

## **Nova proposta para uso de bacteriófagos no controle de mancha foliar em repolho, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

A novel technique for use of bacteriophages and its use to control leaf spot of cabbage, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

MARRONI, Igor V.<sup>1</sup>; SCHINKE, Claudia<sup>2</sup>; GERMANI, José C.<sup>3</sup>

1 Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre/RS, Brasil, imarroni@terra.com.br; 2 Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre/RS, Brasil; 3 Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre/RS, Brasil, 34owi@ufrgs.br

---

**RESUMO:** Um novo método de produção e identificação de bacteriófagos em suspensão, e seu potencial como controlador biológico. A suspensão obtida por esta forma foi eficaz para controlar tanto *in vitro* quanto *in vivo* a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Evidenciou-se uma diferença entre a suspensão criada do patógeno (PLP) e outra que não foi (PLN), pois havia halos no crescimento bacteriano em 48 h / 28° C produzido pelas suspensões PLS e PLP, a suspensão PLN não apresentou halo. Apesar dos tratamentos PLP e PLS não diferirem estatisticamente em relação às UFCs, atingindo valores de  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^5$  respectivamente, diferiram da suspensão bruta (PLN) e da testemunha. Procedeu-se então avaliação *in vivo* com as suspensões que criaram halo, quando foram incluídos os tratamentos (PLPS) e (PLPP), que consistiram de inóculo adicionado nas suspensões matrizes (PLS e PLP), para o aumento de bacteriófagos. Verificou-se, então, a redução do índice de doença para a testemunha, mostrando que o tratamento com suspensão de bacteriófagos protege a planta. Os índices mais baixos de doenças foram (PLP) e (PLS), com valores de 1,46 e 1,40, respectivamente

**PALAVRAS-CHAVE:** controle biológico, vírus, bactérias, índice de doença.

**ABSTRACT:** A new method for production and identification of bacterial suspension and evaluation of its potential was observed against a plant bacteria. The suspension obtained by the new form was effective to control *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* both *in vitro* and *in vivo*. There is a difference when the suspension is created from the pathogen (PLP) and it was not (PLN). Clear zones was observed in 48 h / 28° C in suspensions PLS and PLP. Although PLP and PLS treatments do not differ statistically in relation to the CFU values getting  $5 \times 10^5$  and  $1 \times 10^5$  respectively, differed from the crude suspension (PLN) and the control. *In vivo* assessment was with the suspensions that make clear zones in plates. Were added *in vivo* treatments (PLPS) and (PLPP) with inoculum added to crudes suspension (PLP and PLS) for the increase of bacteriophages. The disease index was reduced to the control, showing that treatment with phage suspension protects the plant. The disease rates were lower (PLP) and (PLS) with values of 1.46 and 1.40 respectively.

**KEY WORDS:** biocontrol; vírus; bacteria; disease index.

Correspondências para: imarroni@terra.com.br

Aceito para publicação em 06/06/2012

## Introdução

Consideram-se poucos os vírus de DNA parasitos que causam danos em seu hospedeiro. Os bacteriófagos (fagos) constituem-se numa exceção, pois são constituídos, em geral, por fita de DNA e parasitam bactérias.

Os bacteriófagos, também conhecidos por fagos, são vírus com características diferentes dos demais, pois não entram na célula com seu capsídeo. Ao inserir seu material genético na bactéria dão início à síntese de outros fagos, formando o processo conhecido como lítico. Os fagos infectam, exclusivamente, bactérias ou archaea e todos possuem genoma constituído por DNA (MAHI, 2009), cuja forma lhes confere segurança ao manuseio, pois o DNA é composto por pontes de hidrogênio, que os deixam mais estáveis a condições adversas, protegendo, também, possíveis quebras de suas moléculas com a enzima polimerase. Logo, os fagos são mais estáveis que a maioria dos vírus que se encontram na natureza.

O trabalho com fagos não é novo e muitas informações importantes surgiram das primeiras pesquisas. A atividade dos fagos foi descoberta por d'Herelle em 1915 (SUMMERS, 2005), que reportou sobre o filtrado e sobre agentes que lisavam a célula bacteriana. Além disso, trata-se de estruturas diminutas que têm maior facilidade de se difundir no meio em que se encontram. Boyd et al. (1971) realizaram um estudo, mostrando que plantas de tomate absorveram o vírus depois de 3 h da imersão de suas raízes em uma suspensão que continha fagos de *Agrobacterium tumefaciens*. Após duas semanas, os fagos ainda podiam ser identificados na planta.

Em sequência, outros tantos trabalhos questionaram sua eficácia no controle biológico (OKABE & GOTO, 1963). Depois, os fagos foram postergados por um longo período de tempo, pensando-se que os agentes químicos poderiam tomar seu lugar (GOTO, 1992). Constatações recentes, como, por exemplo, cepas resistentes a

antibióticos, apontaram para a realização de novas pesquisas e novas formas de controle. Concomitantemente, evidenciou-se a necessidade de encontrar métodos voltados ao aspecto sustentável.

As fitobacterioses constituem-se num problema permanente para a agricultura em geral. Por isso, ocorrem significativas perdas para os agricultores e, conseqüentemente, para a economia global, pois ainda não existem formas de controle eficientes a elas. A condição controladora dessa doença associa-se, principalmente a cultivares resistentes, no entanto fatores ambientais, como a umidade, favorecem a virulência, (JOHNSON et al., 2011). As bactérias, ao contrário dos fungos, não são controladas com a mesma eficiência por meios químicos. Uma forma de controle, comumente usada, remete aos agentes cúpricos e a antibióticos, como a Estreptomina, porém, por causarem resistência nos patógenos, surgiram novas pesquisas, centradas no controle biológico das fitobacterioses (JONES et al., 2007).

