

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO



“Estudio de *Pseudomonas* ambientales aisladas desde tomates, su resistencia a agroquímicos, y el efecto de la resistencia a bacteriófagos en la motilidad.”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Por

Victoria Paz Rojas Martínez

Director:

Dr. Gastón Higuera Guajardo

Co-directora:

Dra. Pamela Córdova Vargas

Patrocinante:

Dra. Inmaculada Vaca Cerezo

Agosto, 2021
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Victoria Paz Rojas Martínez**

“Estudio de *Pseudomonas* ambientales aisladas desde tomates, su resistencia a agroquímicos, y el efecto de la resistencia a bacteriófagos en la motilidad.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título: Dr. Gastón Higuera Guajardo

Comisión Revisora y Evaluadora:

Presidente Comisión:

Evaluador:

Santiago de Chile, 17 de Mayo de 2021

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Victoria Paz, nací el 21 de julio de 1996 en Santiago de Chile. Inicié mis estudios de enseñanza básica en el Colegio Mater Dei. Luego, en 5to básico ingresé al Colegio Internacional Alba, allí conocí a grandes personas, algunas son maestras y maestros que guardo en el corazón, y otras se convirtieron en amigas y amigos que conservo hasta hoy. Fue en ese lugar en el cual descubrí mi amor por la biología, y una profesora en particular alentó ese interés. Hasta el día de la postulación no tuve clara la carrera que quería estudiar, solo sabía que me encantaba la investigación. Tuve miedos y dudas, pero me decidí a seguir mis sueños y entré a estudiar Ing. En Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. Supe que había tomado la decisión correcta cuando el primer semestre realicé una pasantía de investigación en un laboratorio, donde aprendí y disfruté mucho. Mi paso por la universidad ha sido una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida, no sólo en lo académico, sino que también en lo social. Tener ideas, hacer proyectos y llevarlos a cabo junto a otras personas me ha hecho crecer. Estoy expectante por el futuro, llena de ganas de seguir en el camino de la ciencia, quiero crear, innovar y ser feliz.

A Leonor, Álvaro y Mamá

A mi abuela y abuelo, María Teresa y Santiago

A Rocío y Lucía

Les atesoro especialmente en mi corazón

AGRADECIMIENTOS

En este punto de mi vida estoy profundamente agradecida de todas las personas que hicieron el camino más ameno, me alentaron a perseguir mis sueños y a creer en mí. En especial a mi familia que siempre ha sido un pilar fundamental, y a quienes dedico esta tesis, les amo mucho.

Agradezco al Dr. Gastón por su guía, apoyo y preocupación en mi desarrollo como científica. Gracias por su entusiasmo y humanidad, por las herramientas y oportunidades que me brindó en toda esta etapa final de mi pregrado. A la Dra. Pamela por toda su enseñanza, paciencia y buena disposición, y a los miembros del laboratorio de Biotecnología del INTA por su acogida. A la Dra. Inmaculada por su instrucción y consejo durante mi estadía en su laboratorio y la escritura de esta tesis. Al Dr. Juan Fernández por su recibimiento, impulso y lecciones en el inicio de mi carrera. A la profesora Karen por alimentar mi interés y entusiasmo por la biología, por brindarme apoyo y confianza.

Quiero agradecer especialmente a Juampa, por ser un invaluable amigo y compañero de laboratorio durante toda la carrera, sin duda todo habría sido más difícil sin ti. Y a Fran por ser una tremenda amiga y compañera de lucha, gracias por todo el aliento, soporte e ideas que compartimos. Ustedes saben cuánto los quiero.

A los mejores, mis amigas y amigos, con quienes compartí penas y alegrías, miles de risas y noches en vela, gracias por todo Recca (toda la vida <3), Javi, por tu entusiasmo y cariño. Arli y Bife, por animarme siempre. Sofi, Jhuniór, Carlos, Coté y Nacho. ¡Los adoro! Me voy llena de grandes recuerdos, ojalá nuestros caminos sigan coincidiendo.

Finalmente, gracias Bry por todo tu apoyo, compañía, cariño y comprensión durante esta etapa que compartimos, te quiero muchísimo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Industria del tomate y enfermedades bacterianas como limitante de crecimiento.	1
1.2 Características de <i>Pseudomonas</i>: Especies asociadas al tomate.	3
1.3 Estrategias de control de enfermedades bacterianas y resistencia a agroquímicos.	5
1.4 Resurgimiento de una estrategia para el control de bacterias resistentes: Bacteriófagos	7
1.5 Propiedades y clasificación bacteriófagos.	11
1.6 Adquisición de resistencia a bacteriófagos y cambio en el <i>Fitness</i> bacteriano	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos específicos.	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Aislamiento y confirmación molecular de <i>Pseudomonas</i>	20
3.1.1 Aislamiento, condiciones de cultivo y almacenamiento de cepas bacterianas de <i>Pseudomonas</i> spp.	20
3.1.2 Secuenciación y análisis del gen 16S ARNr	21
3.1.3 Secuenciación de genes <i>housekeeping</i> y análisis de secuencia multilocus	22
3.2 Determinación de tolerancia a cobre y antibiótico	24
3.2.1 Determinación de tolerancia a cobre.....	24
3.2.2 Determinación de resistencia a estreptomicina	25
3.3 Bacteriófagos	26
3.4 Caracterización de bacteriófagos	27
3.4.1 Determinación de rango de hospedero	27
3.4.2 Determinación del tipo de ácidos nucleicos por tratamiento enzimático	27
3.4.2.1 Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	27
3.4.2.2 Digestión enzimática	29
3.4.3 Caracterización morfológica por microscopía electrónica de transmisión.....	29
3.5 Obtención de cepas de <i>Pseudomonas</i> resistentes a bacteriófagos.	30
3.6 Estudio motilidad de <i>Pseudomonas syringae</i> parentales y resistentes a fagos	31
3.7 Determinación tolerancia a cobre de cepas resistentes a fagos	32
4. RESULTADOS	33

4.1 Aislamiento y confirmación molecular de <i>Pseudomonas</i> spp. ambientales aisladas de tomate	33
4.1.1 Características morfológicas.....	33
4.1.2 Secuenciación y análisis del gen 16S ARNr	34
4.2 Diversidad de <i>Pseudomonas</i> spp. mediante análisis multilocus.....	34
4.2.1 Análisis del gen <i>cts</i> como predictor de afiliación genética	37
4.3 Determinación de tolerancia a cobre y estreptomicina	40
4.4 Caracterización y clasificación de bacteriófagos	42
4.4.1 Rango de hospedero	43
4.4.2 Determinación ácidos nucleicos.....	45
4.4.3 Caracterización morfológica por microscopía electrónica de transmisión.....	45
4.5 Obtención de variantes de <i>Pseudomonas</i> spp. resistentes a bacteriófagos	46
4.6 Estudio motilidad de <i>Pseudomonas</i> spp. parentales y variantes resistentes a fagos	49
4.7 Estudio tolerancia a cobre de <i>Pseudomonas</i> spp. parentales y variantes resistentes a fagos	53
5. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES	56
5.1 Caracterización de bacterias.....	56
5.2 Caracterización de bacteriófagos	60
5.3 <i>Pseudomonas</i> resistentes a fagos.....	61
6. CONCLUSIONES	68
7. BIBLIOGRAFÍA.....	69
8. ANEXOS	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación de las ventajas y desventajas del uso de bacteriófagos y agroquímicos.	9
Tabla 2: Clasificación de bacteriófagos.	11
Tabla 3: Aislados bacterianos de <i>Pseudomonas</i> seleccionadas y su origen de aislamiento.	21
Tabla 4: Partidores utilizados para amplificación de genes <i>housekeeping</i> utilizados en el análisis de secuencia multilocus de las cepas bacterianas aisladas	23
Tabla 5: Cepas de referencia.	24
Tabla 6: Bacteriófagos aislados de muestras ambientales.	26
Tabla 7: Porcentaje de similitud del gen <i>cts</i> con cepas de referencias	38
Tabla 8: Tolerancia a cobre y estreptomycin.	41
Tabla 9: Rango de hospedero de bacteriófagos.	44
Tabla 10: Porcentaje de resistencia de las bacterias tratadas con bacteriófagos.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Superficie cultivada de tomate en Chile en el año 2019.....	1
Figura 2: Sintomatología de enfermedades bacterianas en plantas de tomate..	4
Figura 3: Ejemplos de estructuras bacterianas que son receptores de fagos.....	17
Figura 4: Aislamiento de <i>Pseudomonas</i> spp. desde plantas de tomates.....	33
Figura 5: Cladograma de las cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas derivadas del análisis de secuencia multilocus (<i>MLSA</i>).	35
Figura 6: Cladograma del gen <i>cts</i> de las cepas de <i>Pseudomonas</i>	39
Figura 7: Gráfico de proporción de <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de acuerdo a su tolerancia a cobre y estreptomycin.....	42
Figura 8: Determinación de ácidos nucleicos por digestión enzimática.	45
Figura 9: Microfotografía de bacteriófagos en TEM.....	46
Figura 10: Obtención de cepas resistentes a fagos derivadas de la cepa parental T1.9.	47
Figura 11: Confirmación de la resistencia a fagos adquirida por las cepas bacterianas tratadas.....	48
Figura 12: Estudio de motilidad <i>swimming</i> de las cepas bacterianas.	50
Figura 13: Gráfico de la extensión promedio de la colonia alcanzada en <i>swimming</i> para cada tratamiento.....	51
Figura 14: Estudio de motilidad <i>swarming</i> de las cepas bacterianas.....	52
Figura 15: Gráfico de la extensión promedio de la colonia alcanzada en <i>swarming</i> para cada tratamiento.....	53
Figura 16: Tolerancia a cobre de cepas parentales y resistentes a fagos.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
DO₆₀₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm
LB	Luria-Bertani
MLSA	Análisis de secuencia multilocus (<u>M</u> ulti <u>l</u> ocus <u>S</u> equence <u>A</u> nalysis)
MOI	Multiplicidad de infección (<u>M</u> ultiplicity <u>O</u> f <u>I</u> nfection)
NB	Caldo nutritivo (<u>N</u> utrient <u>B</u> roth)
PBS	Tampón fosfato salino (<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<u>T</u> ransmission <u>E</u> lectron <u>M</u> icroscopy)
UV	Ultravioleta
UFC	Unidad formadora de colonia
UFP	Unidad formadora de placa
WT	Silvestre (<u>W</u> ild <u>T</u> ype)

