidade (Figura 1D-F), observou-se que todos os isolados inoculados causaram doença nas plantas de tomate *cv.* Bonne best, exceto o isolado RsB70-PC (Figura 1G). Interessantemente na espécie *Ralstonia solanacearum*

ocorre um fenômeno conhecido como Conversão Fenotípica (“Phenotypic Conversion” - PC) que ocorre devido à mutação no gene *phcA* que expressa um fator de transcrição global que controla vários fatores de virulência, incluindo a produção de EPS (cápsula) (Fegan & Prior, 2005).

A partir do sequenciamento e montagem do genoma do RsB70-PC, mapeou-se e caracterizou-se essa mutação associada ao fenótipo de PC. Foi possível detectar uma mutação do tipo “frameshift” (deleção/INDEL) na posição 24 do gene *phcA* que provocou a alteração na fase de leitura da sequência codificadora (cfs) com alta penalidade para o produto desse gene, que passou a ser uma proteína truncada devido a introdução de um stop códon prematuro (Figura suplementar S1).

O novo produto do gene *phcA* é um peptídeo putativamente não-funcional de apenas sete aminoácidos, em contraste com o tamanho da proteína funcional presente em isolados “selvagens” da mesma espécie (não mutantes) que tem em torno de 347 aminoácidos (Kelman, 1954; Brumbley et al., 1993; Poussier, 2003). Essas informações são de extrema importância, pois associada à deficiência na produção de cápsula, potencialmente este isolado pode ter ampla utilização na detecção e propagação de bacteriófagos, caso apresente um bom desempenho quanto à perfil de suscetibilidade, para ser explorado nas etapas subsequentes. O acúmulo reduzido de material capsular durante os procedimentos microbiológicos para prospecção de bacteriófagos é um atrativo em procedimentos de filtragem viral para evitar saturação de membranas e rompimento de filtros durante procedimentos de produção em larga escala.

3.2 Distintos solos do ES contém bacteriófagos líticos que infectam Ralstonia solanacearum

Para prospecção de bacteriófagos, no campo foram coletadas um total de 92 amostras de solo e água (Tabela suplementar S1), que receberam códigos de acordo com o tipo de amostragem, a saber, quando a prospecção não foi direcionada para áreas com histórico de incidência de murcha-bacteriana, ou quando espécies não hospedeiras das bactérias do CRS eram cultivadas na área, foram nomeadas com o código R (randômica),

e quando a amostragem foi direcionada a focos onde historicamente houve relatos de incidência de murcha, nomeadas com o código NR (não randômica).

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia e Biocontrole de Doenças de Plantas (LAVIB) para prospecção de bacteriófagos. Apenas as amostras (S29-NR, S30-NR, S31-NR, S32-NR, S33-NR, S34-NR, S35-NR, S36-NR, S38-NR S41-NR), oriundas das cidades de Venda Nova do Imigrante-ES e Afonso Claudio-ES, apresentaram atividade lítica no ensaio de Spot test com CPG sobrecamada utilizando *R. solanacearum* RsB70-PC como isolado isca (Figura 2A-B). Após a detecção de atividade lítica nas amostras (Figura 2B), os bacteriófagos foram isolados através de três sucessivos ciclos de purificação biológica (Figura 2C) antes das propagações (Figura 2D) para garantir que as suspensões dos isolados virais estivessem livres de contaminações cruzadas com outros bacteriófagos.

Os bacteriófagos identificados neste trabalho receberam sua identificação em homenagem a líderes e princesas de origem africana escravizados em terras capixabas, quilombolas, povos originários, como os Krenak (Botocudos) e lideranças femininas ao longo da história do Espírito Santo (Paraíso, 1992; Araújo, 1996; Cardoso, 2008; Oliveira, 2012; Maciel, 2016; Giorgis, 2017), coube a equipe envolvida nessa pesquisa, nomear orgulhosamente os oito bacteriófagos isolados como: Phage Zacimba, Phage Laurinda, Phage Ortiz, Phage Kapixawa, Phage Krenak, Phage Zilma, Phage Elisiario e Phage Canuta.

A diversidade morfológica das placas de lise que possuem diâmetro variando entre 1.5-2.4 mm é pequena (Figura 3A) porém os bacteriófagos puderam ser agrupados em três grupos de agressividade com base em observações rotineiras quanto à velocidade e magnitude lítica de cada vírus. O bacteriófago Phage Laurinda apresentou Baixa

agressividade, os bacteriófagos Phages Elisario, Zacimba, Zilma e Canuta apresentaram agressividade Moderada e os bacteriófagos Phages Ortiz, Kapixawa e Krenak apresentaram agressividade Alta. Adicionalmente, a robustez da atividade lítica pode ser observada para os oito bacteriófagos quando inoculados em tubos de ensaio contendo a suspensão bacteriana de *R. solanacearum* RsB70-PC, indicando a efetividade para reduzir o inóculo bacteriano (Figura 3B).

3.3 Bacteriófagos líticos oriundos do ES apresentam distintos perfis de agressividade

O estudo da cinética de infecção dos oito bacteriófagos isolados permitiu acessar as perturbações na curva de crescimento de *Ralstonia solanacearum* RsB70-PC horas pós-infecção (hpi) com cada bacteriófago isoladamente. Nas primeiras 5 hpi, quando a intensa atividade de síntese foi perceptível na curva de crescimento bacteriana (fase log) (Figura 4A), diferenças significativas no perfil de agressividade viral possibilitaram consistentemente confirmar as observações anteriores quanto a classificação dos bacteriófagos em 3 grupos (Figura 3A; Figura 4B). O agrupamento quanto aos perfis de agressividade foi baseado na magnitude lítica viral, quantificando o declínio da densidade óptica das culturas bacterianas de *R. solanacearum* RsB70-PC inoculadas com os oito bacteriófagos nos períodos 0, 5 e 10 hpi. A magnitude lítica viral neste estudo foi mensurada conforme a capacidade de induzir o declínio das unidades de densidade óptica durante a fase exponencial do crescimento bacteriano (Figura 4) e as equações de regressão obtidas foram utilizadas para descrever o comportamento do fenômeno da cinética das infecções virais ao longo do tempo, assim como determinar valores específicos das variáveis de interesse. O bacteriófago: Phage Laurinda pertence ao grupo de **agressividade baixa**, os bacteriófagos: Phages Elisario, Zacimba, Zilma e Canuta

pertencem ao grupo dos vírus com **agressividade moderada** e por fim, os bacteriófagos: Phages Ortiz, Kapixawa e Krenak, pertencem ao grupo viral que apresenta **agressividade alta**.

Os oito bacteriófagos apresentam potencial para o controle biológico e manejo da murcha-bacteriana, pois podem causar lise celular no hospedeiro, reduzindo o inóculo no sistema, como visto para outros bacteriófagos capazes de infectar *Ralstonia solanacearum* (Yamada et al. 2007) e outras bactérias fitopatogênicas como *Xilrella fastidiosa* (Ahern, et al. 2014) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Ahmad et al. 2014b, Ahmad et al. 2014a).

3.4 Bacteriófagos oriundos do ES infectam isolados das espécies R. solanacearum e R. pseudosolanacearum e possuem mecanismos de infecção contrastantes

A gama de hospedeiros foi investigada utilizando um painel genético diversificado de isolados mundiais do CRS além de outras espécies de bactérias fitopatogênicas ou promotoras de crescimento (Tabela 1). Conforme a Tabela 2, alguns isolados dos filotipos I e II pertencentes ao CRS foram suscetíveis a infecção pelos oito bacteriófagos, havendo grupos de isolados suscetíveis (S) e resistentes (R). A maioria dos isolados do CRS de outros países se comportou como resistente ou como moderadamente suscetível e nenhum isolado do filotipo IV ou III foi infectado.

Distintos fenótipos resultantes das combinações vírus-bactéria foram observadas e classificados como subtipos, para resposta de resistência, foram observados: R^{NH} (NH =**Non-host**), quando não houve detecção de zonas de lise independente da suspensão viral inoculada (10^7 , 10^6 e 10^5 UFP/mL⁻¹) e a reação bacteriana a infecção viral foi do tipo resistência de bactéria não-hospedeira ou R^A (**A=Altruism**), quando a lise bacteriana

foi detectada apenas pós-inoculação da suspensão viral de alto título (10^7 UFP/mL⁻¹), não havendo transição fenotípica coerente de intensidade de lise com inóculos mais baixos, como ocorre em reações de suscetibilidade. Nesse fenótipo, provavelmente algum mecanismo de resistência inata atua sob um controle comportamental altruísta (Figura suplementar S2). Um total de três subtipos foram verificados para a resposta de suscetibilidade, sendo **S**, presença de placas de lise quando as três suspensões virais com títulos distintos (10^7 , 10^6 e 10^5 UFP/mL⁻¹) foram inoculados, porém a intensidade da lise foi título viral-dependente; **S^M** (**M=Moderate**), presença de placas de lise apenas quando as suspensões virais com títulos mais altos (10^7 , 10^6 UFP/mL⁻¹) foram inoculadas; **S^H** (**H=Highly**), presença de placas de lise quando as suspensões virais com distintos títulos (10^7 , 10^6 e 10^5 UFP/mL⁻¹) foram inoculados, porém a intensidade da lise foi extremamente forte e ocorrendo de maneira independente do título viral (Tabela 2; Figura Suplementar S2).