Na vanguarda do controle biológico estão sendo usadas rizobactérias, geralmente isoladas de solos supressivos, como bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*, que podem potencializar o controle químico, principalmente para debelar as doenças fúngicas. Stockwell & Stack (2007) observaram que a aplicação de *Pseudomonas* spp. e BlightBan A506 em pereiras e macieiras suprimiu o crestamento bacteriano, causado por *Erwinia amylovora*. Maketon et al. (2008) usaram o sinergismo entre *Bacillus* e *Trichoderma* e, juntos, conseguiram inibir a doença do tabaco. O problema do uso de bactérias reside no fato de serem produtoras de antibiose, toxinas e enzimas, que podem causar reações imprevisíveis à microbiota local (FRITZE, 2004).

Apesar de quase inexistirem trabalhos sobre a ação dos vírus no controle biológico de fitobacterioses, sabe-se que eles parasitam, eficientemente, esses microrganismos na natureza, através do processo lítico. Cada fago é específico

para uma determinada bactéria, portanto incapaz de infectar outras formas de vida (HAGENSs & OFFERHAUS, 2008). Logo, em princípio, o método utilizado deverá ser aplicável a qualquer bactéria. Fala-se de um controle biológico feito através de um método que não necessita de altos custos para a sua aplicabilidade, bem como de especialistas em virologia, portanto, adequado às condições brasileiras.

Poucos são os trabalhos de controle biológico que utilizam fagos nas ferramentas de busca. Em ferramentas como *Scielo*, *Phytophatology*, *Plant Pathology*, *Biological Control* e *Biocontrol*, inexistem qualquer referência sobre esse possível antagonista. Apenas a *Plant Disease* apresenta seis artigos com estudos de vírus no controle biológico de plantas, quase todos adquiridos em laboratórios.

Nos trabalhos existentes, com apenas uma metodologia, os autores isolaram o patógeno utilizando técnicas de virologia, como a titulação (BALOGH et al., 2003).

Inúmeros relatos afirmam não serem os fagos eficientes biocontroladores, fundamentados no resultado da má avaliação feita à suspensão que contém os vírions (figura 1). Na suspensão, acompanha os vírions uma grande quantidade de material orgânico, capaz de inibir o crescimento da bactéria, não se sabendo se a alteração do crescimento bacteriano foi causada pelos fagos ou por enzimas e toxinas.

### Material e métodos

Folhas de repolho (*Brassica oleracea* Capitata), apresentando lesões típicas de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* foram cortadas nas regiões lesionadas, favorecendo o exsudato bacteriano de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Pedacos dessas folhas foram dispostos em Erlenmeyers, com meio líquido de cultura GYCA em quantidade de 150 mL (Glicose -

10 g, Extrato de Levedura - 5 g, CaCO<sub>3</sub> - 30 g, H<sub>2</sub>O destilada - 1000 mL) e incubadas (24 h / 28<sup>o</sup> C) em agitador orbital. Neles, adicionou-se o inóculo da bactéria (previamente isolada da lesão) identificada, bioquimicamente, como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Fez-se, também, uma suspensão usando repolho com folhas lesionadas, em que o patógeno, intencionalmente, não foi isolado. Neste caso, o microrganismo isolado de outra folha foi inoculado. Adotou-se tal metodologia para verificar se os fagos encontrados na bactéria iriam ter a mesma eficiência em nicho diferente do que foi isolado, no caso, de folhas infectadas, provavelmente por outra subespécie de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Em sequência, estabeleceu-se um comparativo entre métodos de preparação da suspensão de fagos. Acrescentou-se, então, uma fonte de carboidrato, sacarose (2 g), formando, assim, a suspensão (PLS) produzida da suspensão em que o patógeno foi isolado e inoculado, para provocar o aumento exponencial do número de bactérias (PLP).

Logo, as suspensões usadas no trabalho foram classificadas em:

**PLP** = suspensão bruta, formada da planta lesionada e do patógeno dela isolado;

**PLN** = suspensão bruta, formada de planta lesionada, sem que o patógeno tenha se originado dela;

**PLS** = suspensão bruta, formada da planta lesionada e do patógeno dela isolado (PLP), acrescida de 2 g de sacarose para o aumento de bactérias e de fagos, conseqüentemente;

**PLPP** = suspensão usada para inoculação em plantas, PLP alterada pela adição de inóculo bacteriano, visando aumentar a população de vírions;