RESUMEN

Chile se distingue por ser un importante productor de frutas y verduras a nivel mundial. Entre ellas, el tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más consumidas. Sin embargo, los cultivos suelen ser susceptibles a enfermedades bacterianas, cuyos brotes no controlados significan grandes pérdidas económicas. Se ha descrito la presencia de distintas especies de *Pseudomonas* en el suelo o de forma epífita en tejido vegetal y, aunque son consideradas inocuas, en ciertos casos han mostrado capacidad de infectar plantas de tomate de manera oportunista.

Actualmente, dichas enfermedades son controladas por manejos culturales y aplicaciones preventivas de agroquímicos cúpricos y/o antibióticos. El uso desmedido de estos productos ha favorecido la selección de cepas bacterianas resistentes, disminuyendo la efectividad de estas medidas de control. Más aún, en el campo se han reportado cepas de *Pseudomonas* resistentes a cobre y estreptomina, lo cual agrava el problema, porque indica que cepas ambientales también podrían actuar como reservorios de resistencia. Por ello, se hace necesario buscar nuevas estrategias para su control, siendo los bacteriófagos una potencial herramienta biocontroladora. Sin embargo, la adquisición de este tipo de defensa podría tener un costo en el “fitness” celular para algunos casos.

En este trabajo, se caracterizaron *Pseudomonas* ambientales mediante *MLSA*, las cuales resultaron ser cercanas filogenéticamente puesto que sus similitudes genéticas de distancias fluctúan entre 0,01 y 0,08. Además, no se observó una correlación entre su agrupación genética y el origen de aislamiento. Cabe destacar que el análisis individual del gen *cts* resultó en los mismos filogrupos. Por otra parte, un 79% de las

cepas resultaron resistentes a cobre y estreptomicina.

Dos cepas de *Pseudomonas* susceptibles a fagos generaron variantes resistentes a estos, las cuales se caracterizaron por cambios en su motilidad y tolerancia a cobre.

En todas las variantes resistentes a fagos derivadas de la cepa parental denominada T1.9, disminuyó a la mitad el diámetro de colonia promedio alcanzado para el nado en *swarming*. Para el caso de *swimming* aumentó entre un 14% y 19%. Todas las variantes resistentes derivadas de la cepa AI_1 no presentaron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los dos tipos de nado.

En cuanto a la tolerancia a cobre, todas las cepas resistentes a fagos derivadas de T1.9, alcanzaron promedios de DO_{600} mayores en un 56%, 43,6% y 49,5% que la cepa parental, para una concentración de 3,5 mM de $CuSO_4$ a las 48h. Mientras que para la cepa AI_1 solo hubo diferencias significativas para las variantes resistentes al Fago18, las cuales alcanzaron una DO_{600} 33,5% mayor.

Finalmente, este es el primer estudio que reporta cambios en la motilidad y tolerancia a cobre de *Pseudomonas* ambientales resistentes a cobre y estreptomicina, cuando adquieren resistencia a fagos. Estos cambios dependen tanto de la tendencia de las bacterias a adquirir dicha resistencia como de los mecanismos que utiliza para ello. En este análisis, la cepa T1.9 tendió a adquirir resistencia a tres fagos y presentó cambios significativos de motilidad y tolerancia a cobre. Entonces, utilizar fagos como herramienta de biocontrol de bacterias patógenas podría generar cepas menos o más virulentas.

ABSTRACT

Chile is distinguished by being an important producer of fruits and vegetables worldwide. Among them, the tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most consumed vegetables. However, crops are often susceptible to bacterial diseases, the uncontrolled outbreaks of which mean great economic losses. The presence of *Pseudomonas* species in the soil or epiphytes in plant tissue has been described, considered innocuous but in certain cases they have shown the ability to opportunistically infect tomato plants.

Currently, bacterial diseases are controlled by cultural management and preventive applications of copper agrochemicals and / or antibiotics. The excessive use of these has favored the selection of resistant bacterial strains, leading to a decrease in the effectiveness of these control measures. Furthermore, strains of *Pseudomonas* resistant to copper and streptomycin have been reported in the field. Which aggravates the problem, because it indicates that environmental strains could also act as reservoirs of resistance. For this reason, it is necessary to search for new strategies for their control, with bacteriophages being a potential biocontroller tool. However, the acquisition of this type of defense could have a cost in the cellular "fitness" for some cases.

In this work, environmental *Pseudomonas* were characterized by MLSA, which turned out to be phylogenetically close since their genetic similarities of distances fluctuate between 0,01 and 0,08. Furthermore, no correlation is found between their genetic grouping and the origin of isolation. It should be noted that individual analysis of the *cts* gene resulted in the same phylogroups. On the other hand, 79% of the strains were resistant to streptomycin and copper.

Two phage-susceptible strains of *Pseudomonas* generated phage-resistant variants, which were characterized by changes in their motility and tolerance to copper.

In all phage resistant variants derived from the parental strain designated T1.9, the average colony diameter achieved for swarming was halved. In the case of swimming, it increased between 14% and 19%. All the resistant variants derived from the AI_1 strain did not show statistically significant changes in either of the two types of swimming.

Regarding tolerance to copper, all the phage resistant strains derived from T1.9, reached averages of OD₆₀₀ higher by 56%, 43.6% and 49.5% than the parental strain, for a concentration of 3,5 mM CuSO₄ at 48h. While for the AI_1 strain there were only significant differences for the variants resistant to Fago18, which reached an OD₆₀₀ 33.5% higher.

Finally, this is the first study that reports changes in the motility and copper tolerance of environmental *Pseudomonas* resistant to copper and streptomycin, when they acquire resistance to phages. These changes depend both on the tendency of the bacteria to acquire this resistance and on the mechanisms they use to do so. In this analysis, the T1.9 strain tended to acquire resistance to three phages and showed significant changes in motility and tolerance to copper. Thus, using phages as a biocontrol tool for pathogenic bacteria could generate less or more virulent strains.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Industria del tomate y enfermedades bacterianas como limitante de crecimiento

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es la hortaliza más cultivada a nivel mundial, alcanzando cinco millones de hectáreas y una producción superior a 180 millones de toneladas en el año 2018, avaluadas en USD 118.000 millones (FAOSTAT, 2018). En Chile, el cultivo de tomate es el tercero con más superficie sembrada, superando las 15.000 hectáreas y 951.000 toneladas producidas al año (FAOSTAT, 2018). Las dos principales regiones productoras son O'Higgins y Maule con un 39,5% y 33% respectivamente, el resto de las regiones representan el 27,5% de la superficie nacional, como se observa en la figura 1 (ODEPA, 2019).

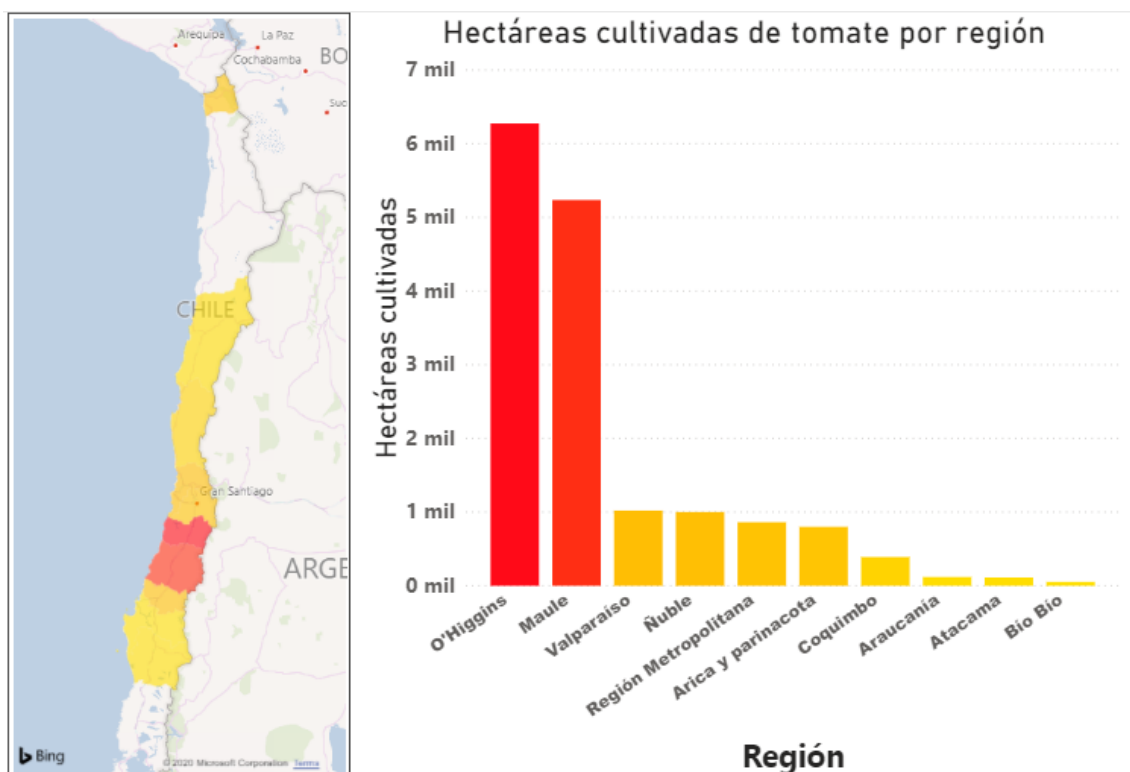


Figura 1: Superficie cultivada de tomate en Chile en el año 2019. Distribución geográfica de la cantidad de superficie cultivada por región.