A diversidade das respostas de suscetibilidade e resistência foi bacteriófago-dependente, indicando que os oito bacteriófagos provavelmente apresentam divergências, ainda que mínimas quanto aos mecanismos de patogênese viral. Os bacteriófagos foram mais agressivos contra isolados brasileiros de *R. solanacearum*, especificamente aqueles oriundos do Espírito Santo, isolados RsB67, RsB68, RsB69, RsB70-PC e RsB73, que apresentaram resposta de suscetibilidade **S^H** (Tabela 2; Figura Suplementar S2). Essa reação para o grupo de isolados oriundos do mesmo município reflete possivelmente um caso clássico de co-evolução vírus-bactéria.

Embora exista especificidade dos bacteriófagos para *Ralstonia* spp., novas espécies descritas de bacteriófagos líticos da família *Myoviridae* tem ampla gama de hospedeiros, infectando não apenas espécies de *Ralstonia* spp., mas também cepas de *Burkholderia glumae* e *Burkholderia plantarii* tornando-os especialmente vantajosos para

o biocontrole de várias fitobacterioses em culturas economicamente importantes (Ahmad et al. 2021, Sasaki et al. 2021).

3.5 Bacteriófagos oriundos do ES possuem material genético composto por DNA de fita dupla

Constatou-se que a molécula genômica de pelo menos sete bacteriófagos é DNA de fita dupla (dsDNA) após os tratamentos com as endonucleases específicas DNase, RNase e S1 nuclease. O material genético foi resistente ao tratamento com RNase e S1 nuclease, que degradam moléculas de RNA e ssRNA, respectivamente, porém foi passível de degradação quando a enzima DNase foi adicionada ao sistema, indicando a natureza bioquímica do ácido nucleico (dados não mostrados). Apenas para o Phage Zacimba não foi possível avançar nas análises genômicas, pois curiosamente o seu material genético não pôde ser recuperado após tentativas exaustivas utilizando os protocolos disponíveis, sendo necessária futuramente uma investigação mais aprofundada acerca das propriedades desse isolado viral. Após a caracterização dos ácidos nucleicos virais, foi possível constatar que todos os sete bacteriófagos pertencem à ordem *Caudovirales* que abriga as famílias de bacteriófagos caudados com genoma de dsDNA (Ackermann, 2007).

3.6 Bacteriófagos oriundos do ES são isolados de uma putativa nova espécie relacionada aos taxa do gênero Bakolyvirus (Família: Myoviridae)

Para avançar o entendimento sobre as características genotípicas e posicionamento taxonômico dos sete bacteriófagos, o genoma foi completo foi

sequenciado e os tamanhos dos *contigs* genômicos montados e trimados foi de aproximadamente 46.000 pb e apresentam conteúdo GC% variando na faixa de 62.92-63.18%, muito próximo aos valores médios para o cromossomo (66,6%) e megaplasmídeo (66,7%) de *Ralstonia solanacearum* (Xu et al., 2011) (Tabela 3). A análise de BLASTn dos sete genomas contra o banco de sequências virais da plataforma NCBI nos leva a concluir que esses bacteriófagos pertencem a família *Myoviridae*, pois apresentam identidade nucleotídica variando de 80.96-82.03% com a espécie *Ralstonia phage Simangalove*, um táxon do gênero *Bakolyvirus* (Família: *Myoviridae*) com tamanho de genoma (Tabela 3). Os valores de identidade abaixo de 95%, com base em sequência de nucleotídeos do genoma completo, suportam a proposição de pelo menos uma nova espécie, porém, análises complementares deverão ser conduzidas antes do envio da proposta ao ICTV. Todos os sete genomas apresentaram uma alta similaridade nucleotídica entre si, sendo estreitamente relacionados ao nível médio de 97,99% de similaridade, o que fortemente sugere que se tratam de isolados de uma única espécie viral ainda não descrita (Tabela 4).

A análise filogenética usando sequências da proteína principal do capsídeo de alguns taxa das famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Autographiridae* e *Podoviridae* incluindo membros do gênero mais relacionado, com base em resultados anteriores, *Bakolyvirus* da família *Myoviridae* e dos sete bacteriófagos que infectam *Ralstonia* spp., confirmou a hipótese de que os sete bacteriófagos são mais relacionados aos bacteriófagos do clado *Bakolyvirus*, formando um subclado (Figura 5). A família *Myoviridae* inclui vírus com um genoma de dsDNA (31 a 317 kbp), cabeça icosaédrica e uma longa cauda contrátil (Ackermann & Prangishvili, 2012). De acordo com o ICTV (2022) a família *Myoviridae* apresenta atualmente 8 subfamílias e 153 gêneros (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Trabalhos recentes demonstram a importância de

inúmeros bacteriófagos dessa família no controle de bactérias fitopatogênicas (Ahmad et al. 2021, Sasaki et al. 2021, Deng et al. 2021, Addy et al. 2019, Narulita et al. 2016).

Nesse trabalho foram isolados e caracterizados a nível genômico sete bacteriófagos (isolados Canuta, Krenak, Zilma, Elisiario, Laurinda, Kapixawa e Ortiz) possivelmente pertencentes a uma nova espécie, provisoriamente proposta como *Ralstonia* phage Kapixawa da família *Myoviridae*, relacionada aos taxa do gênero *Bakolyvirus*, com potencial para biocontrole de *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha-bacteriana em diversas culturas economicamente importantes.

4. CONFLITO DE INTERESSES

Nenhum potencial conflito de interesses foi relatado para este artigo.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, visto que “o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.” e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo-FAPES pelo suporte financeiro. Ao Laboratório de Virologia e Biocontrole de Doenças de Plantas (LAVIB/Ufes) e o Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI/Ufes) pelo espaço físico. À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo fornecimento dos isolados brasileiros de *Ralstonia* spp., constante parceria e apoio financeiro. E por fim, à University of Wisconsin-Madison, Madison, USA, pelo fornecimento dos isolados internacionais de *Ralstonia* spp., estrutura física e apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

1. Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. (2012a). Loss of virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by ϕ RSM filamentous phages. *Phytopathology* 102, 469–477.
2. Ahmad AA, Addy HS, Huang Q. Biological and Molecular Characterization of a Jumbo Bacteriophage Infecting Plant Pathogenic *Ralstonia solanacearum* Species Complex Strains. *Front Microbiol.* 2021 Sep 27;12:741600. doi: 10.3389/fmicb.2021.741600. PMID: 34646257; PMCID: PMC8504454.
3. Álvarez B, López MM, Biosca EG. Biocontrol of the Major Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* in Irrigation Water and Host Plants by Novel Waterborne Lytic Bacteriophages. *Front Microbiol.* 2019 Dec 6;10:2813. doi: 10.3389/fmicb.2019.02813. PMID: 31866979; PMCID: PMC6908813.
4. Araújo L, Nascimento A. V. Por unanimidade, a reconquista da terra Krenak. In: RICARDO, Carlos Alberto (Ed.). Povos Indígenas no Brasil: 1991/1995. São Paulo: Instituto Socioambiental, 1996. p. 695-6.
5. Balogh, B., Jones, J. B., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2010). Phage therapy for plant disease control. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 48-57.
6. Brumbley, S. M., Carney, B. F., & Denny, T. P. (1993). Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of PhcA, a putative LysR transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology*, 175(17), 5477-5487.
7. Business Wire, AgriPhage™-Fire Blight and AgriPhage™-Citrus Canker Approved for Use to Control Bacterial Disease in Citrus and Pome Fruit. 2018. Disponível em: <
<https://www.businesswire.com/news/home/20181009005359/en/AgriPhage%E2%84%A2-Fire-Blight-and-AgriPhage%E2%84%A2-Citrus-Canker-Approved-for-Use-to-Control-Bacterial-Disease-in-Citrus-and-Pome-Fruit>>
8. Cardoso, L. C. Revolta negra na Freguesia de São José do Queimado: escravidão, resistência e liberdade no século XIX na província do Espírito Santo (1845–1850) (Dissertação de mestrado). – 2008. 107 f. : il.
9. da Silva Xavier, A., da Silva, F. P., Vidi gal, P. M. P., Lima, T. T. M., de Souza, F. O., & Alfenas-Zerbini, P. (2018). Genomic and biological characterization of a new member of the genus Phikmvvirus infecting phytopathogenic *Ralstonia* bacteria. *Archives of virology*, 163(1 2), 3275-3290.

10. Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., & Barezzi, N. (2017). A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, 9(3), 50.
11. Espírito Santo, 2016. 282 p.: il. – (Coleção Canaã, v.22).
12. Fegan, M., & Prior, P. (2005). How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*, 1, 449-61.
13. Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Applied and environmental microbiology*, 77(12), 4155-4162.
14. García, R. O., Kerns, J. P., & Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* species complex: a quick diagnostic guide. *Plant Health Progress*, 20(1), 7-13.
15. Giorgis, L. E. C. A jovem heroína que venceu o almirante holandês invasor. Informativo: O Tuiuti. Nº 226. 2017. <https://www.acadhistoria.com.br/otuiuti/O%20TUIUTI%20225.pdf>.
16. Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 44 (12).
17. Kurozawa, C., Pavan, M. A. Krause-Sakate, R. (2005) Doenças das solanáceas. In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A., Rezende J. A. M. (eds). *Manual de Fitopatologia- Doenças das plantas cultivadas*. p 589-596. Editora Ceres, São Paulo, Brasil.
18. Lee SY, Thapa Magar R, Kim HJ, Choi K, Lee SW. Complete Genome Sequence of a Novel Bacteriophage RpY1 Infecting *Ralstonia solanacearum* Strains. *Curr Microbiol*. 2021 May;78(5):2044-2050. doi: 10.1007/s00284-021-02466-0. Epub 2021 Apr 9. PMID: 33835234.
19. Maciel, C. *Negros no Espírito Santo*. 2ª ed. – Vitória, (ES): Arquivo Público do Estado do Espírito Santo.
20. Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629.
21. Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., & Griffiths, M. W. (2001). Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar

- cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of food protection*, 64(7), 927-933.
22. Oliveira, O. M. D. (2012). Jongos e caxambus: culturas afro-brasileiras no Espírito Santo. Projeto de Extensão Proflex/MEC (SIGProj N: 113815.480.57123.05042012), Vitória: Proflex/Ufes.
 23. Paraíso, Maria Hilda Baqueiro. Os botocudos e sua trajetória histórica. In: CUNHA, Manuela Carneiro da (Org.). *História dos índios no Brasil*. São Paulo: Companhia das Letras/SMCSP, 1992. p. 413-30.
 24. Paudel, S., Dobhal, S., Alvarez, A. M., & Arif, M. (2020). Taxonomy and Phylogenetic Research on *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. *Pathogens*, 9(11), 886.
 25. Poussier, S., Thoquet, P., Trigalet-Demery, D., Barthet, S., Meyer, D., Arlat, M., & Trigalet, A. (2003). Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Molecular microbiology*, 49(4), 991-1003.
 26. Prior, P., Ailloud, F., Dalsing, B. L., Remenant, B., Sanchez, B., & Allen, C. (2016). Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC genomics*, 17(1), 1-11.
 27. Romeiro, R. S. *Bactérias Fitopatogênicas*. (2005) 2^a. ed. Viçosa: Editora UFV, 417p.
 28. Roskopf, E. N., Chellemi, D. O., Kokalis-Burelle, N., & Church, G. T. (2005). Alternatives to methyl bromide: A Florida perspective. *Plant Health Progress*, 6(1), 19.
 29. Sagar, V., Jeevalatha, A., Mian, S., Chakrabarti, S. K., Gurjar, M. S., Arora, R. K., & Singh, B. P. (2014). Potato bacterial wilt in India caused by strains of phylotype I, II and IV of *Ralstonia solanacearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 138(1), 51-65.
 30. Su, J., Sun, H., Liu, J., Guo, Z., Fan, G., Gu, G., & Wang, G. (2017). Complete genome sequence of a novel lytic bacteriophage isolated from *Ralstonia solanacearum*. *Archives of virology*, 162(12), 3919-3923.
 31. Wei, C., Liu, J., Maina, A. N., Mwaura, F. B., Yu, J., Yan, C., Zhang R, Wei, H. (2017). Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. *Virologica Sinica*, 32(6), 476-484.

32. Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., & Prior, P. (2007). *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and environmental microbiology*, 73(21), 6790-6801.
33. Winstead, N.N.,Kelman, A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, v. 42, p. 628-634.
34. Xu J, Zheng HJ, Liu L, et al. Complete genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* strain Po82. *J Bacteriol.* 2011;193(16):4261-4262. doi:10.1128/JB.05384-11

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no levantamento realizado neste trabalho, constatou-se que a Região Serrana do Estado do Espírito Santo, onde se concentra o Pólo Produtor de hortaliças e agricultura familiar, possui ampla diversidade viral que pode ser acessada e caracterizada.

As amostras coletadas na Região Serrana possuem bacteriófagos líticos (Phage Zacimba, Phage Ortiz, Phage Elisiario, Phage Zilma, Phage Krenak, Phage Kapixawa, Phage Canuta e Phage Laurinda), com diferentes características biológicas, fenotípicas e genéticas. Esses bacteriófagos possuem a capacidade de infectar diferentes isolados do complexo *Ralstonia solanacearum* (CRS) de origem local e mundial. Além disso, os novos vírus possuem diferentes padrões de magnitude viral, quando inoculados no isolado *Ralstonia solanacearum* RsB70-PC.

Considerando que houve resposta de resistência/suscetibilidade variada no painel de isolados bacterianos do CRS submetidos à inoculação com os oito bacteriófagos testados, a proposta de um coquetel viral que contempla os diferentes mecanismos de patogênese viral torna-se interessante para fins de manejo da resistência antiviral nas populações do patógeno no campo.

A ausência de agrotóxicos ou produtos biológicos registrados no Brasil para o manejo da murcha-bacteriana projeta os novos vírus líticos identificados nesse trabalho como uma proposta inovadora e de baixo custo, para produção de coquetéis de bacteriófagos virulentos no controle dessas bactérias fitopatogênicas.

TABELAS

Tabela 1: Informações sobre isolados de espécies do Complexo *Ralstonia solanacearum* (CRS) e outras espécies bacterianas, incluindo fitopatogênicas e promotoras de crescimento vegetal usadas neste estudo.

Strain code	Species	Country	State	Municipality	Plant host	Phylotype/Sequevar	Source and/or Donor reference
CRMRs28	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Chã Grande	Bell pepper	I-18	CCRM - UFRPE
CRMRs30	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Bezerros	Bell pepper	I-18	CCRM - UFRPE
CRMRs36	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Garanhuns	Bell pepper	I-18	CCRM - UFRPE
CRMRs41	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Caruaru	Bell pepper	I-18	CCRM - UFRPE
CRMRs58	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Chã Grande	Egg plant	I-18	CCRM - UFRPE
CRMRs143	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Belém do São Francisco	Tomato	I-17	CCRM - UFRPE
CRMRs217	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Camocim de São Félix	Egg plant	I-18	CCRM - UFRPE
CRMRs50	<i>R. solanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Chã Grande	Bell pepper	IIA-50	CCRM - UFRPE
CRMRs105	<i>R. solanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Camocim de São Félix	Tomato	IIA-50	CCRM - UFRPE
CRMRs126	<i>R. solanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Belém do São Francisco	Tomato	IIA-50	CCRM - UFRPE
CRMRs160	<i>R. solanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Petrolina	Tomato	IIA-50	CCRM - UFRPE
CRMRs204	<i>R. solanacearum</i>	Brazil	Pernambuco	Gravatá	Tomato	IIA-50	CCRM - UFRPE
RsB67	<i>R. solanacearum</i>	Brazil	Espirito Santo	Afonso Cláudio-ES	Tomato	II	This study
RsB68	<i>R. solanacearum</i>	Brazil	Espirito Santo	Afonso Cláudio-ES	Tomato	II	This study
RsB69	<i>R. solanacearum</i>	Brazil	Espirito Santo	Afonso Cláudio-ES	Tomato	II	This study
RsB70-PC	<i>R. solanacearum</i>	Brazil	Espirito Santo	Afonso Cláudio-ES	Tomato	II	This study
RsB73	<i>R. solanacearum</i>	Brazil	Espirito Santo	Afonso Cláudio-ES	Tomato	II	This study
GMI1000	<i>R. pseudosolanacearum</i>	French Guyana	-	-	Tomato	I	CCCA - UW
UW672	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Cameroon	-	-	Tomato	I	CCCA - UW

CMR15	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Cameroon	-	-	Tomato	III	CCCA - UW
UW386	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Nigeria	-	-	Tomato	III	CCCA - UW
UW757	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Guatemala	-	-	Tomato	I	CCCA - UW
CFBP2957	<i>R. solanacearum</i>	Martinique	-	-	Tomato	II	CCCA - UW
Rs5	<i>R. solanacearum</i>	USA	-	-	Tomato	II	CCCA - UW
IPO1609	<i>R. solanacearum</i>	Netherlands	-	-	Potato	II	CCCA - UW
UW551	<i>R. solanacearum</i>	Kenya	-	-	Geranium	II	CCCA - UW
Molk2	<i>R. solanacearum</i>	Philippines	-	-	Banana	II	CCCA - UW
BDB 229	<i>Ralstonia syzygii</i> subsp. <i>Celebesensis</i>	Indonesia	-	-	Banana and Plantain	IV	CCCA - UW
PSI07	<i>R. syzygii</i> subsp. <i>Indonesiensis</i>	Indonesia	-	-	Tomato	IV	CCCA - UW
UW652	<i>R. syzygii</i> subsp. <i>Indonesiensis</i>	Japan	-	-	Tomato	IV	CCCA - UW
R24	<i>R. syzygii</i> subsp. <i>Syzygii</i>	Indonesia	-	-	Clove tree	IV	CCCA - UW
CCRMATIII	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Brazil	-	-	Rose	-	CCRM - UFRPE
CCRMPCB18	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>Brasiliensis</i>	Brazil	-	-	-	-	CCRM - UFRPE
PCC19	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>Carotovorum</i>	Brazil	-	-	-	-	CCRM - UFRPE
IBSBF 248P	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Garcae</i>	Brazil	São Paulo	Garça	Coffee	-	Collection of the Biological Institute (IBSBF)
CCRMPST01	<i>P. syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	Brazil			Tomato	-	CCRM - UFRPE
V84	<i>Bacillus</i> sp.	Brazil	Espirito Santo	Alegre		-	CCAX - UFES
A1R-14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Brazil	Espirito Santo	Rive	<i>Synedrellopsis grisebachii</i>	-	CCAX - UFES

CCRM : Culture Collection Rosa Mariano – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE); CCAX : Culture Collection André Xavier – Universidade Federal do Espírito Santo (UFES); CCCA : Culture Collection Caitilyn Allen - University of Wisconsin-Madison (UW)

Bacillus sp. V84*Stenotrophomonas maltophilia* AIR-14

R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}
R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}	R ^{NH}

Tabela 3: Informações genômicas dos sete bacteriófagos que infectam espécies do Complexo *Ralstonia solanacearum* (CRS), e identidade nucleotídica dos genomas (%) utilizando a ferramenta BLASTN contra o banco de dados de vírus do NCBI.