**PLPS** = suspensão usada para inoculação em plantas, PLS alterada pela adição de inóculo

Nova proposta para uso de bacteriófagos

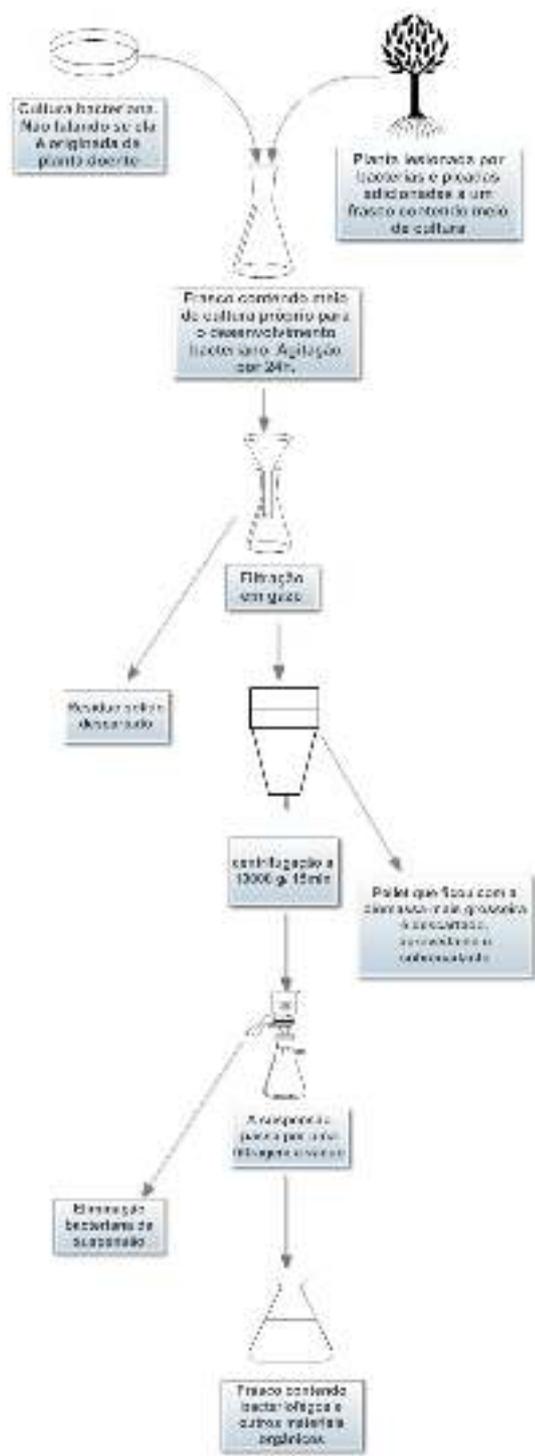


Figura 1: Método típico de isolamento de fagos na agronomia brasileira. (Romeiro, 2001).

bacteriano, objetivando o aumento populacional de *virions* na suspensão.

Da suspensão bruta, contendo 150 mL do meio de cultura em forma líquida (GYCA), mais 10 g de folhas lesionadas de repolho, com inóculo do patógeno (PLN) e (PLP) (neste caso, podendo ou não ter a adição de 2 g de sacarose) isolada da própria planta, ou não isolada da lesão da planta, fez-se uma filtração com gaze. Assim, obteve-se o extrato (isento) da biomassa. Através de centrifugação, retirou-se o conteúdo mais denso (Janetzki k 23) 5000 g. / 45 min. Após, o sobrenadante passou por filtro milipore® de 0,22 µm, para a retirada das bactérias, e os filtrados obtidos foram divididos em duas partes, seguindo metodologia alternativa proposta por Svensson & Christianson (1991). Uma alíquota foi aquecida a 95° C por 5 min, tempo e calor suficientes para evitar desnaturações de proteínas e enzimas que poderiam dificultar a avaliação, ficando essa alíquota sem o vírion; a outra não sofreu aquecimento e, por isso, teve o vírion em sua suspensão, confirmando, com maior segurança, que a inibição ocorreu devido à presença de vírions.

Em testes paralelos, o patógeno foi relacionado a compostos produzidos pelo seu hospedeiro (no caso, a planta sem lesões), para a confirmação de que compostos vegetais não modificam o desenvolvimento da bactéria. Para isso, folhas de repolho saudáveis foram postas em banho de água, a 100° C / 1 h e, em sequência, separadas da suspensão, do material líquido, sendo guardadas a 4° C, até seu uso. Para crescerem, adicionou-se 100 µL de uma suspensão contendo *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, juntamente com 100 µL do líquido vegetal em, aproximadamente, 150 mL de meio líquido GYCA por 24 h, a uma temperatura de 28° C. Concluído o tempo previsto, colheu-se uma amostra da suspensão (100 µL), espalhando-a com o auxílio de uma alça de Drigalsky em meio de cultura GYCA, solidificado em placas de Petri.

Neste meio de cultura, observando-se o mesmo tempo e temperatura, acrescentou-se 100 µL de água destilada, juntamente com idêntica quantidade de inóculo, formado da suspensão do patógeno. Desenvolvidas as bactérias, coletou-se uma amostra 100 µL e, através da alça de Drigalsky, o líquido foi espalhado na superfície do meio GYCA solidificado em placas de Petri. As placas, contendo líquido vegetal e água esterilizada, foram incubadas em temperatura de 28° C / 24 h. O teste seria considerado positivo se a bactéria crescesse igualmente nas duas placas, indicando que as toxinas produzidas pela planta não inibem o desenvolvimento do patógeno.

Constatando que não houve atividade do líquido vegetal sobre o patógeno, prosseguiu-se com o experimento. Em meio GYCA líquido (125 mL), inoculou-se o patógeno (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) junto a uma quantidade de 100 µL da suspensão contendo o vírion e, paralelamente, da suspensão que se supunha não conter o vírion. Logo, incubou-se a bactéria, nos dois casos, a 28° C / 24 h, aguardando o tempo necessário para o crescimento das bactérias e possível ação antagônica dos vírus. Após desenvolvimento ou não das bactérias, em placas de Petri, contendo meio GYCA, com alça de Drigalsky, espalhou-se 100 µL sobre o meio, incubando-se as placas em temperatura controlada de 28° C / 48 h e observando-se haver ou não crescimento bacteriano. Para prosseguir com o experimento, o microrganismo precisava crescer no meio em que foi semeada a suspensão que inativou o vírus por calor, e não crescer, ou apresentar deficiência (como crescimento reduzido) onde o tratamento físico não foi utilizado, indicando uma provável presença do vírus.