La industria nacional del tomate ha crecido aproximadamente un 25% en la última década (FAOSTAT, 2018), sin embargo, diversos factores limitan este crecimiento como son las enfermedades de origen viral, fúngica o bacteriana, siendo estas últimas responsables de cuantiosas pérdidas productivas anualmente (Basim y col., 2004).

Las principales enfermedades del tomate en Chile provocadas por bacterias son Cancro Bacteriano, Mancha Bacteriana, Cancro Medular y Peca Bacteriana, siendo, los agentes etiológicos de estas enfermedades *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, respectivamente (Estay y Bruna, 2002). Esta última corresponde a uno de los patógenos más devastadores y estudiados, debido a que un brote puede generar pérdidas de hasta un 25% de las plántulas, en condiciones óptimas de desarrollo de la bacteria (Basim y col., 2004). Todas estas enfermedades tienen un efecto negativo sobre el crecimiento, la calidad de las plantas y los frutos, haciendo a estos últimos inaceptables para su comercialización, lo que aumenta las mermas económicas.

En la actualidad, *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*) se encuentra ampliamente distribuida en zonas de cultivo, desde la región de Valparaíso hasta el Bío Bío (Córdova y col., 2018). Sin embargo, existen otras especies del género *Pseudomonas* presentes en el suelo o de forma epífita que son patógenas, como *Pseudomonas viridiflava* que produce el llamado tizón bacteriano de la hoja del tomate (CABI, 2020). Otras son consideradas inocuas pero tendrían la capacidad de enfermar a plantas de tomates, como se ha reportado para cepas de *Pseudomonas fluorescens* (Dimartino y col., 2011; Molan y Ibrahim, 2007; Pekhtereva y col., 2009).

1.2 Características de *Pseudomonas*: Especies asociadas a tomate

Actualmente existen 247 especies válidamente descritas del género *Pseudomonas* (Parte, 2018). Muchas de estas especies tienen una amplia distribución y presencia tanto en el suelo como en la superficie de las plantas (epífita). Estudios metagenómicos sobre el microbioma asociado a tomate indican que los géneros más frecuentes en hojas, flores, tallos y raíces corresponden a *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Ottesen y col., 2013). No todas las especies de *Pseudomonas* son patógenas, algunas actúan como comensales sin ningún efecto conocido sobre su planta hospedera. No obstante, otras establecen una relación mutualista, en ella el hospedero suministra nutrientes y refugio y, a su vez, las bacterias pueden promover el crecimiento de la planta y ofrecer resistencia contra insectos, metales y patógenos. Por ejemplo, esto se ha reportado a las especies *P. fluorescens*, *P. mohnii* y *P. plecoglossicida* (Dong y col., 2019; Tian y col., 2017).

Las bacterias del género *Pseudomonas* se caracterizan por poseer forma de bacilo con uno o más flagelos polares y son Gram-negativas (Arnold y Preston, 2019). La mayoría de las especies presentan colonias con una apariencia amarilla-verdosa fluorescente característica, cuando son cultivadas *in vitro* en medio B de King, producto de la secreción del sideróforo fluorescente denominado pioverdina, como son *P. syringae* y *P. viridiflava* (Cody y Gross, 1987). También se ha descrito que *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* pueden producir otros sideróforos, tales como piocianina y tioquinolobactina, respectivamente (Lau y col., 2004; Matthijs y col., 2007). Otra característica que ha sido ampliamente estudiada es la producción de proteínas activas de nucleación de hielo (INA), como es el caso de *P. syringae* pv. *syringae*, que hacen que el agua se congele a temperaturas más altas de lo normal (-4 a -2 °C), provocando lesiones en el tejido vegetal

(Maki y col., 1974).

Para el caso del tomate, la sintomatología de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *P. viridiflava* suele producir halos cloróticos en hojas junto con manchas necróticas en frutos (Figura 2A) (CABI, 2020), mientras que *P. corrugata* produce necrosis medular (Figura 2B) (Argerich y col., 2013).

En el caso de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) la infección se produce cuando la bacteria entra en las hojas de las plantas a través de los estomas, o por alguna herida en el tejido vegetal y se multiplica en el espacio intercelular (apoplasto), para finalmente producir lesiones necróticas que están a menudo rodeadas de halos cloróticos (figura 2A) (Buell y col, 2003). Un elemento clave en su patogenicidad es el sistema de secreción tipo III, que inyecta proteínas efectoras de virulencia en las células vegetales huésped, generando la interrupción de la vía de señalización del jasmonato, el cual es parte de un mecanismo de defensa de la planta (Zhao y col., 2003).



Figura 2: Sintomatología de enfermedades bacterianas en plantas de tomate. A. Lesiones cloróticas en hojas y frutos producidas por *P. syringae* pv. *tomato* (FAO, 2013). B. Necrosis medular producida por *P. corrugata* (Argerich y col., 2013).

En general para las enfermedades bacterianas, la infección y proliferación se ve favorecida por las condiciones ambientales de temperaturas entre los 17°C y 30°C, una alta humedad relativa y por la condensación de agua sobre la superficie de las hojas

durante la noche. Su reservorio está principalmente en el suelo, material vegetal infectado y en ocasiones semillas (Estay y Bruna, 2002).

1.3 Estrategias de control de enfermedades bacterianas y resistencia a agroquímicos

En agricultura las enfermedades bacterianas son controladas mayoritariamente por programas fitosanitarios, que incluyen manejos culturales y/o aplicaciones con agroquímicos a base de cobre o antibióticos (principalmente estreptomina).

La prevalencia y distribución de estas enfermedades son indicadores de que las medidas para su control han perdido eficacia. Una explicación a este hecho sería la selección progresiva de cepas resistentes a dichos productos, lo cual genera efectos secundarios negativos como el aumento en las dosis necesarias para controlar la enfermedad, contaminación con cobre, fitotoxicidad, y favoreciendo a su vez la selección de cepas cada vez más resistentes, (Lamichhane y col., 2018). Esta situación se agrava considerando las evidencias que sugieren la transferencia de genes de resistencia a cobre y antibióticos entre especies bacterianas ambientales, tanto patógenas como no patógenas, sumado a la selección de cepas multirresistentes (Bender y Cooksey, 1987; Lamichhane y col., 2018; Walsh, 2000).

Diversos estudios han demostrado la creciente aparición de resistencia a cobre en bacterias ambientales, en el género *Pseudomonas* se han reportado cepas que crecen a concentraciones de hasta 293,4 µg/mL de Cu⁺² (4,5 mM de CuSO₄) (Goto y col., 1994; Griffin y col., 2017). Esta alta tolerancia se explicaría puesto que la dosis estándar utilizada en el campo para controlar a *Pseudomonas* spp. corresponde a 521,6 µg/mL de Cu⁺² para sulfato de cobre (8 mM de CuSO₄)(SAG, 2020).

Dentro de los antibióticos, principalmente estreptomicina en el área agrícola, un estudio describió cepas de *P. syringae* capaces de proliferar a concentraciones de 75 µg/mL del antibiótico en condiciones de laboratorio (Sundin y Bender, 1993). En el campo se utiliza una concentración de 59 µg/mL de antibiótico (SAG, 2020), la cual es considerablemente alta y aparentemente no sería efectiva para el control bacteriano.

Más aún, se han detectado cepas de *P. syringae* resistentes para estos agroquímicos (Fatmi y col., 2008). Un ejemplo de esto es el caso de los viveros del pacífico noroeste de E.E.U.U donde la enfermedad era controlada con cobre y estreptomicina. Tomaron muestras de *P. syringae* desde plantas infectadas en los años 1982 y 1983, y luego volvieron a tomarse muestras en los años 1992 y 1993. En el primer muestreo no se encontraron cepas resistentes a ambos agroquímicos, sin embargo, una década después el 24% de las cepas aisladas eran resistentes a ambos biocidas y presentaban los genes característicos de resistencia a estos (Scheck y col., 1996).