Phage	Genomic Contig assembled length (bp)	G+C content (%)	The most similar bacteriophage/BLASTN					
			Phage	Query cover (%)	E value	Identity (%)	Genome size	GenBank Accession
Laurinda	~46000	62.95	<i>Ralstonia phage Simangalove</i>	76	0.0	82.03	44834	NC_054946.1
Zilma	~46000	63.16	<i>Ralstonia phage Simangalove</i>	78	0.0	81.54	44834	NC_054946.1
Elisiario	~46000	62.92	<i>Ralstonia phage Simangalove</i>	77	0.0	80.96	44834	NC_054946.1
Canuta	~46000	63.12	<i>Ralstonia phage Simangalove</i>	76	0.0	81.15	44834	NC_054946.1
Ortiz	~46000	63.18	<i>Ralstonia phage Simangalove</i>	76	0.0	81.15	44834	NC_054946.1
Kapixawa	~46000	63.00	<i>Ralstonia phage Simangalove</i>	76	0.0	81.79	44834	NC_054946.1
Krenak	~46000	63.18	<i>Ralstonia phage Simangalove</i>	75	0.0	81.14	44834	NC_054946.1

Tabela 4: Análise de similaridade genômica par a par através da ferramenta BLASTN genômica dos sete bacteriófagos que infectam espécies do Complexo *Ralstonia solanacearum* (CRS).

Phage Ortiz	100						
Phage Elisiario	98.16	100					
Phage Zilma	99	98.7	100				
Phage Canuta	99.87	98	99.36	100			
Phage Kapixawa	98.19	99.88	98.96	98.01	100		
Phage Laurinda	98.62	99.09	99.39	98.79	99.15	100	
Phage Krenak	99.53	97.99	99.33	99.86	97.99	98.82	100
	Phage Ortiz	Phage Elisiario	Phage Zilma	Phage Canuta	Phage Kapixawa	Phage Laurinda	Phage Krenak

TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela Suplementar S1. Lista de amostras de solo, água e plantas para isolamento de isolados bacterianos do Complexo *Ralstonia solanacearum* (CRS) e bioprospecção de bacteriófagos que infectam *Ralstonia* spp.

Sample code	Sampling sites specifications	Type	Municipality	Latitude	Longitude	Sampling date	Detection results	
							Phage	<i>Ralstonia</i> sp.
S1-R	Coffee-cassava intercropping field	Soil	Vargem Alta- ES	20°34'53.06"S	40°59'54.04"O	02/05/2019	-	-
S2-R	Atlantic rain forest	Soil	Vargem Alta- ES	20°34'55.71"S	40°59'52.45"O	02/05/2019	-	-
S3-R	Coffee-cassava intercropping field	Irrigation Water	Vargem Alta- ES	20°35'28.41"S	41° 0'44.05"O	02/05/2019	-	-
S4-R	Cassava field	Soil	Viana- ES	20°26'50.98"S	40°31'12.47"O	02/19/2019	-	-
S5-R	Lake	Water	Viana- ES	20°26'50.69"S	40°31'12.42"O	02/19/2019	-	-
S6-R	Coffee field	Soil	Pedra Azul- ES	20°23'34,6"S	41°1'9.47"O	02/19/2019	-	-
S7-R	Coffee field	Soil	Vargem Alta- ES	20°38'11.58"S	41° 2'20.64"O	02/26/2019	-	-
S8R	Vegetable field	Soil	Castelo- ES	20°33'21" S	41°52'02" O	03/31/2019	-	-
S9-R	Lake	Water	Castelo- ES	20°33'21" S	41°52'02" O	03/31/2019	-	-
S10-R	Coffee-sweet potato intercropping field	Soil	Vargem Alta- ES	20°36'2"S	41°0'50"O	01/10/2019	-	-
S11-R	Eucalyptus field	Soil	Vargem Alta- ES	20°36'3"S	41°0'47"O	01/10/2019	-	-
S12-R	Eucalyptus field	Soil	Vargem Alta- ES	20°36'30"S	41°0'45"O	12/10/2019	-	-
S13-R	River	Water	Vargem Alta- ES	20°36'28"S	41°0'46"O	01/12/2019	-	-
S14-R	Scarlet eggplant field	Soil	Vargem Alta- ES	20°35'53"S	41°1'14"O	01/13/2019	-	-
S15-R	River	Water	Vargem Alta- ES	20°36'25"S	41°0'50" O	01/12/2019	-	-
S16-R	Vegetable field	Soil	Vargem Alta- ES	20°36'19"S	41°0'49"O	01/13/2019	-	-
S17-R	Atlantic rain forest	Soil	Vargem Alta- ES	20°35'44"S	41°0'51"O	02/07/2019	-	-
S18-R	Coffee-pumpkin intercropping field	Soil	Vargem Alta- ES	20°35'45"S	41°0'53"O	02/07/2019	-	-

S19-R	Scarlet eggplant field	Soil	Vargem Alta- ES	20°37'2"S	41°1'26"O	02/11/2019	-	-
S20-R	Scarlet eggplant field	Soil	Vargem Alta- ES	20°37'0"S	41°1'26"O	02/11/2019	-	-
S21-R	Tomato field	Soil	Vargem Alta- ES	20°37'2"S	41°1'25"O	02/11/2019	-	-
S22-R	Zucchini field	Soil	Vargem Alta- ES	20°37'0"S	41°1'24"O	02/11/2019	-	-
S23-R	Water reservoir for irrigation	Water	Vargem Alta- ES	20°36'58"S	41°1'24"O	02/11/2019	-	-
S24-R	Coffee field	Soil	Alegre-ES	20°47'50.35"S	41°33'23.40"O	01/16/2019	-	-
S25-R	River	Water	Alegre-ES	20°48'05.86"S	41°33'10.53"O	01/16/2019	-	-
S26-R	Coffee field	Soil	Alegre-ES	20°48'33.61"S	41°33'36.77"O	01/16/2019	-	-
S27-R	River	Water	Alegre-ES	20°48'27.35"S	41°33'34,13"O	01/16/2019	-	-
S28-R	Atlantic rain forest	Soil	Alegre-ES	20°47'59.47"S	41°33'07.14"O	01/16/2019	-	-
S29-R	Coffee field	Water	Santa Leopoldina- ES	20°09'32.6"S	40°27'37.4"O	01/15/2019	-	-
S30-R	Water reservoir for irrigation	Water	Santa Leopoldina- ES	20°09'09.7"S	40°27'31.7"O	01/15/2019	-	-
S31-R	Atlantic rain forest	Soil	Santa Leopoldina- ES	20°09'14.5"S	40°27'25.7"O	01/15/2019	-	-
S32-R	Small dam for irrigation	Water	Vila Valério-ES	18°59'52.4"S	40°23'16"O	01/25/2019	-	-
S33-R	Small dam for irrigation	Water	Vila Valério-ES	18°59'38"S	40°23'7.8"O	01/08/2019	-	-
S34-R	Lake	Water	Vila Valério-ES	18°58'27.8"S	40°22'39.3"O	01/08/2019	-	-
S35-R	Citrus field	Soil	Vila Valério-ES	18°59'53.5"S	40°23'16"O	01/08/2019	-	-
S36-R	Cocoa field	Soil	Vila Valério-ES	18°59'53.5"S	40°23'16"O	01/08/2019	-	-
S37-R	Small dam	Water	Vila Valério-ES	18°58'27.8"S	40°22'39.3"O	01/08/2019	-	-
S38-R	Small dam	Soil	Vila Valério-ES	18°59'17,8"S	40°22'49.8"O	01/08/2019	-	-
S39-R	Black pepper field	Soil	Vila Valério-ES	18°59'12.4"S	40°23'5.6"O	01/08/2019	-	-
S40-R	Coffee field	Soil	Vila Valério-ES	18°59'20.4"S	40°22'26.7"O	01/08/2019	-	-
S41-R	Coffee field	Soil	Jerônimo Monteiro- ES	20°53'22.4"S	41°25'55.18"O	01/25/2019	-	-
S42-R	Guava field	Soil	Jerônimo Monteiro- ES	20°53'21.13"S	41°25'54.30"O	01/25/2019	-	-
S43-R	Irrigation water near to Coffee field	Water	Jerônimo Monteiro- ES	20°53'21.12"S	41°25'55.18"O	01/25/2019	-	-