Avaliou-se, também, o efeito que a suspensão contendo fagos causa em uma população bacteriana. Para isso, utilizou-se o método de diluição em placa para contagem de UFCs. A bactéria repicada em um Erlenmeyer, na

quantidade de 150 mL de meio GYCA líquido, foi incubada por 28° C / 24 h, até seu desenvolvimento. Coletou-se, então, uma alíquota de 100 µL da suspensão, contendo bactéria para, aproximadamente, 150 mL líquido do meio GYCA, nesse mesmo meio foi inoculado as diferentes suspensões contendo fagos (PLP, PLS e PLN), na concentração de 100 µL, verificando a ação de cada suspensão em relação à fitobactéria. De imediato, os Erlenmeyers foram colocados em agitador orbital por 24 h / 28° C. Findo o tempo de desenvolvimento, houve uma diluição seriada. Com a testemunha utilizou-se o mesmo tratamento, porém no lugar da suspensão contendo fagos adicionou-se 100 µL de água esterilizada, no meio em que a bactéria cresceu. Após 24 h de incubação, a uma temperatura de 28° C, verificou-se, buscando saber se a população bacteriana alterou-se quando em contato com o vírus. A população bacteriana seria, então, resultante de uma triplicata nas diluições de 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup>.

A metodologia empregada pode ser claramente esclarecida na figura 2.

#### Teste *in vivo*

Sendo o teste positivo para a produção de fagos *in vitro*, fez-se o teste em casa de vegetação, com mudas (de um mês) de repolho, com temperatura variando de 10 a 20° C. Experimentou-se uma nova forma para aumentar a população de vírions. Assim, as suspensões que tiveram resultado positivo para avaliação *in vitro* (produzindo halos nos meios de cultura) PLP e PLS, foram inoculadas com o patógeno (hospedeiro), para que o processo lítico fosse formado e o número do antagonista na suspensão aumentado, criando as suspensões PLPP e PLPS respectivamente. Utilizou-se, também, uma suspensão do vírion, em que foi adicionada água esterilizada ao invés da suspensão contendo bactérias, para se observar se a adição de inóculo na suspensão contendo fagos é

positiva ao aumento do controle da fitobacteriose. A testemunha consistiu, apenas, em inocular o patógeno na folha. Tal procedimento (da testemunha) confirmou os postulados de Koch, indicando tratar-se, realmente, de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* feitos através de avaliações bioquímicas. Para a avaliação *in vivo*, utilizou-se de triplicata: as plantas de repolho foram dispostas, aleatoriamente, na bancada; fez-se uma suspensão de 1 x 10<sup>8</sup> do patógeno e, junto a ela, adicionou-se 100 µL da suspensão contendo fagos; a testemunha recebeu o mesmo tratamento, porém com a adição de água. Com uma tesoura mergulhada na suspensão, fez-se cortes no limbo de 5 folhas por planta, obtendo, no total, 15 lesões/tratamento, uma planta/ pote, sendo o teste feito em triplicata. As mudas foram vedadas por 24 h em sacos de polietileno, para favorecer a infecção pelo patógeno. Após um mês, foi possível observar as lesões nas folhas. Logo, traçou-se uma escala diagramática, com três escalas diferentes de doenças:

1<sup>a</sup>) a folha não apresentava sintoma;

2<sup>a</sup>) a folha apresentava um leve sintoma, como algumas pequenas e poucas manchas amareladas foliares, pequena necrose onde foi feito o corte e murcha;

3<sup>a</sup>) a folha apresentava sintomas severos, como clorose, grandes manchas, severa necrose onde foi feito o corte, bem como murcha.

Para elaborar um índice de doença das plantas, usou-se a fórmula alternativa proposta por Marroni et al. (2012),

$$\sum n \times i(1 \sim 3) / 5$$

, onde: **n** é o número de mudas e **i** é o índice dos sintomas apresentados pelas plantas, que vai de: 1