Para el caso de Chile, en un estudio en suelos agrícolas de la región de Valparaíso, se encontraron bacterias de diversos géneros altamente resistentes a cobre con CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de entre 3,1 y 4,7 mM (202,1 y 306,4 µg/mL de Cu⁺²). Además se identificó la presencia del gen *copA* en plásmidos de cuatro aislados más resistentes, lo que sugiere que este determinante genético estaría implicado en la propagación en entornos contaminados por este metal (Altimira y col., 2012).

Dado que en las plantas pueden estar presentes cepas bacterianas de varias especies, y que la transferencia de genes de resistencia entre bacterias ocurre naturalmente (Bender y Cooksey, 1986; Voloudakis y col., 1993; Walsh, 2000), es posible que existan cepas de *Pseudomonas* spp. resistentes a agroquímicos en Chile, lo cual representa un

problema puesto que los fitopatógenos y no patógenos presentes en el ambiente serían capaces de eludir estos métodos de control, y además, convertirse en reservorios de resistencia para especies fitopatógenas e inclusive, patógenos humanos (Jensen y col., 2001). Por ejemplo, se reportó que *Pseudomonas aeruginosa* ha adquirido factores de virulencia desde sus nichos ambientales (Morris y col., 2007).

Por esta razón, es necesario aumentar la cantidad de estudios en Chile y el mundo que describan la biología de estas cepas ambientales resistentes a agroquímicos asociadas a plantaciones, y a su vez desarrollar nuevas estrategias para su control.

1.4 Resurgimiento de una estrategia para el control de bacterias resistentes: Bacteriófagos.

En 1915, el inglés Frederick Twort informó por primera vez el descubrimiento de bacteriófagos. Más tarde en 1917 el franco-canadiense Felix d'Hérelle también lo reportó puesto que los bacteriófagos aparecían en las heces de los pacientes con disentería de *Shigella*, poco antes de que comenzaran a recuperarse. Aprendió que los bacteriófagos se encuentran dondequiera que las bacterias prosperen. Fue entonces que la terapia con fagos fue reconocida como una alternativa para la erradicación de las infecciones bacterianas patógenas.

Paralelamente, George Eliava estaba haciendo descubrimientos similares y en 1923 fundó el Instituto Eliava en Tbilisi, Georgia, dedicado al desarrollo de la terapia con fagos. Actualmente, la fagoterapia en humanos se utiliza en Rusia, Georgia y Polonia (Shasha y col., 2004). Se encuentra poco masificada puesto que a principios del siglo XX la investigación sobre el desarrollo de antibióticos escaló y se comercializó rápidamente (Hanlon, 2007).

La fagoterapia también se ha desarrollado en otras áreas como la industria de los alimentos y la agricultura. Los bacteriófagos se encontraron por primera vez en asociación con bacterias patógenas de plantas en 1924, cuando Mallman y Hemstreet demostraron que el filtrado de la col descompuesta inhibía el crecimiento del "organismo de pudrición de repollo", *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Poco después, los fagos se utilizaron con éxito para prevenir la pudrición del tubérculo de papa causada por *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*, así como tratamiento de semillas para reducir incidencia de la marchitez del maíz de Stewart, producida por *Pantoea stewartii* (Thomas, 1935). A pesar de los resultados iniciales prometedores, la terapia con fagos no prosperó puesto que el control químico y los antibióticos se impusieron como métodos comerciales estandarizados, confiables y viables en el campo para combatir las enfermedades bacterianas (Balogh y col., 2010).

No obstante, en la actualidad, dichos métodos convencionales están siendo ineficaces y contraproducentes para la prevención y control de enfermedades bacterianas en plantas, puesto que las bacterias ambientales han adquirido mecanismos de resistencia (Labrie y col., 2010). Más aún, se han reportado bacterias multirresistentes de estos agroquímicos (Fatmi y col., 2008; Scheck y col., 1996). Es por esta razón que la fagoterapia aparece como una alternativa promisoría, dado que son capaces de infectar y lisar (matar) a estas bacterias resistentes (Sulakvelidze y col., 2001).

En la tabla 1 se presenta una comparación entre las ventajas y desventajas del uso de bacteriófagos y agroquímicos con fines profilácticos o de control para bacterias fitopatógenas.

Tabla 1: Comparación de las ventajas y desventajas del uso de bacteriófagos y agroquímicos.

	Ventajas	Desventajas	Comentario
Bacteriófagos	Son altamente específicos, por lo que sólo eliminan a cepas de una especie bacteriana determinada. Son inocuos para plantas, animales y seres humanos. (Sulakvelidze y col., 2001)	La especificidad también puede significar una desventaja, puesto que un bacteriófago lisará solo a determinadas cepas bacterianas. Se debe identificar siempre el agente causante de la enfermedad. (Sulakvelidze y col., 2001)	Se utilizan mezclas de fagos (cócteles) para mejorar las probabilidades de éxito en el control de varias cepas bacterianas. (Sulakvelidze y co., 2001)
	Pueden ser utilizados en terapias combinadas con antibióticos. (Keen, 2012)	Pueden conducir la transferencia horizontal de genes (factores de virulencia, resistencia o toxinas) entre bacterias. (Doss y col., 2017)	Es preferible utilizar fagos que no transduzcan el ADN del huésped. También podría realizarse un análisis genético de los fagos antes de realizar la fagoterapia. Por último, podrían añadirse genes letales a los fagos mediante bioingeniería. (Doss y col., 2017)
	La resistencia a fagos se desarrolla aproximadamente diez veces más lentamente que la resistencia a los antibióticos. (Parasion y col., 2014)	Las bacterias patógenas intracelulares son inaccesibles para los fagos. (Doss y col., 2017)	Los fagos podrían ser aplicados junto con bacterias hospedadoras transportadoras. (Jones y col., 2008)
	La aplicación en el campo puede efectuarse con los equipos estándar utilizados para el cuidado del cultivo. Dado que los fagos no son inhibidos por la mayoría de los agroquímicos, pueden ser mezclados con estos sin pérdida significativa en el título. (Jones y col., 2008)	Su efectividad de acción se ve alterada por la luz UV-A, UV-B y la temperatura. (Jones y col., 2008)	La fórmula de fagos puede contener moléculas que los protejan de la luz UV y la temperatura. Por otra parte, podrían ser aplicados en horarios determinados donde estos factores no impacten en su efectividad, por ejemplo, en la noche. (Jones y col., 2008)

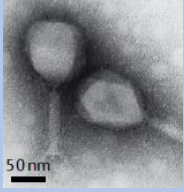
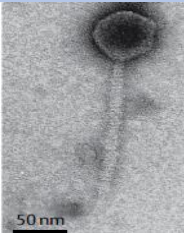
	Ventajas	Desventajas	Comentario
Agroquímicos	Estandarizados, confiables y viables en el campo para combatir las enfermedades bacterianas. (Balogh y col., 2010)	Sólo 6 formulaciones bactericidas contra enfermedades bacterianas en el tomate autorizadas por el Servicio Agrícola y Ganadero. (SAG, 2020)	Su uso es controversial. En muchas partes del mundo, ya no se recomienda el uso de sulfatos de cobre dado que es altamente soluble y tóxico para las personas y el medio ambiente. Además, no son ocupados en la agricultura ecológica y algunos autores predicen que su uso puede ser prohibido en un futuro cercano. (Lamichhane y col., 2018)
		Su uso sostenido ha provocado la selección de cepas bacterianas resistentes. (Jones y col., 2008)	Se deben buscar alternativas a los agroquímicos. Los agentes biológicos de control son los más prometedores. (Lamichhane y col., 2018)
		Su uso extensivo tiene repercusiones ambientales y ecológicas negativas, ya sea por contaminación, bioacumulación, desbalance del pH del suelo, toxicidad para la biota del suelo, entre otras. (Knowles, 2008; Lamichhane y col., 2018)	Se deben buscar y utilizar estrategias de biorremediación. (Lamichhane y col., 2018)
		La absorción de iones de cobre por las plantas puede producir fitotoxicidad, provocando daño y estrés. (Lamichhane y col., 2018)	Se debe optimizar el uso de agroquímicos cúpricos mediante mejores prácticas de manejo. (Lamichhane y col., 2018)
		Los residuos de cobre pueden tener efectos en los parámetros de calidad de los productos agrícolas, que incluyen la apariencia y/o sabor. (Lamichhane y col., 2018)	

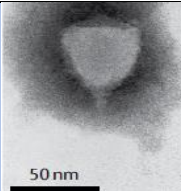
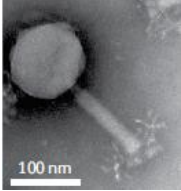

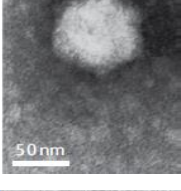
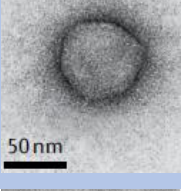
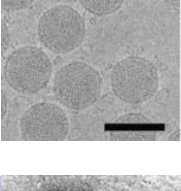
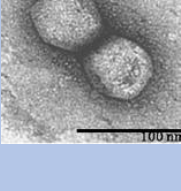
1.5 Propiedades y clasificación de bacteriófagos

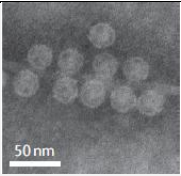
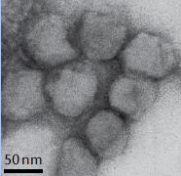
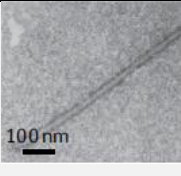
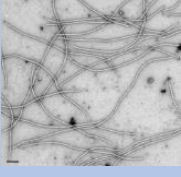

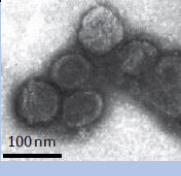
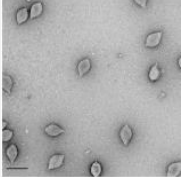
Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan exclusivamente bacterias o arqueas. Estos utilizan la maquinaria celular bacteriana para replicarse y en su propagación pueden eliminar a su hospedero (Kutter y Sulakvelidze, 2004). Son las entidades más abundantes y diversas del planeta. Se estima que existen más de 10^{31} bacteriófagos en la biósfera, y se encuentran básicamente en cualquier lugar que una bacteria habita (Davies y col., 2016).