S44-R	Lettuce field	Soil	Vitória de Santo Antão- PE	58°8'33.07"S	35°18'41.38"O	01/05/2019	-	-
S45-R	Irrigation water from SR44-R sample	Water	Vitória de Santo Antão- PE	58°8'33.07"S	35°18'41.38"O	01/05/2019	-	-
S46-R	Lettuce field	Soil	Vitória de Santo Antão- PE	58°8'33.94"S	35°18'36.48"O	01/05/2019	-	-
S47-R	Irrigation water from SR46-R sample	Water	Vitória de Santo Antão- PE	58°8'33.94"S	35°18'36.48"O	01/05/2019	-	-
S48-R	Weir	Water	Vitória de Santo Antão- PE	58°7'50.84"S	35°18'5.4"O	01/05/2019	-	-
S49-R	Lake (urban area)	Water	Sete Lagoas- MG	19°28'27.57"S	44°14'50.02"	03/23/2019	-	-
S1-NR	Tomato field	Soil	Vargem Alta- ES	20°31'36.08"S	40°59'12.54"O	10/08/2019	-	-
S2-NR	Potato field	Soil	Vargem Alta- ES	20°34'19.23"S	40°57'25.83"O	10/08/2019	-	-
S3-NR	Bell pepper field	Soil	Vargem Alta- ES	20°34'23.86"S	40°57'17.98"O	10/08/2019	-	-
S4-NR	Cabbage field	Soil	Vargem Alta- ES	20°31'43.63"S	40°59'16.16"O	10/08/2019	-	-
S5-NR	Bell pepper field	Soil	Vargem Alta- ES	20°34'23.86"S	40°57'17.98"O	10/08/2019	-	-
S6-NR	Cabbage field	Soil	Vargem Alta- ES	20°34'22.05"S	40°57'18.11"O	10/08/2019	-	-
S7-NR	Cabbage field	Soil	Vargem Alta- ES	20°34'17.28"S	40°57'27.77"O	10/08/2019	-	-
S8-NR	Bell pepper field	Soil	Vargem Alta- ES	20°34'14.09"S	40°57'30.06"O	10/08/2019	-	-
S9-NR	Cabbage field	Soil	Vargem Alta- ES	20°34'12.90"S	40°57'28.81"O	10/08/2019	-	-
S10-NR	Fallow crop field	Soil	Vargem Alta- ES	20°37'42.85"S	41° 2'4.59"O	10/08/2019	-	-
S11-NR	Eucalyptus field	Soil	Vargem Alta- ES	20°36'28"S	41°0'46"O	07/08/2019	-	-
S12-NR	Coffee-banana intercropping field	Soil	Vargem Alta- ES	20°36'28"S	41°0'46"O	07/08/2019	-	-
S13-NR	Tomato-maize intercropping field	Soil	Vargem Alta- ES	20°36'31.53"S	41° 1'3.18"O	10/08/2019	-	-
S14-NR	Tomato-Eucalyptus-maize intercropping field	Soil	Vargem Alta- ES	20°36'31.67"S	41° 0'58.00"O	10/08/2019	-	-
S15-NR	Scarlet eggplant field	Soil	Vargem Alta- ES	20°36'58.32"S	41°1'28.54"O	10/08/2019	-	-
S16-NR	Scarlet eggplant field	Soil	Vargem Alta- ES	20°36'58.32"S	41°1'28.54"O	10/08/2019	-	-
S17-NR	Bell pepper field	Soil	Vargem Alta- ES	20°37'47.6"S	41°2'4.77"O	10/08/2019	-	-

S18-NR	Tomato field	Soil	Vargem Alta- ES	20°37'43.18"S	41°2'3.32"O	10/08/2019	-	-
S19-NR	Lake	Water	Vargem Alta- ES	20°37'43.18"S	41°2'3.32"O	10/08/2019	-	-
S20-NR	Bell pepper field	Soil	Vargem Alta- ES	20°37'43.18"S	41°2'3.32"O	10/08/2019	-	-
S21-NR	Bell pepper field	Soil	Vila Valério - ES	18°56'10"S	40°28'49"W	08/20/2019	-	-
S22-NR	Bell pepper field	Soil	Vila Valério - ES	18°56'07"S	40°28'44"W	08/20/2019	-	-
S23-NR	Bell pepper field	Soil	Vila Valério - ES	18°56'07"S	40°28'44"W	08/20/2019	-	-
S24-NR	Bell pepper field	Soil and plant	Vila Valério - ES	18°56'07"S	40°28'44"W	08/20/2019	-	-
S25-NR	Tomato field	Soil and plant	Vila Valério - ES	18°56'10"S	40°28'49"W	08/20/2019	-	-
S26-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'26" S	41°7'39" O	05/09/2019	-	-
S27-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'26" S	41°7'38" O	05/09/2019	-	-
S28-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'21" S	41°7'26" O	05/09/2019	-	-
S29-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'21" S	41°7'26" O	05/09/2019	+	+
S30-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'27" S	41°7'28" O	05/09/2019	+	-
S31-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'27" S	41°7'29" O	05/09/2019	+	-
S32-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'26" S	41°7'29" O	05/09/2019	+	+
S33-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'27" S	41°7'29" O	05/09/2019	+	+
S34-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'23" S	41°7'31" O	05/09/2019	+	+
S35-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'26" S	41°7'40" O	05/09/2019	+	+
S36-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'27" S	41°7'40" O	05/09/2019	+	-
S37-NR	Tomato field	Soil and plant	Afonso Cláudio-ES	20°12'27" S	41°7'40" O	05/09/2019		False positive
S38-NR	Fallow tomato field with weed plants	Soil	Afonso Cláudio-ES	20°13'31" S	41°2'12" O	05/09/2019	+	-

S39-N	Fallow tomato field with weed plants	Soil	Afonso Cláudio-ES	20°13'31" S	41°2'12" O	05/09/2019	-	-
S40-NR	Greenhouse (fallow tomato area)	Soil	Venda Nova do Imigrante-ES	20°26'32" S	41°4'32" O	05/09/2019	-	-
S41_NR	Greenhouse (Tomato)	Soil and plant	Venda Nova do Imigrante-ES	20°26'33" S	41°4'32" O	05/09/2019	+	False positive
S42-NR	Greenhouse (Tomato)	Soil and plant	Venda Nova do Imigrante-ES	20°26'33" S	41°4'32" O	05/09/2019	-	-
S43-NR	Greenhouse (Tomato)	Soil and plant	Venda Nova do Imigrante-ES	20°26'33" S	41°4'33" O	05/09/2019	-	-

Tabela Suplementar S2. Códigos de acesso do GenBank para as sequências de aminoácidos da proteína capsidial principal de 27 bacteriófagos que compõem as famílias *Myoviridae*, *Autographiviridae*, *Podoviridae* e *Siphoviridae*.

Family	Genus	Species	Host	Genbank Accession
<i>Myoviridae</i>	<i>Bakolyvirus</i>	Ralstonia_phage_Sarlave	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	QMV33681.1
<i>Myoviridae</i>	<i>Bakolyvirus</i>	Ralstonia_phage_Adzire	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010052715.1
<i>Myoviridae</i>	<i>Bakolyvirus</i>	Ralstonia_phage_Jenny	<i>R. pseudosolanacearum</i>	QMV33536.1
<i>Myoviridae</i>	<i>Bakolyvirus</i>	Ralstonia_phage_Bakoly	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010052783.1
<i>Myoviridae</i>	<i>Bakolyvirus</i>	Ralstonia_phage_Simangalove	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010077711.1
<i>Myoviridae</i>	<i>Naesvirus</i>	Burkholderia_phage_Bcep43	<i>Burkholderia</i> sp.	NP_958117.1
<i>Myoviridae</i>	<i>Naesvirus</i>	Burkholderia_phage_Bcep781	<i>Burkholderia</i> sp.	NP_705638.1
<i>Myoviridae</i>	<i>Rahariannevirus</i>	Ralstonia_phage_Raharianne	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010078151.1
<i>Myoviridae</i>	<i>Rahariannevirus</i>	Ralstonia_phage_Albius	<i>R. pseudosolanacearum</i>	QMV32402.1
<i>Myoviridae</i>	<i>Rahariannevirus</i>	Ralstonia_phage_Hyacinthe	<i>R. pseudosolanacearum</i>	QMV33440.1
<i>Autographiviridae</i>	<i>Anchaingvirus</i>	Ralstonia_phage_Anchaing	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010064541.1
<i>Autographiviridae</i>	<i>Higashivirus</i>	Ralstonia_phage_RSB1	<i>R. solanacearum</i>	YP_002213721.1
<i>Siphoviridae</i>	<i>Dinavirus</i>	Ralstonia_phage_Dina	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010082067.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Firingavirus</i>	Ralstonia_phage_Firinga	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010078554.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Firingavirus</i>	Ralstonia_phage_Hennie	<i>R. pseudosolanacearum</i>	QMV33323.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Firingavirus</i>	Ralstonia_phage_RSK1	<i>R. solanacearum</i>	YP_008853789.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Gervaisevirus</i>	Ralstonia_phage_Alix	<i>R. pseudosolanacearum</i>	QMV32513.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Gervaisevirus</i>	Ralstonia_phage_RPZH6	<i>R. pseudosolanacearum</i>	QKW95335.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Gervaisevirus</i>	Ralstonia_phage_GP4	<i>R. solanacearum</i>	YP_010078734.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Gervaisevirus</i>	Ralstonia_phage_Darius	<i>R. pseudosolanacearum</i>	QMV32791.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Gervaisevirus</i>	Ralstonia_phage_Gervaise	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010078671.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Gervaisevirus</i>	Ralstonia_phage_Claudette	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010078609.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Cimandefvirus</i>	Ralstonia_phage_Gamede	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010078355.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Cimandefvirus</i>	Ralstonia_phage_UAM5	-	CAH0532136.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Cimandefvirus</i>	Ralstonia_phage_Dimitile	<i>R. pseudosolanacearum</i>	QMV32859.1