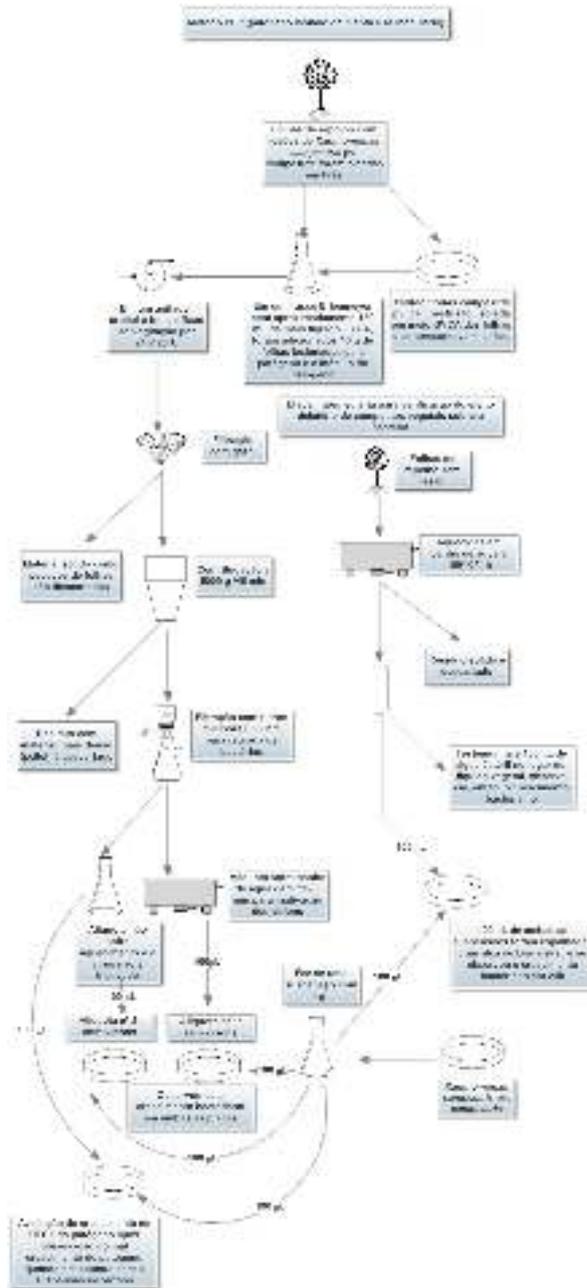


Figura 2: Novo método proposto por Marroni, Schinke, Germani para produção de uma suspensão aquosa que contenha bacteriófagos

sem sintomas; **2** sintomas leves, como necrose no local do corte, pequenas e poucas manchas amareladas; **3** sintomas severos: forte necrose onde se fez o corte e clorose na folha; **5** é o número de lesões por plantas. É interessante salientar que quanto maior for o índice de doença mais severa será a doença na planta, e que foi feita uma lesão por folha.

#### Análise estatística

A análise da variância foi feita por ANOVA, verificando-se a diferença das médias através do teste de Duncan (5% de probabilidade), utilizando o programa Assistat®.

#### **Resultados**

Foi notória a diferença entre o patógeno da suspensão submetida ao tratamento térmico, inativando o microrganismo (vírus), e a suspensão onde o vírion estaria contido (figura 5). (A) ação da

suspensão PLS, em que se adicionou 2 g de sacarose na suspensão PLP, essa foto é um indicativo de que o aumento da população bacteriana, devido à adição de uma fonte a mais de carboidrato, é positivo ao aumento do controle dos vírions em relação ao patógeno; (B) mostra a reação da bactéria quando em contato com a suspensão em que o vírion foi isolado do patógeno e que o halo não é tão grande quando à mesma suspensão adiciona-se sacarose; (C) é a placa em que se observa crescimento pleno do parasito, pois o vírus foi inativado e (D) uso do patógeno hospedeiro de fagos distintos da lesão. Isto ocorre porque os fagos que estão com a bactéria terão mais dificuldade de parasitá-las do que na suspensão PLP, ressaltando a necessidade de, preferencialmente, isolar-se fagos de cultivares iguais e de regiões próximas ou, também, da planta onde se encontra a enfermidade (figura 4).

Cabe-nos ressaltar a figura 5 (D), em que o



Figura 3: Escala diagramática de folhas de repolho submetidas a diferentes tratamentos: (1) sem sintoma algum; (2) com leves sintomas, como necrose onde foi feito o corte, e pequenas e poucas manchas amareladas; (3) sintomas severos, como clorose total da folha, e forte necrose no corte.

fitopatógeno no seu meio de cultura, com a adição de vírus, apresenta menor pigmentação. É provável que isto ocorra devido à ação do vírus no patógeno, indicando a morte das bactérias provavelmente por ação dos fagos, mas não de muitas, ao ponto de

formar halo. Pode-se observar, inclusive, que a forma mais clara na placa não é pontual, é total, indicando uma provável infestação do vírus na comunidade bacteriana. A figura "5 C" mostra-se mais pigmentada do que as demais, certamente por