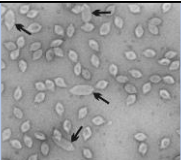

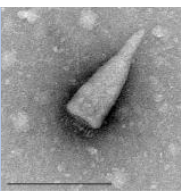
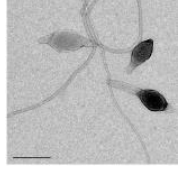
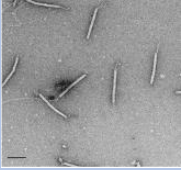
Los fagos están compuestos por una cápside proteica que encapsula el material genético, este puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ribonucleico (ARN), bi o monocatenario. Algunos pueden estar rodeados por una membrana lipídica. Además, pueden poseer otras estructuras tales como cola y espículas. Según estas características los bacteriófagos pueden ser clasificados en diferentes familias o morfotipos que se describen en la tabla 2 (Ackermann, 2009).

Tabla 2: Clasificación de bacteriófagos. (Ackermann, 2009; Dion y col., 2020)

Forma	Ácido nucleico	Familia	Fago tipo	Fotografía por TEM	Referencia
Cola	ADN ds, lineal	<i>Myoviridae</i> <i>Herelleviridae</i>	T4		Dion y col., 2020
	ADN ds, lineal	<i>Siphoviridae</i>	λ		Dion y col., 2020

Forma	Ácido nucleico	Familia	Fago tipo	Fotografía por TEM	Referencia
Cola	ADN ds, lineal	<i>Podoviridae</i>	T7		Dion y col., 2020
	ADN ds, lineal	<i>Ackermannviridae</i>	AG3		Dion y col., 2020
Poliédrico	ADN ss, circular	<i>Microviridae</i>	φX174		Dion y col., 2020
	ADN ds, circular	<i>Corticoviridae</i>	PM2		Dion y col., 2020
	ADN ds, linear	<i>Tectiviridae</i>	PRD1		Dion y col., 2020
	ADN ds, linear	SH1*	SH1		Jääliñoja, y col. 2015
	ADN ds, circular	STIV*	STIV		Wirth y col., 2011

Forma	Ácido nucleico	Familia	Fago tipo	Fotografía por TEM	Referencia
Poliédrico	ARN ss, linear	<i>Leviviridae</i>	MS2		Dion y col., 2020
	ARN ds, linear	<i>Cystoviridae</i>	Φ6		Dion y col., 2020
Filamentosos	ADN ss, circular	<i>Inoviridae</i>	M13		Prangishvili y col., 1999
	ADN ds, linear	<i>Lipothrixviridae</i>	TTV1		Baquero y col., 2020
	ADN ds, linear	<i>Rudiviridae</i>	SIRV-1		Dion y col., 2020
Pleomórficos	ADN ds, circular	<i>Plasmaviridae</i>	L2		Dion y col., 2020
	ADN ds, circular	<i>Fuselloviridae</i>	SSV1		Baquero y col., 2020

Forma	Ácido nucleico	Familia	Fago tipo	Fotografía por TEM	Referencia
Pleomórficos	ADN ds, linear	-	His1		Pietilä y col., 2013
	ADN ds, circular	<i>Guttaviridae</i>	SNDV		Baquero y col., 2020
	ADN ds, linear	<i>Ampullaviridae</i>	ABV		Baquero y col., 2020
	ADN ds, circular	<i>Bicaudaviridae</i>	ATV		Baquero y col., 2020
	ADN ds, linear	<i>Globuloviridae</i>	PSV		Baquero y col., 2020

*Sin clasificar. ds: double strand. ss: single strand.

Los bacteriófagos son parásitos obligados y se replican utilizando la maquinaria celular de su hospedero, estos poseen básicamente dos mecanismos: una vía lítica donde los fagos, denominados virulentos o líticos, atacan a las células hospederas inyectando su ácido nucleico, haciendo que el huésped produzca la futura progenie de virus y conduciendo a la eclosión de éste. Por otra parte, la vía lisogénica, en la cual se denominan temperados, consiste en la inserción de su genoma en el cromosoma del hospedero replicándose junto a éste, a esta secuencia del fago se le conoce como profago. Los fagos temperados entonces poseen ambos ciclos, el estado lisogénico se

mantiene hasta que ocurre algún evento en que el profago se escinde del genoma bacteriano, produciendo un cambio al ciclo lítico (Mc Grath y van Sinderen, 2007).

Dado que los bacteriófagos virulentos lisan bacterias y por ende provocan su muerte, son utilizados como controladores naturales (biocontrol) contra bacterias patógenas de interés, y por ello son de alto interés biotecnológico. El uso de bacteriófagos basado en dicho principio se denomina “fagoterapia”.

1.6 Adquisición de resistencia a bacteriófagos y cambio en el *fitness* bacteriano

Los bacteriófagos son agentes importantes en la evolución bacteriana, y continuamente están en una coevolución con su hospedero. Las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia a fagos clasificados por Labrie y col, (2010) en cuatro ejes principales:

a) Prevenir la adsorción del fago: adaptando las estructuras de la superficie celular que actúan como receptores de fagos mediante cambios conformacionales o cambios genéticos (mutaciones), cambios en la abundancia de los componentes de la membrana, produciendo una matriz extracelular o sintetizando inhibidores competitivos de los receptores.

b) Prevenir la entrada del ADN del fago: denominados sistemas de exclusión de superinfección (Sie, por sus siglas en inglés), corresponden a proteínas asociadas a la membrana que bloquean la entrada del ADN del fago.

c) Cortar los ácidos nucleicos del fago: sistemas de modificación-restricción y sistema CRISPR-Cas. En el primero el ADN no metilado del fago que entra a la célula es reconocido por enzimas de restricción bacterianas que lo degradan. El segundo es un sistema inmunológico adaptativo procarionta que confiere resistencia a elementos

genéticos foráneos. En este, proteínas Cas asociadas a un segmento de ARN específico reconocen y cortan el material genético extraño, algunos de estos fragmentos son guardados en el *locus* CRISPR del genoma bacteriano. Dichos fragmentos corresponden a las secuencias espaciadoras que se transcriben al ARN guía de las proteínas Cas en infecciones víricas posteriores (Mohanraju y col., 2016).

d) Sistemas de infección abortiva: corresponden a proteínas heterólogas que abortan la infección de los fagos, ya sea en la etapa de replicación, transcripción o traducción y conducen a la muerte celular.

La pérdida, disminución de la expresión o mutaciones en los componentes de la superficie celular son los principales mecanismos que permiten la adquisición de resistencia a fagos, dado que se modifican las estructuras que actúan como receptores de estos, y que también determinan su especificidad (Bertozi Silva y col., 2016; van Houte y col., 2016). Entre estas estructuras se incluyen bombas de eflujo (Burmeister y Turner, 2020), lipopolisacáridos (LPS), proteínas transmembrana, ácidos teicoicos de la pared celular, cápsulas y otros apéndices bacterianos, como flagelos y pili (figura 3), de los cuales algunos corresponden a factores de virulencia (Oechslin, 2018).

Los bacteriófagos pueden utilizar más de una estructura bacteriana como receptor, e incluso pueden tener un orden de preferencia entre estos (Doore y col., 2019).

Algunos bacteriófagos utilizan apéndices de la motilidad bacteriana (flagelos o pili) para infectar a su hospedero. Los fagos se adhieren a los surcos helicoidales en el flagelo bacteriano y usan la rotación del flagelo para alcanzar la superficie celular (Samuel y col., 1999). De manera similar, existen fagos que pueden unirse al pili y fusionar su membrana con la de la célula bacteriana durante retracción de este (Mattick, 2002;

Romantschuk y Bamford, 1985). En otros casos, los fagos utilizan bombas de eflujo o proteínas transmembrana transportadoras de iones metálicos como receptores (Solioz, 2018). Se ha reportado que en CopCD, una proteína transmembrana que transporta iones de cobre, al mutar aumenta la tolerancia de la bacteria a dicho metal, mientras que al sobreexpresar el gen disminuye la tolerancia. Este fenómeno fue observado en *P. syringae* (Cha y Cooksey, 1993).