<i>Podoviridae</i>	<i>Cimandefvirus</i>	Ralstonia_phage_Cimandef	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010078248.1
<i>Podoviridae</i>	<i>Cimandefvirus</i>	Ralstonia_phage_Eline	<i>R. pseudosolanacearum</i>	YP_010078301.1

FIGURAS

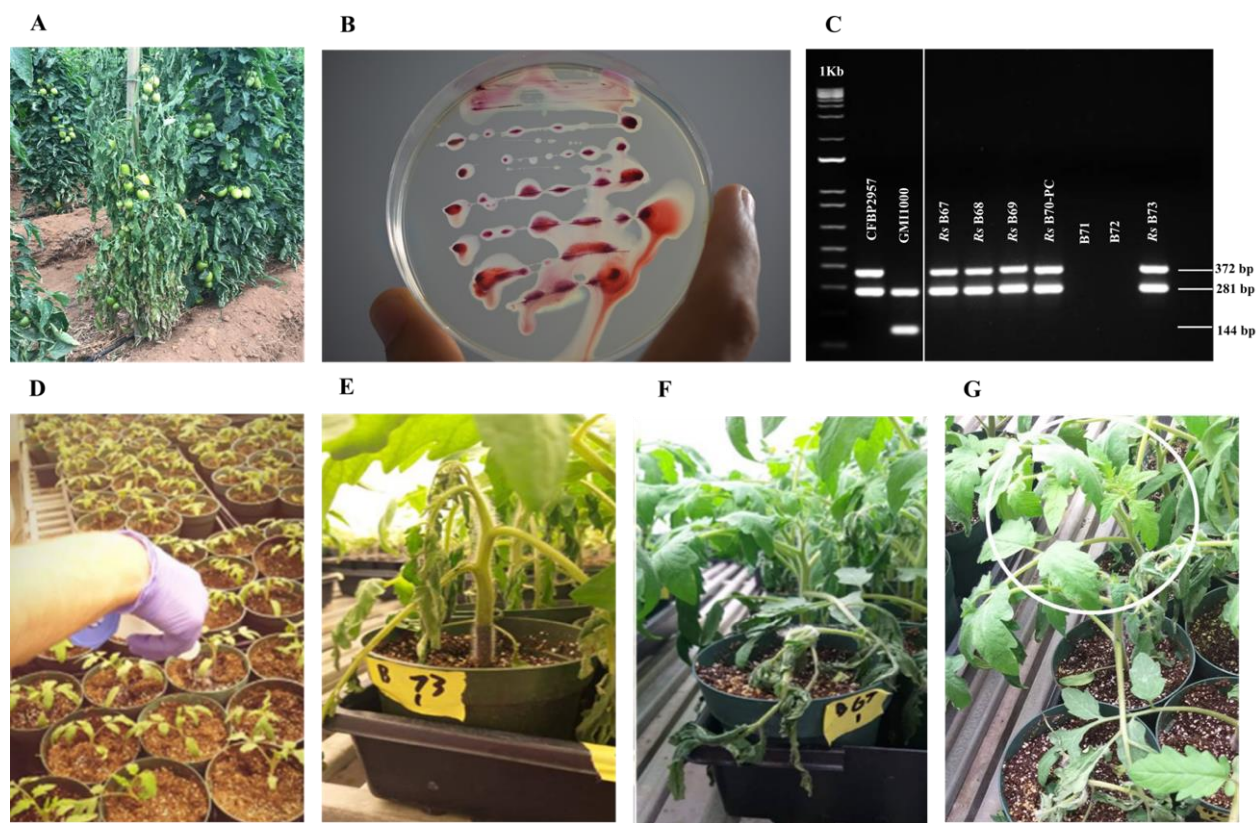


Figura 1. Isolamento, genotipagem e patogenicidade de isolados bacterianos do Complexo *R. solanacearum* oriundos do Espírito Santo, Brasil. Tomateiro em campo exibindo sintomas de murcha-bacteriana em Afonso Claudio-ES, Brasil (A). Isolamento de *Ralstonia* sp. a partir da amostra de tomateiro sintomática (A) em meio CPG + TTC,2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride. Nessa imagem é possível observar colônias típicas de isolados virulentos com coloração avermelhada no centro e branca nos bordos (B). No gel de agarose 1,8% detecta-se a presença do amplicon de 281 pb que confirma a identidade dos isolados como pertencentes ao Complexo *Ralstonia solanacearum* (CRS), o isolado CFBP2957 é o isolado referência para o perfil genético da espécie *Ralstonia solanacearum* (filitipo II) e o isolado GMI1000 é o isolado referência para o perfil genético da espécie *Ralstonia pseudosolanacearum* (C). Bioensaios em condições de casa de vegetação para investigar a patogenicidade dos isolados bacterianos do Complexo *Ralstonia solanacearum* oriundos Espírito Santo, Brasil (D). Os isolados RsB73 e RsB67 que apresentam produção de cápsula (tipo selvagem) induziram sintomas de murcha com posterior morte das plantas de tomateiro *cv.* Bonne Best (E e F). Plantas de tomateiro *cv.* Bonne Best inoculadas com o isolado RsB70-PC, deficiente para a produção de cápsula, não exibem sintomas de murcha (G).

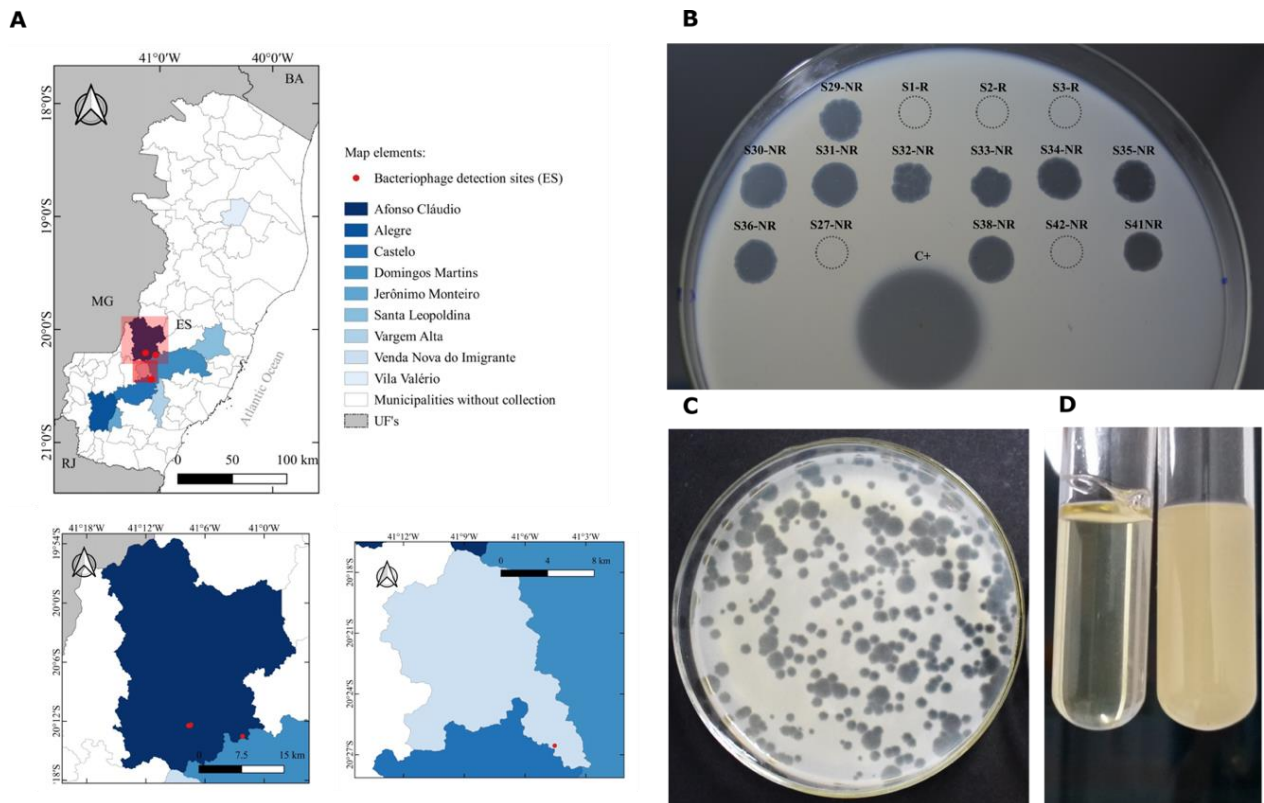


Figura 2. Detecção, isolamento e propagação de bacteriófagos que infectam espécies do CRS oriundos do estado do Espírito Santo, Brasil. Mapa do estado do Espírito Santo onde as coletas de solo, água e plantas foram realizadas com destaque para pontos (em vermelho) dos municípios do Espírito Santo onde a atividade bacteriolítica em solos (presença de vírus) foi detectada, tanto em áreas de cultivo de tomateiro com incidência da murcha-bacteriana quanto sem incidência (A). Atividade lítica em CPG dupla camada detectada por *Spot test*, as amostras positivas para presença de bacteriófagos apresentam zonas claras de lise confluentes, como ocorre com o controle positivo, C⁺ (antibiótico tetraciclina) (B). Placas de lise viral utilizadas para excisão e isolamento do bacteriófago Phage Elisiario após três etapas repetidas e sucessivas de ensaios de detecção de placas de lise (C). Propagação do bacteriófago Phage Elisiario em cultura bacteriana do isolado RsB70-PC com nítida lise celular (esquerda) e na mesma cultura bacteriana não inoculada a direita é possível observar alta turbidez (D).