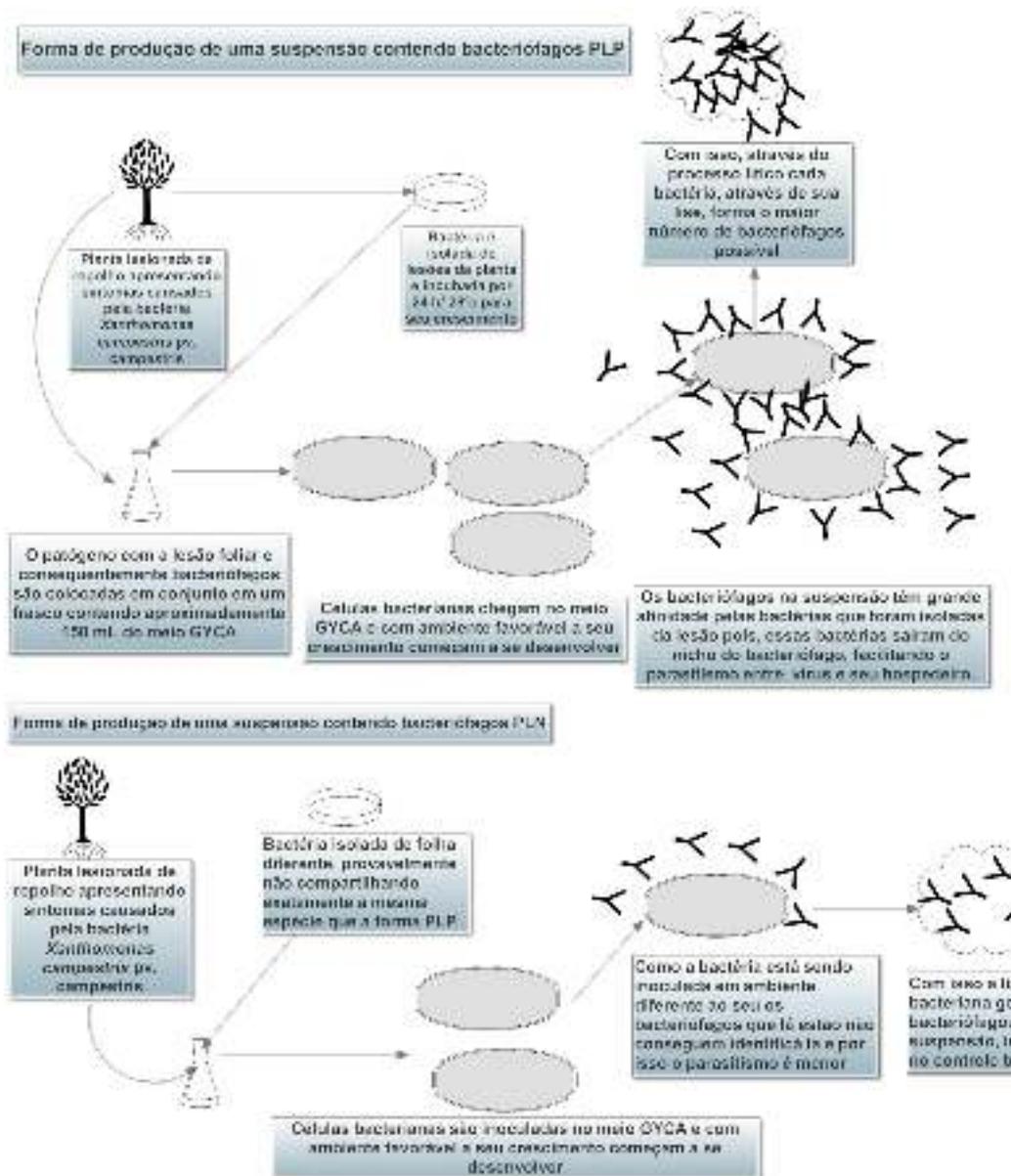


Figura 4: Diferenças nos processos líticos ocorridos na etapa inicial que se formam nas diferentes suspensões matrizes, PLP e PLN, explicando a diferença na quantidade de fagos em cada suspensão proposta por Marroni, Schinke, Germani.

causa da produção da Xanthomonadina, um pigmento próprio desse gênero de bactéria, evidenciando que a mesma se desenvolve bem na ausência do vírus.

Observa-se, na tabela 1, que as suspensões PLP e PLS obtiveram a média  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^5$ , respectivamente, para a produção de UFCs, sendo que essas duas suspensões diferiram estatisticamente do tratamento PLN e da testemunha. A suspensão PLN apresentou um resultado positivo, diferenciando-se da testemunha, obtendo valores de  $3,2 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$ , respectivamente, porém a suspensão PLN mostrou-se inferior aos dois outros tratamentos. Os tratamentos PLP e PLS apresentaram maior redução de UFCs da bactéria. Isso acontece porque os fagos são bastante específicos ao seu hospedeiro. Tal deficiência costuma ser contornada pelo seu uso sinérgico com outras formas de controle (CARZANIGA et al., 2002) (RADEMAKER et al., 2006). Mas, como mostra a figura 5 (D), onde há o crescimento da bactéria observa-se uma forma menos pigmentada do que na placa C, em

que o vírus foi inativado. Provavelmente, um indicativo de que os fagos combateram o patógeno, evidenciado pela diminuição de Xanthomonadina e pela diferença da viscosidade que se pode constatar através das fotos, mas não ao ponto de formar halos, como nos tratamentos PLP e PLS [figura 5 (A e B)].

Conforme mostra a tabela 2, todos os tratamentos PLP, PLS, PLPP e PLPS tiveram médias 1,46; 1,66; 1,4; 1,53, para o índice de doença, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. À primeira vista, demonstra que incluir inóculo na suspensão contendo vírions não é positivo em relação ao controle da fitobacteriose, pois, estatisticamente, os tratamentos citados equivaleram-se aos tratamentos matrizes (PLP e PLS), apesar de serem superiores à testemunha e, também, quando se adiciona água à suspensão. No entanto, ao mesmo tempo, a tabela 2 deixa-nos perceber que há uma diferença entre a adição de água e o inóculo do hospedeiro, pois PLPP diferiu estatisticamente do tratamento com água com

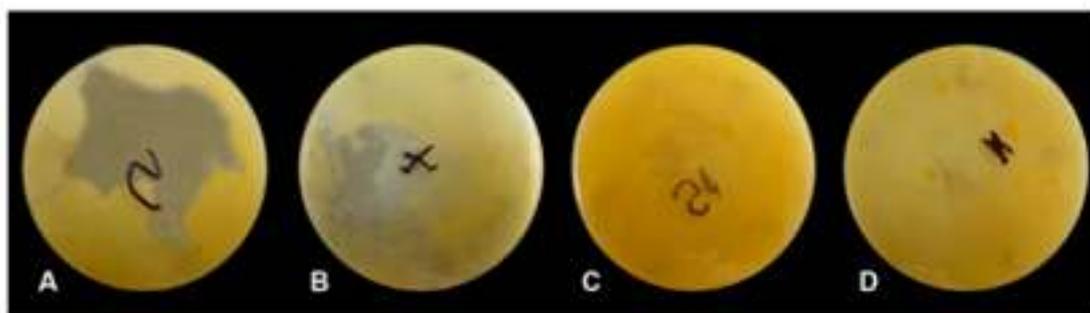


Figura 5: Teste *in vitro* após 48 h, com diferentes suspensões, contendo bacteriófagos. (A) é a suspensão PLP com adição de 2 g de sacarose (PLS); (B) é a suspensão com bacteriófagos PLP, em que o vírus foi isolado dos produtores da lesão e de seu agente etiológico; (C) suspensão onde o vírus foi inativado por  $95^{\circ}$  C, em 5 min; (D) efeito da suspensão não criada do próprio patógeno (PLN).

valores 1,66 e 2,13, respectivamente. O tratamento PLPS, ainda que superior ao tratamento feito com água, não diferiu estatisticamente dela, segundo consta na tabela 2.