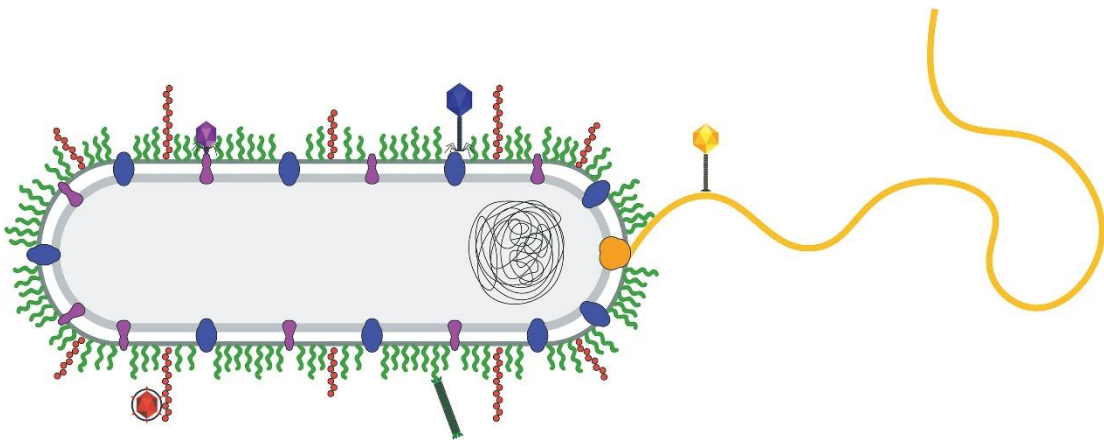


Figura 3: Ejemplos de estructuras bacterianas que son receptores de fagos. Los fagos se unen a estructuras bacterianas como pili (rojo), flagelo (amarillo), proteínas transmembrana (azul), bombas de eflujo (violeta) o LPS (verde) (Chan y col., 2016).

Por lo tanto, la pérdida o alteración de estas estructuras puede generar la resistencia bacteriana a fagos. No obstante, mutantes resistentes a fagos a menudo muestran flagelos defectuosos que no pueden rotar (Icho y Iino, 1978), células con un número reducido de flagelos y pili, o carentes de estos (van Houte y col., 2016) o que se vuelven susceptibles a antibióticos (Burmeister y Turner, 2020).

Es por esto que, la resistencia a bacteriófagos también induce costos en el *fitness* bacteriano en algunos casos. Por ejemplo, las bacterias resistentes a los bacteriófagos pueden volverse menos virulentas, en el caso de que las mutaciones tengan efecto en factores de virulencia de la superficie, como el LPS, proteínas de la membrana externa,

flagelo o pili (Oechslin, 2018).

Los bacteriófagos líticos pueden ejercer una presión selectiva y de esta forma favorecer que cepas resistentes a ellos proliferen, inclusive las que han perdido virulencia. Es por esta razón que también podrían ser útiles en una fagoterapia o una terapia combinada para controlar un patógeno (León y Bastías, 2015). Este fenómeno se ha reportado ampliamente para bacteriófagos de bacterias patógenas humanas y veterinarias, sin embargo, para bacterias fitopatógenas aún falta investigación (Koskella y col., 2011; Oechslin, 2018) .

En base a estos antecedentes, en este estudio se caracterizaron *Pseudomonas* ambientales aisladas desde cultivos de tomates nacionales, y se evaluó su resistencia a agroquímicos. En segundo lugar, se evaluó el efecto en el *fitness* bacteriano al adquirir resistencia a fagos, analizando la motilidad y tolerancia a cobre de estos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente *Pseudomonas* ambientales aisladas desde cultivos de tomates nacionales determinando su resistencia a agroquímicos, y evaluar el efecto de la resistencia a bacteriófagos en la motilidad.

2.2 Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar molecularmente *Pseudomonas* ambientales presentes en tomates.
2. Determinar la resistencia a agroquímicos (cobre y estreptomicina) de la *Pseudomonas* ambientales aisladas.
3. Caracterizar en sus propiedades fundamentales bacteriófagos de *Pseudomonas* presentes en aguas servidas.
4. Evaluar el efecto de la resistencia a bacteriófagos en la motilidad de *Pseudomonas*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento y confirmación molecular de *Pseudomonas*

3.1.1 Aislamiento, condiciones de cultivo y almacenamiento de cepas bacterianas de *Pseudomonas* spp.

Las cepas bacterianas utilizadas provienen de muestras de tejido de plantas de tomate obtenidas desde huertos chilenos (invernaderos, campos y plantineras) en el año 2018.

Para la obtención de aislados, las muestras vegetales fueron procesadas como se describe a continuación: de cada muestra se tomó un *pool* de 10 hojas (o trocitos de fruto), y se realizó un macerado, el cual se diluyó y sembró en placas de cultivo. El aislamiento se realizó en medio sólido B de King (BK) al 1,5% (16 g proteasa peptona, 1,2 g K₂HPO₄, 1,2 g MgSO₄ • 7H₂O, 8 mL glicerol, 12 g agar, 800 mL H₂O destilada, pH 7) (King y col., 1954), y en medio sólido Milk-Tween (TM-80) (10 g proteasa peptona, 0,25 g CaCl₂, 1 g tirosina, 15 g agar, 10 g leche descremada, 10 mL Tween 80, 1 L H₂O destilada) (Goszczyńska y Serfontein, 1998) a 28°C. El medio TM-80 facilita el reconocimiento visual y selección de colonias de bacterias del género *Pseudomonas*. La primera selección de los aislados bacterianos obtenidos se realizó en base a las características macroscópicas de las colonias como color, forma, brillo y mucosidad.

Para este estudio se seleccionaron 19 aislados bacterianos provenientes de las regiones Valparaíso, Maule, Ñuble y Bío Bío (regiones que concentran la mayor parte de la producción nacional de tomate), considerando al menos dos aislados representantes de cada punto de muestreo como se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3: Aislados bacterianos de *Pseudomonas* seleccionadas y su origen de aislamiento.

Nombre cepa	Lugar de origen	Región
42Ch	Chillán	Ñuble
43Ch	Chillán	Ñuble
N10_3	Hijuelas	Valparaíso
N9_9	Hijuelas	Valparaíso
FL2	Limache	Valparaíso
FL4	Limache	Valparaíso
JV9r	Limache	Valparaíso
TJ5_5	Limache	Valparaíso
A2_6	Olmué	Valparaíso
A1_1	Olmué	Valparaíso
HOmedano 27	Quillón	Bío Bío
HO6.2	Quillón	Bío Bío
40M	Teno	Maule
L1_1	Teno	Maule
T1.9	Teno	Maule
T11	Teno	Maule
VCMAgpz2	Teno	Maule
AZHeinz24	Teno	Maule
AZHeinz26	Teno	Maule

3.1.2 Secuenciación y análisis del gen 16S ARNr

La identificación del género bacteriano se realizó mediante la secuenciación del gen 16S ARNr de los aislados bacterianos obtenidos. Para ello, se tomaron colonias de cada una de las cepas, y se extrajo el ADN genómico mediante lisis directa por temperatura. Brevemente, la colonia fue resuspendida en 600 µL de agua destilada y hervida por 10 min, posteriormente se centrifugó a 10.000 g y se colectó el sobrenadante el cual contenía el ADN. Este se usó como templado para la amplificación mediante PCR del gen 16S ARNr utilizando los partidores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1942R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Las condiciones de corrida fueron las descritas por Filloux y Walker, 2014. Para determinar una correcta amplificación y tamaño de los amplicones, se realizó

electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% corrido a 200 V por 20 min., de acuerdo con el protocolo descrito en Filloux y Walker, 2014. Posteriormente los amplicones fueron secuenciados contratando un servicio externo en Macrogen Inc.

Las secuencias fueron editadas y analizadas utilizando el programa Geneious 2020.1.2 y comparadas con la base de datos Ribosomal Database Project II (RDPII), utilizando la herramienta Classifier 2.11 (RDP, 2016; Wang y col., 2007).

3.1.3 Secuenciación de genes *housekeeping* y análisis de secuencia multilocus

Para estudiar la diversidad de las cepas bacterianas aisladas, se realizó un análisis de secuencia multilocus (*MLSA* por sus siglas en inglés), para ello se amplificaron por PCR y se secuenciaron cuatro genes *housekeeping*: *rpoD*, *cts*, *acn* y *pgi*, que codifican para el factor sigma 70, y las enzimas citrato sintasa, aconitato hidratasa B y glucosa-6-fosfato isomerasa, respectivamente (Sarkar y Guttman, 2004). Para la amplificación de los genes mediante PCR se utilizó el protocolo de Sarkar y Guttman, 2004. En primer lugar, se realizó una extracción y purificación de ADN genómico utilizando el kit Promega de Wizard®, y estandarizando las concentraciones de material genético a 250 ng . El mix de amplificación se usó a concentraciones finales de la enzima GoTaq® ADN polimerasa de 0,3 u/μl, tampón de reacción GoTaq® a 1X, cada nucleótido a 200 μM y cada de partidor a 1 μM. Las condiciones de corrida fueron 2 min a 94° C para desnaturalización, 1 min a la temperatura de alineamiento correspondiente a cada pareja de partidores (según tabla 4), y 1 min a 72° C para extensión, con 30 ciclos. Para finalizar un ciclo de 10 min a 72° C, en termociclador Agilent. Los partidores utilizados corresponden a los descritos en Sarkar y Guttman, 2004 (Tabla 4).

Tabla 4: Partidores utilizados para amplificación de genes *housekeeping* utilizados en el análisis de secuencia multilocus de las cepas bacterianas aisladas. Partidores de los genes *housekeeping* *cts*, *acn*, *pgi* y *rpoD*, su temperatura de alineamiento (T_m) y sus secuencias (Sarkar y Guttman, 2004).