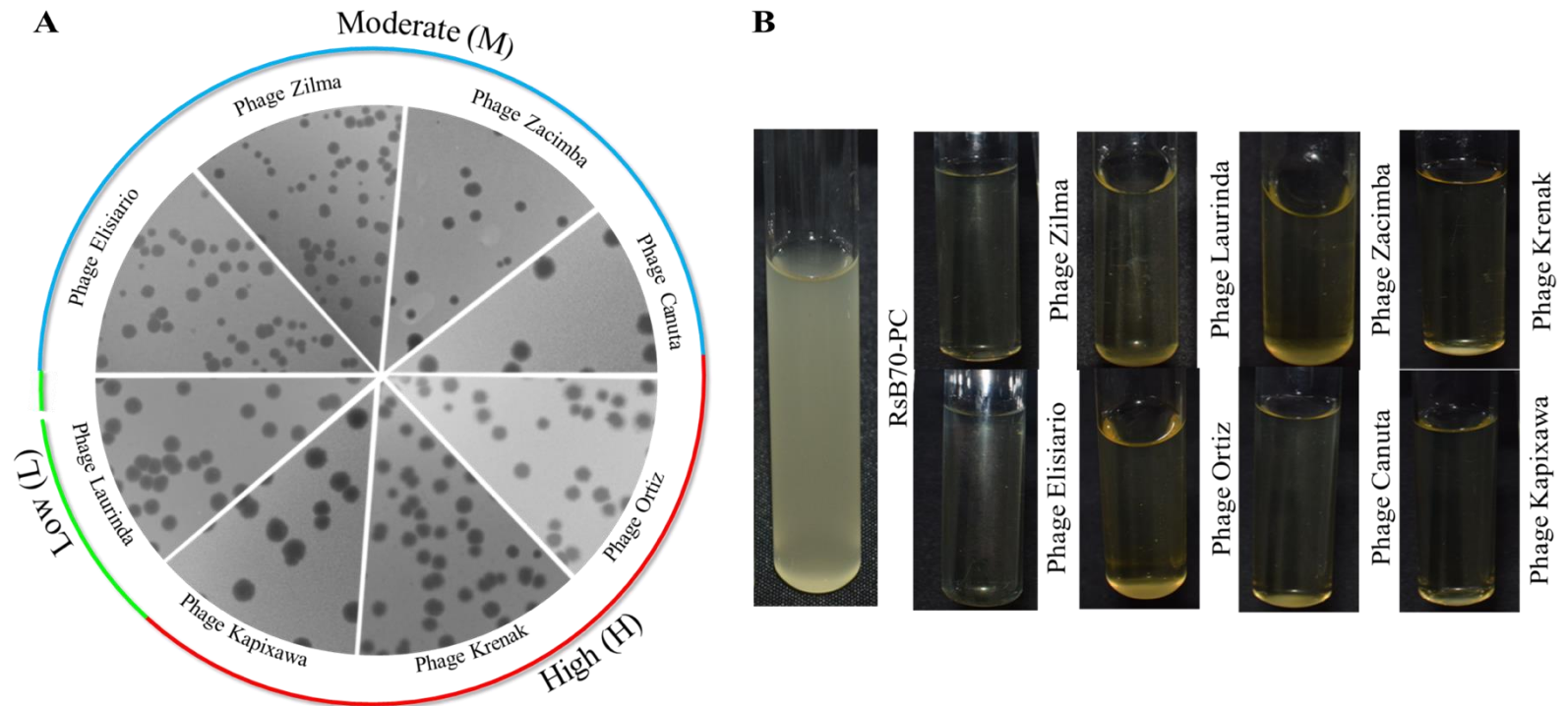


Figura 3. Morfologia das “placas” de lise virais e atividade lítica em cultura líquida de *Ralstonia solanacearum* RsB70-PC. Os oito bacteriófagos apresentam tamanhos distintos de placas de lise com morfologia levemente contrastante e podem ser agrupados em três grupos de agressividade com base em observações rotineiras quanto à velocidade e magnitude lítica de cada um. Baixa agressividade: Phage Laurinda, Moderada agressividade: Phages Elisiario, Zacimba, Zilma e Canuta, e Alta agressividade: Phages Ortiz, Kapixawa e Krenak (A). Tubos de ensaio controle contendo apenas a suspensão bacteriana de *R. solanacearum* RsB70-PC sem inoculação viral (esquerda), a direita perfil da atividade lítica dos oito bacteriófagos em culturas líquidas de *R. solanacearum* RsB70-PC, indicando a efetividade para reduzir o inóculo bacteriano (B).

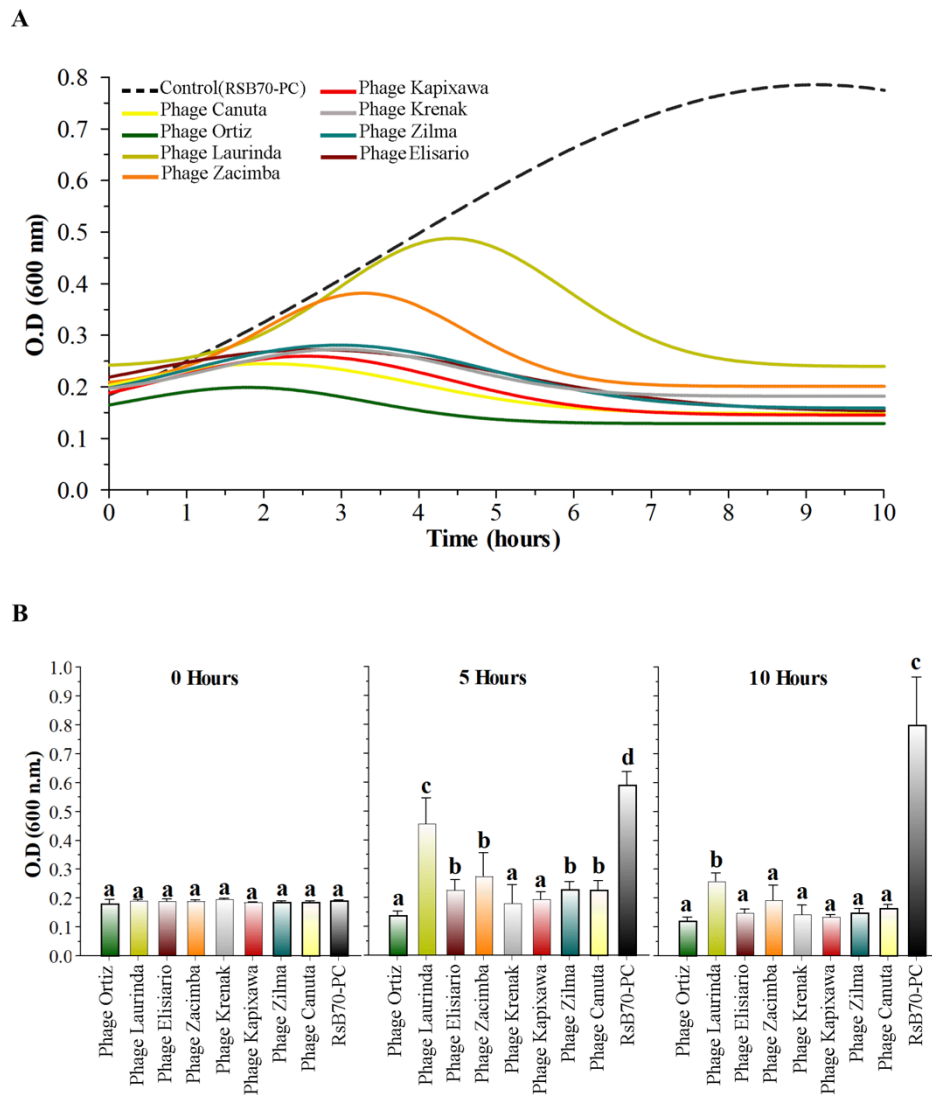


Figura 4. Determinação do perfil de agressividade dos bacteriófagos contra *R. solanacearum* usando a magnitude lítica viral como parâmetro de classificação. Comportamento da curva de crescimento de *R. solanacearum* RsB70-PC pós-infecção com os oito bacteriófagos. A linha (cor preta) tracejada indica a cultura bacteriana não infectada, em pleno desenvolvimento (A). Quantificação do declínio da densidade óptica nas culturas bacterianas de *R. solanacearum* RsB70-PC inoculadas com os oito bacteriófagos nos períodos 0, 5 e 10 horas pós-infecção (B).