### Discussão

Com a alteração da metodologia proposta por Romeiro (2001), suspensões que continham fagos

se mostraram eficientes controladores biológicos, inibindo, *in vitro*, o crescimento do patógeno em 48 h. Não raras vezes, microrganismos que contêm um arsenal enzimático, bacteriocinas e toxinas, como fungos e bactérias, necessitam fazer screening de centenas de isolados (KOHL et al., 2011). O tempo gasto para o screening é alterado quando, no controle biológico, se faz uso de vírion altamente

Tabela 1: médias da contagem das UFCs por diluição seriada e sua significância entre os tratamentos comparados pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Suspensões matrizes	Média das UFCs	Significância estatística
PLP	$5 \times 10^5$	c
PLS	$1 \times 10^5$	c
PLN	$3,2 \times 10^7$	b
Testemunha	$5 \times 10^8$	a

Médias representadas pela mesma letra na coluna não diferem entre si.

Tabela 2

Índice médio de doença de		
Suspensões	plantas	
PLP	(1)1,46	a
PLPP	1,66	ab
PLS	1,4	a
PLPS	1,53	a
água	2,13	b
Testemunha	2	b

(1) Na parte esquerda da tabela mostra a média do índice de doença dos diferentes tratamentos, tratamentos que tem letra similar na coluna não diferem estatisticamente entre si para o índice de doença da planta.

específico ao seu hospedeiro (HENRIQUES, 2008). Ao tempo em que há escassez de trabalhos utilizando fagos no controle biológico, vários mostram a diferenciada especificidade desse tipo de vírus, usado em ensaios sorológicos (GRIEP et al., 2000; CARZANIGA et al., 2002; RADEMAKER et al., 2006). A tabela 1 evidencia que o tratamento tem menor eficiência quando se usa suspensão não feita a partir do patógeno, o que ocorre em muitos casos (LANG et al., 2007; OBRADOVIC et al., 2004) isso acontece porque a especificidade dos fagos em relação ao seu hospedeiro é diminuída. Nos raros trabalhos em que se fez uso de fagos para o controle biológico (LANG et al., 2007), estes foram conseguidos, previamente, por indústrias que, em geral, se utilizam de técnicas sofisticadas e, portanto, de técnicos especializados e de equipamentos dispendiosos. Obradovic et al. (2004) também fizeram uso de fagos previamente preparados por indústrias, no uso combinado com outros compostos, como indutores de SAR. Balogh et al. (2008) utilizaram fagos em associação com agentes cúpricos, para debelar a doença do cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* pv. *citri*. É preciso deixar claro, no entanto, que esses vírions foram conseguidos de hospedeiros e de regiões geográficas diferentes, provavelmente com uma carga genética distinta dos patógenos que pretendiam combater. Logo, não se tratava, exatamente, da mesma espécie que, por comprometer a eficácia do método, obrigava o seu uso sinérgico com outros métodos. Acredita-se que seja interessante comparar o método de controle biológico por vírions com outros métodos, mas é ecologicamente necessário obter um controle unitário mais eficiente pelos vírions, pois a grande relevância desse tipo de controle é o inexistente impacto que ele causa no meio em que se insere. Ressalta-se que o uso sinérgico dos fagos (JONES et al., 2007) muda, radicalmente, o objetivo do uso de tecnologias “limpas” direcionadas ao que se propõe o controle biológico.

O experimento *in vivo* apresentou resultados positivos, pois foram usadas, apenas, quatro suspensões: uma criada a partir da lesão e do patógeno que provocou a lesão, outra criada a partir dessa suspensão, a que se acrescentou uma quantidade de sacarose (2 g) e os tratamentos em que foram adicionados inóculos do hospedeiro (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), para aumentar o número de vírions no meio.

No decorrer do presente trabalho constatou-se que é possível melhorar o tratamento da seguinte forma: o inóculo, semeado em um meio e submetido a diversas filtragens, evidenciou a pobreza do meio em energia. Assim, o hospedeiro (bactéria) não podia se desenvolver a um número elevado, tal como seu parasito (fagos). Porém, a situação pode ser contornada com uma simples adição de fonte de carboidrato junto ao hospedeiro.

O estudo direcionou-se ao *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, mas o método adotado poderá ser útil, de forma prática, no combate de qualquer fitobacteriose, constituindo-se numa alternativa à metodologia que se encontra nos livros de agronomia do Brasil, não necessitando conhecimento profundo de virologia. A experimentação comprovou que os vírions são bons controladores biológicos, capazes de controlar um importante patógeno (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). Demonstrou-se que é preferível isolar o vírion de bactérias das quais são agentes etiológicos, ou seja, isolar a bactéria da lesão (região), isolar o vírion e, com ele, tratar a doença. Os fagos são muito específicos e trazê-los de uma origem diferente do local onde a doença se instalou pode comprometer sua eficiência, como sugerido no trabalho.