Partidor	T_m (°C)	Secuencia
<i>cts-Fp</i>	56	AGTTGATCATCGAGGGCGCWGCC
<i>cts-Rp</i>	56	TGATCGGTTTGATCTCGCACGG
<i>acn-Fp</i>	60	ACATCCCGCTGCACGCYCTGGCC
<i>acn-Rp</i>	60	GTGGTGTCTGGGAACCGACGGTG
<i>pgi-Fp</i>	60	TGCAGGACTTCAGCATGCGCGAAGC
<i>pgi-Rp</i>	60	CGAGCCGCCCTGSGCCAGGTACCAG
<i>rpoD-Fp</i>	63	AAGGCGARATCGAAATCGCCAAGCG
<i>rpoD-Rps</i>	63	GGAACWKGCAGGAAGTCGGCACG

Se determinó una correcta amplificación y tamaño de los amplicones a través de electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% corrido a 200V por 20 min, de acuerdo al protocolo descrito en Filloux y Walker, 2014.

Los amplicones fueron secuenciados contratando un servicio externo en Macrogen Inc. Luego, las secuencias se compararon con aquellas disponibles en la base de datos de NCBI para determinar similitud nucleotídica.

Para el análisis de secuencia multilocus por medio del programa Geneious 2020.1.2, como primer paso se concatenaron los segmentos de los genes *acn*, *cts*, *pgi* y *rpoD* de tamaño de 632 b, 561 b, 779 b y 531 b, respectivamente. Además, se añadieron las secuencias del gen 16S ARNr (462 b), puesto que también ha resultado ser útil en este tipo de análisis (Garrido-Sanz y col., 2016). Finalmente, y mediante el modelo Tamura-Nei, el método de Neighbor-Joining, 1.000 iteraciones y un umbral de confianza (*threshold*) de 75% se construyó un cladograma (Berge y col., 2014; Flores y col., 2018; Van de Peer y Salemi, 2012).

Para el análisis bioinformático, las secuencias de las 19 cepas tanto de los genes

concatenados (multilocus) como individuales fueron alineadas junto con la cepa T6 de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* aislada en Teno Región del Maule, y caracterizada en el laboratorio, y otras ocho cepas de referencia obtenidas desde la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, s.f.) que se muestran a continuación en la tabla 5.

Tabla 4: Cepas de referencia. Cepas de referencia y sus números de acceso en GenBank, utilizadas para análisis genéticos.

Bacteria	Cepa	Número de acceso
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	NC_002516.2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	FDAARGOS 1088	NZ_CP068151.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LBUM677	NZ_CP038438.1
<i>Pseudomonas syringae</i>	CC1557	NZ_CP007014.1
<i>Pseudomonas syringae</i>	inb918	NZ_CP024646
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	B728a	NC_007005.1
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	NC_004578.1
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	CFBP 1590	NZ_LT855380.1

Con estos datos se construyó un cladograma utilizando el modelo de distancia genética Tamura-Nei, el método de construcción de árbol Neighbor-Joining, con 1.000 iteraciones y un umbral de confianza (threshold) de 75%, con el programa Geneious 2020.1.2 (Berge y col., 2014; Van de Peer y Salemi, 2012).

3.2 Determinación de tolerancia a cobre y antibiótico

3.2.1 Determinación de tolerancia a cobre

La tolerancia a cobre de las cepas ambientales fue determinada utilizando el protocolo de Hwang y col. (2005). Primero, se preparó medio MGY (extracto de levadura-manitol-ácido glutámico) (10 g de manitol, 2 g de L-ácido glutámico, 0,5 g de KH_2PO_4 , 0,2 g de NaCl, 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de extracto de levadura y 1 L de agua destilada) suplementado con distintas concentraciones de CuSO_4 (0; 1; 1,6; 2,0; 3,0; 4,0; 4,0 o 7,0 mM). Posteriormente, en placas de 96 pocillos se añadió 50 μL de las distintas

soluciones y se inoculó con 50 μ L de un cultivo *overnight* de *Pseudomonas* ($DO_{600}= 0,5$), obteniendo concentraciones finales de $CuSO_4$ de 0; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 o 3,5 mM. Se hizo un triplicado de cada muestra y un blanco. Las placas se cultivaron a 28 °C, y la DO_{600} del cultivo se registró a tiempos: 0, 24h y 48h, a través de lector de microplacas Asys Hitech Expert 96.

Se comparó el crecimiento bacteriano de los tres puntos temporales y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se definió CMI como el punto donde la DO_{600} del cultivo bacteriano a las 24h y 48h de cultivo fue igual o menor que a las 0h. Las cepas con CMI de $\leq 0,8$ mM $CuSO_4$ (52,2 μ g/ml de Cu^{+2}) se consideraron como susceptibles a cobre, aquellas que crecieron a concentraciones mayores de 0,8 mM $CuSO_4$ como tolerantes.

3.2.2 Determinación de resistencia a estreptomicina

La resistencia a estreptomicina por parte de las cepas ambientales fue determinada siguiendo el protocolo de Valenzuela y col., (2019). Primero, se preparó medio LB (Luria-Bertani) (10 g triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 1 L de agua destilada) en el cual fueron cultivados los aislados bacterianos toda una noche y ajustados a una DO_{600} de 0,3. Luego, 10 μ L de cada cultivo fueron depositados en placas de CYEG (casitona-extracto de levadura-glicerol-agar) (1,7 g casitona, 0,35 g extracto de levadura, 2 g glicerol, 15 g agar y 1 L de agua destilada) suplementadas con distintas concentraciones de sulfato de estreptomicina (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 50, 100, 250 y 500 μ g/mL). Se hizo por triplicado de cada muestra, y las placas inoculadas fueron cultivadas a 28°C por 48 h. Se definió la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la menor concentración de sulfato de estreptomicina en la cual se inhibía el crecimiento bacteriano a las 48 h de cultivo. Las cepas con CMI ≤ 2 μ g/mL de estreptomicina se

clasificaron como susceptibles, mientras que aquellas con un CMI > 2 µg/mL se clasificaron como resistentes (Valenzuela y col., 2019).

3.3 Bacteriófagos

Los bacteriófagos utilizados fueron aislados de muestras de aguas servidas de las plantas de tratamiento de agua La Farfana y el Trebal en un estudio previo el año 2018 (Tabla 6). Estos fueron caracterizados mediante métodos clásicos y moleculares. Para este estudio se seleccionaron tres fagos, los cuales fueron nombrados siguiendo el protocolo de Adriaenssens y Rodney Brister, (2017).

Tabla 6: Bacteriófagos aislados de muestras ambientales.

Código	Nombre
Fago6	<i>Pseudomonas phage Tg6c18</i>
Fago12	<i>Pseudomonas phage Fg13c38</i>
Fago18	<i>Pseudomonas phage Tg13c38</i>

Para disponer de un título de fagos conocido y óptimo para trabajar, en primer lugar, se inocularon 200 µL de bacteria en 20 mL de medio NB (dilución 1/100) en un tubo Falcon de 50 mL y se incubó a 28°C y 140 rpm, hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 0,4 (10⁸ UFC/mL). Luego, se añadieron 200 µL de fago (10¹⁰ UFP/mL), obteniendo una MOI: 1 y se incubó toda la noche a 28°C y 140 rpm. Después, se centrifugó a 7000 rpm por 5 min, a 4° C. Se traspasó el sobrenadante con fagos filtrado con un filtro para jeringa de 0,2 µm a otro tubo Falcon y se descartó el *pellet*. Finalmente, se determinó el título del enriquecido de fagos. Para ello, se tomaron 50 µL de la solución de fagos y se realizó una dilución seriada con medio NB líquido hasta la dilución 10⁻¹⁰. En una placa de NB sólido con un césped bacteriano susceptible al fago de estudio, se depositó una gota de 10 µL de cada dilución, incluyendo la solución sin diluir. Después de 24 h de cultivo a 28°C se contaron las placas de lisis obtenidas para determinar el número de unidades formadoras de placas (UFP/mL) para cada *stock* de fagos.

3.4 Caracterización de bacteriófagos

3.4.1 Determinación de rango de hospedero

El rango de hospedero de un bacteriófago corresponde a su capacidad de infectar distintas cepas bacterianas. Siguiendo el protocolo de Alonso y col., (2002), las 3 cepas de fagos fueron testeadas en su capacidad de infectar individualmente a 19 cepas caracterizadas de *Pseudomonas*. Para ello se utilizó la técnica de doble agar, en la cual en placas de medio nutritivo (NB) (12 g agar, 2,4 g extracto de carne, 4 g peptona, 800 mL H₂O) se cultivó un césped de la bacteria, y se depositó sobre este una microgota de 10 µL de fagos con un título de 10⁹ UFP/mL. Luego de 24h de cultivo a 28°C se observó la presencia de placas de lisis. Se estableció una escala cualitativa según el grado de translucidez de la placa de lisis, siendo (-) placas sin lisis, (+) en aquellas que se observó turbidez y (++) a lisis completa (translúcida).