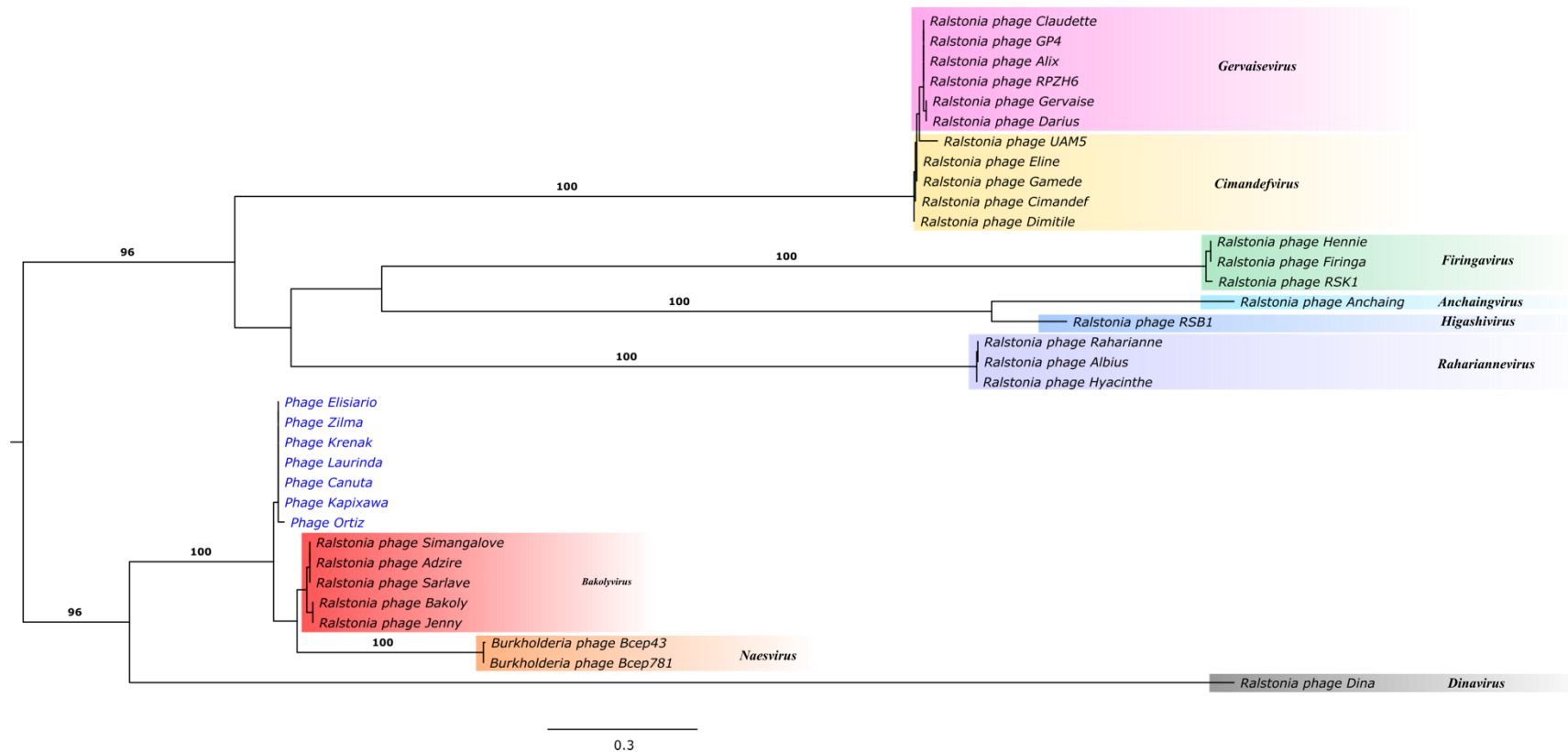


Figura 5. Árvore filogenética construída usando as sequências de aminoácidos da proteína principal do capsídeo “Major Capsid protein” de 27 bacteriófagos das famílias *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae* e *Autographiviridae*, além dos sete bacteriófagos isolados no Espírito Santo, Brasil (Phage Laurinda, Phage Ortiz, Phage Krenak, Phage Zilma, Phage Kapixawa, Phage Canuta e Phage Elisiario). Os comprimentos dos ramos são dimensionados em termos da fórmula de distância d_0 para árvores filogenéticas VICTOR baseadas em aminoácidos (Meier-Kolthoff & Göker, 2017). As topologias dos diferentes clados árvore no nível de gênero estão de acordo com a classificação determinada pelo VIRIDIC (Virus Intergenomic Distance Calculator) e são altamente consistentes (maior ou igual a 96 repetições bootstrap).

FIGURAS SUPLEMENTARES

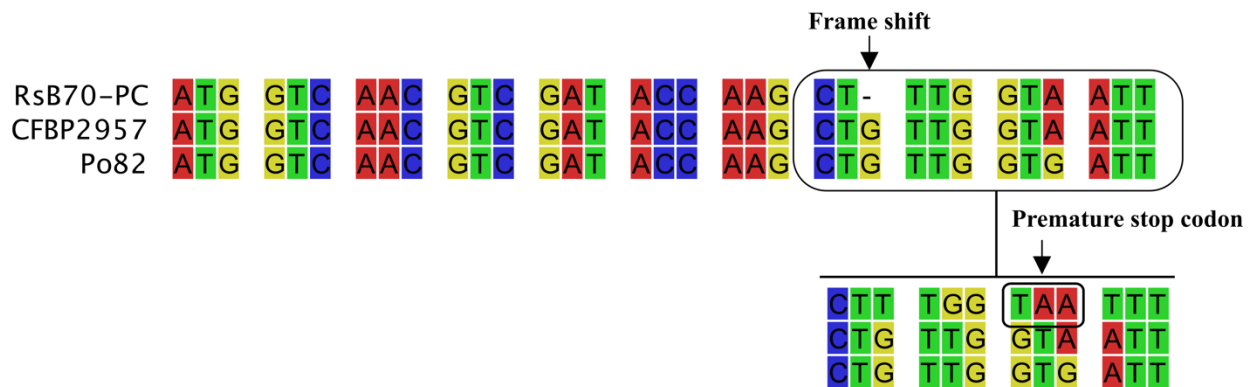


Figura suplementar 1. Caracterização genômica de *Ralstonia solanacearum* RsB70-PC, um mutante avirulento tipo PC-like adequado para propagação de bacteriófagos. Um códon prematuro (TAA) foi criado na sequência do gene *PhcA* após deleção de uma guanina (G) na posição do nucleotídeo 24 para o isolado RsB70-PC. A mutação causou uma alteração na fase de leitura e o produto truncado de *PhcA* é um peptídeo não funcional de 9 aminoácidos (aa). CFBP2957 e Po82 são isolados referência de *Ralstonia solanacearum* (filotipo II) que possuem as versões ‘wild type’ da proteína PhcA com 347 aa.

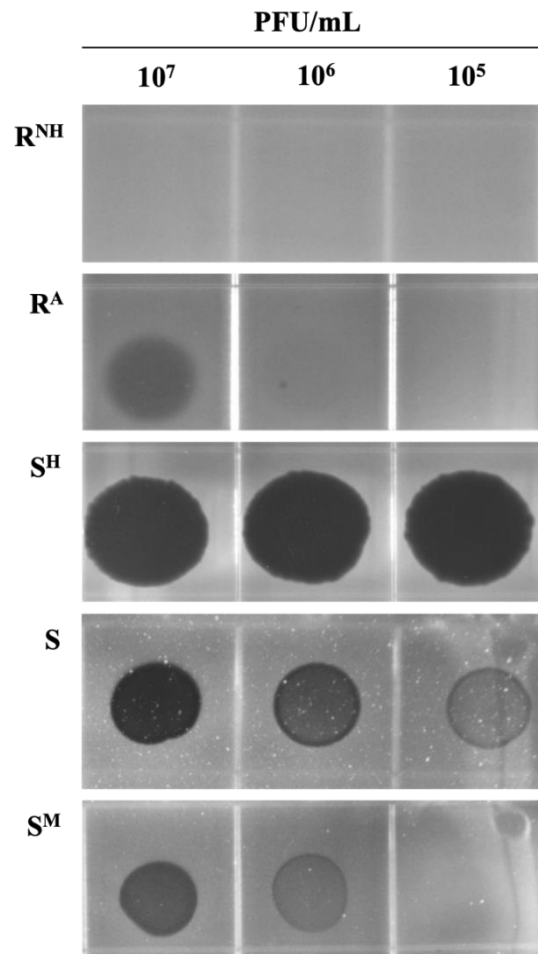


Figura suplementar 2. Fenótipo das interações vírus-bactéria com base no perfil de suscetibilidade (S) ou resistência (R) das bactérias testadas na gama de hospedeiro (tabela 2). Dois subtipos fenotípicos para resposta de resistência foram observados e para suscetibilidade foram observados três subtipos. R^{NH} (^{NH}=Non-host); R^A (A=Altruism); S (Susceptible); S^M (^M=Moderate); S^H (^H=Highly).