Através deste estudo pareceu-nos possível inovar, revendo conceitos referentes ao controle biológico de fitobactérias. No entanto, ele não é conclusivo, apesar de mostrar que os fagos são úteis para debelar uma importante fitobacteriose na agricultura *in vitro* e *in vivo*, sem que haja

necessidade de outros tratamentos em uso sinérgico e, principalmente, adotando uma técnica simples e perfeitamente viável em ambientes em que não há condições técnicas ou de desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Por isso, novas pesquisas são necessárias, para que haja maior especificidade e aprimoramento do método de controle biológico.

### Agradecimentos

Ao Departamento de Fitotecnia da UFRGS, por ter cedido folhas com lesão de *Xanthomonas*.

À Capes, pelo apoio financeiro.

### Referências Bibliográficas

- BALOGH, B.; CANTEROS, B.I.; STALL, R.E.; JONES, J.B. Control of Citrus Canker and Citrus Bacterial Spot with Bacteriophages. **Plant Disease**, 92:1048-1052, 2008.
- BALOGH, B.; JONES, J.B.; MOMOL, M.T.; OLSON, S.M.; OBRADOVIC, A.; KING, P.; JACKSOB, L.E. Improved Efficacy of Newly Formulated Bacteriophages for Management of Bacterial Spot on Tomato. **Plant Disease**, 87:949-956, 2003.
- BOYD, R.J.; HILDEBRANDT, A.C.; ALLEN, O.N. Retardation of crown gall enlargement after bacteriophages treatment. **Plant Disease**, 55:145-148, 1971.
- CARZANIGA, R.; FIOCCO, D.; BOWYE, P. R.; O'CONNELL, R.J. Localization of Melanin in Conidia of *Alternaria alternata* Using Phage Display Antibodies. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 15:216-224, 2002.
- FRITZE, D. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. **Phytopathology**, 94:1245-1248, 2004.
- GOTO, M.. **Fundamental of Bacterial Plant Pathology**. Academic, San Diego, 1992.
- JONES, J.B.; JACKSON, L.E.; BALOGH, B.; OBRADOVIC, A.; IRIARTE, E.B.; MOMOL, M. T. Bacteriophages for plant disease control. **Phytopathology**, 45:245-262, 2007.
- JOHNSON, K.I.; MINSAVAGE, G. V.; LÊ, V.; JONES, J.B.; WALCOTT, R. R. Efficiency of a nonpathogenic *Acidovorax citrulli* strain as a biocontrol seed treatment for bacterial fruit blotch of cucurbits. **Plant Disease**, 95:697-704, 2011.
- GRIEP, R. A.; PRINS, M.; VAN TWISK, C. KELLER, H.J.H.G.; KERSCBAUMER, R. J.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. W.; SCHOTS, A. Application of Phage Display in Selecting Tomato spotted wilt virus-Specific Single-Chain Antibodies (scFvs) for Sensitive Diagnosis in ELISA. **Phytopathology**, 90:183-190, 2000.
- HAGENS, S.; OFFERHAUS, M. L. Bacteriophages - New weapons for food safety. **Food Technology**, 62:46-54, 2008.
- HENRIQUES, A. P. De A. R. Uso de bacteriófagos para controlo de *Salmonella* em avicultura. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro, Portugal, 2003.
- LANG, J.M.; GENT, D.H.; SCHUART, H. F. Management of *Xanthomonas* Leaf Blight of Onion with Bacteriophages and a Plant Activator. **Plant Disease**, 91:871-878, 2007.
- KOHL, J.; POSTMA, J.; NICOT, P.; RUOCCO, M.; BLUM, B. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. **Biological Control**, 3:1-12, 2011.
- MAKETON, M.; APISTSANTIKU, J.; SIRIRAWEEKUL, C. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39: 24-30, 2008.
- MAHY, B. W. J.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. **Desk Encyclopedia of General Virology**. Oxford, Academic Press, 672 p, 2009.
- MARRONI, I. V.; UENO, B.; MOURA, A. B. Chemical and biological treatments of castor bean seeds: effect on germination, emergence and associated microorganism. **Revista Brasileira de Sementes**, 34:1-8, 2012.
- OBRADOVIC, A.; JONE, J. B. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. **Plant Disease**. The American Phytopathological Society, 88:712-716, 2004.
- OKABE, M.; GOTO, M. Bacteriophages of plant pathogens. Annual Revision. **Phytopathology**, 1:397-418, 1963.
- RADEMAKER, J. L. W.; NORMAN, D. J.; FORSTER, R. L., LOUWS, F. J.; SCHULTZ, M. H.; BRUINJ, F. J. Classification and identification of *Xanthomonas translucens* isolates, including those pathogenic to ornamental Asparagus. **Phytopathology**, 96:12, 2006.

Nova proposta para uso de bacteriófagos

- ROMEIRO, R. S.. **Métodos em bacteriologia de plantas**. 4<sup>a</sup>. Ed., Editora UFV, Viçosa/ MG, 2001,
- SVENSSON, U.; CHRISTIANSON, A. **Methods for phage monitoring**. Bull. FIL-IDF 263:29-39, 1991.
- STOCKWELL, V. O.; STACK, J. P. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. **Phytopathology**, 37: 12-18, 2007.
- SUMMERS, W. C. Bacteriophage research: early history. In: KUTTER, E. e SULAKVELIDZE, A. (Eds.). **Bacteriophages: Biology and Applications**. Boca Raton, FL. CRC Press. pp.5-27, 2005.