3.4.2 Determinación del tipo de ácidos nucleicos por tratamiento enzimático

El genoma de los bacteriófagos puede ser de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), simple hebra o doble hebra, circular o linear (Ackermann, 2009). Para determinar el tipo de ácidos nucleicos de los tres bacteriófagos seleccionados se ensayaron digestiones con ADNasas y ARNasas. Los genomas de ADN son susceptibles a la acción enzimática de las ADNasas, mientras que los de ARN son susceptibles a la acción de las ARNasas (Cuppels, 1983).

3.4.2.1 Extracción y purificación de ácidos nucleicos

En primera instancia se extrajo y purificó el material genético de los fagos aislados siguiendo el protocolo descrito en Higuera y col., (2013). Para ello, 20 mL del lisado de fagos en medio líquido NB (2,4 g extracto de carne, 4 g peptona, 800 mL H₂O) fueron concentrados mediante ultra centrifugación a 100.000 g por 1 hora, a 4° C. Luego, se

descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 200 μ L de buffer SM (800 mL de H₂O, 5,8 g de NaCl, 2g de MgSO₄ x 7H₂O, 50 mL de Tris-HCl 1M (pH 7,5)) y 5 mL de gelatina al 5%. A continuación, se procedió a degradar los ácidos nucleicos bacterianos presentes en la solución de fagos resuspendidos, utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification, se añadió ADNasa a una concentración final de 20 μ g/mL, 20 μ L de buffer de la enzima y ARNasa una concentración final de 100 μ g/mL. Se incubó a 37 °C por 1,5 horas. Posteriormente, para romper la cápside del fago se agregó proteinasa K (concentración final 6 μ g/mL) y SDS 10% p/v (concentración final 0,5%), y se incubó a 65°C durante 1 hora.

Se extrajo y purificó el ADN del fago mediante el método fenol-cloroformo, añadiendo 2 volúmenes de fenol al sobrenadante y agitándolo con vortex durante 30 seg. Luego, se añadieron 2 volúmenes de cloroformo (CHCl₃) y se agitó con vortex por 30 seg. Se centrifugó a 10.000 g por 15 min, y se recuperó la fase acuosa. Esta serie de pasos se repitió 2 o 3 veces hasta no ver impurezas en la interfase.

Después, se precipitó el ADN del fago agregando 1/10 volumen de acetato de sodio 3M, 2,5 volúmenes de etanol 100%, y se mezcló suavemente. Se centrifugó a 15.000 g por 10 min. a 4° C, y se descartó el sobrenadante. El pellet de ácido nucleico se lavó con 500 μ L de etanol 70% frío. Se centrifugó a 15.000 g por 10 min. a 4° C y se descartó el sobrenadante. Se evaporó el etanol sobrante al aire sin secar el pellet. Por último, el pellet se resuspendió en 80 μ L en H₂O libre de nucleasas.

Finalmente, se cuantificó y analizó la integridad del genoma purificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.6% (p/v) a 100 V por 30 min. Se utilizó como marcadores de peso molecular Ladder 1Kb y *Lambda HindIII*. El gel se observó en

transiluminador bajo luz ultravioleta (UV) de 290nm. Por otra parte, se cuantificó el material genético por Qbit®.

3.4.2.2 Digestión enzimática

La reacción de digestión se realizó con 1 µL de ácidos nucleicos purificados, los cuales fueron tratados con 2 µl de desoxirribonucleasa (ADNasa) I y 20 µL de buffer ADNasa del kit Wizard® Genomic DNA Purification, se incubó a 37°C por dos horas. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0,6 % (p/v) a 100V por 30 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó Lambda *HindIII*. El producto de la digestión se observó en un transiluminador bajo luz ultravioleta (UV) de 290nm. Se realizó un control negativo de la digestión sin enzima.

Por otra parte, la reacción de digestión con ARNasa se utilizó el protocolo mencionado anteriormente, con las siguientes modificaciones 2 µL de ARNasa y llevados a un volumen de 20 µL con agua libre de nucleasas.

3.4.3 Caracterización morfológica por microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) permite dilucidar la morfología y tamaño de los bacteriófagos. Estas dos características, junto con la naturaleza del ácido nucleico permiten clasificar a los fagos en familias (Ackermann, 2009).

Se prepararon *stocks* de fagos con títulos sobre 10^9 UFP/mL suspendidos en buffer SM o en medio NB líquido para microscopía electrónica. Se realizó el protocolo modificado descrito por Wichels y col., (1998), de tinción negativa con acetato de uranilo al 2%. Las muestras fueron depositadas en grillas con membranas formvar cubiertas con carbón, el excedente de la mezcla se absorbió con papel y las grillas se dejaron secar a

temperatura ambiente. Posteriormente se observaron en un microscopio electrónico Phillips Tecnai 12.

3.5 Obtención de cepas de *Pseudomonas* resistentes a bacteriófagos

Se seleccionaron dos cepas de las diecinueve *Pseudomonas* ambientales caracterizadas, denominadas AI_1 y T1.9. La cepa T1.9 fue seleccionada debido a su grado de virulencia en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), de acuerdo con lo determinado en una caracterización previa. A partir de los resultados del rango de hospedero, se determinó que esta cepa fue susceptible a los tres bacteriófagos ambientales denominados Fago6, Fago12 y Fago18. La segunda cepa AI_1, se seleccionó puesto que también era susceptible a los tres fagos. Estas cepas bacterianas se consideraron parentales.

Con el propósito de obtener variantes resistentes a la infección de los fagos, las cepas de *Pseudomonas* parentales fueron expuestas a cada uno de estos como se describe a continuación. En un tubo Eppendorf se co-cultivaron 50 μ L de un cultivo bacteriano en fase exponencial a una DO_{600} : 0,3 (10^8 UFC/mL) con 450 μ L de una solución de fagos con título superior a 10^9 UFP/mL (MOI: 10), se agitó con vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Luego, se realizó dilución seriada del co-cultivo, utilizando como solvente soluciones de fagos con título superior a 10^9 UFP/mL.

A continuación, cada dilución fue sembrada en placas de Petri con medio NB sólido e incubada a 28°C por 24 h. De dichas placas se calculó el título bacteriano, y se aislaron 5 colonias de variantes resistentes de *Pseudomonas* provenientes de las diluciones más altas. Se obtuvo un total de 30 aislados, los cuales fueron sembrados en medio NB sólido e incubados a 28°C por 12 horas, para luego tomar una unidad formadora de colonia

aislada y cultivarla en medio NB líquido de modo de asegurar la clonalidad.

Para verificar que las cepas aisladas en el paso anterior fueran resistentes al fago expuesto, se utilizó el método de doble agar. La variante resistente por analizar fue utilizada para generar el césped bacteriano, y sobre el césped se depositaron tres gotas de 10 µL de fagos ($\geq 10^9$ UFP/mL). Luego de 24h de cultivo a 28°C se observó la ausencia o presencia de placas de lisis. Aquellos cultivos sin placas de lisis fueron considerados resistentes al bacteriófago.

Paralelamente, se realizó la dilución seriada de cada cepa de *Pseudomonas* parental utilizando solo medio NB como solvente, para determinar el porcentaje de resistencia entre los títulos de las bacterias parentales y variantes resistentes a fagos.

Por último, en base al título de las cepas bacterianas parentales y las cepas derivadas resistentes se calculó el porcentaje de resistencia mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de resistencia} = \frac{\text{título bacteria expuesta a fagos}}{\text{título bacteria control}} \times 100$$

3.6 Estudio motilidad de *Pseudomonas* parentales y resistentes a fagos

Se estudió la motilidad de las bacterias sobre dos tipos de desplazamiento denominados *swimming* y *swarming*. La motilidad de las cepas parentales AI_1 y T1.9, y de las variantes resistentes fue determinada utilizando el protocolo modificado de Clarke y col., (2016). Las placas para *swimming* y *swarming* se prepararon con medio B de King estándar en las concentraciones de agar 0,28% y 0,5% respectivamente. Se sembraron 2 µl de bacterias a una DO₆₀₀ de 0,2 y diluidas en MgSO₄ 10 mM, poniendo 3 microgotas de cultivo bacteriano por placa. La sección transversal máxima de la extensión de la

colonia se midió después de una incubación de 48 horas a 28°C.

Siguiendo el protocolo de Nogales y col., (2015) se realizó la comparación estadística entre las diferentes cepas y condiciones mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA), y posteriormente con la prueba de diferencia honestamente significativa de Dunnet con una significancia del 5% (doble cola).

3.7 Determinación tolerancia a cobre de cepas resistentes a fagos

La tolerancia a cobre de las cepas parentales AI_1 y T1.9, y de las variantes resistentes a fagos fue determinada utilizando el protocolo de Hwang y col. (2005) descrito anteriormente. Las placas se cultivaron a 28 °C, y la DO₆₀₀ del cultivo se registró a tiempos: 0, 24h y 48h mediante el lector de microplacas Asys Hitech Expert 96. Se comparó el crecimiento bacteriano de los tres puntos temporales y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se graficaron los promedios de la DO₆₀₀ alcanzada a las 48 h de cultivo a una concentración de 3,5 mM de CuSO₄ por las cepas en estudio. Finalmente, para determinar si las diferencias de crecimiento eran estadísticamente significativas, entre cada cepa parental y sus derivadas, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Posteriormente, la prueba honestamente significativa de Nemenyi (Siegel y Castellan, 1988).

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento y confirmación molecular de *Pseudomonas* spp. ambientales aisladas desde tomate

4.1.1 Características morfológicas

En primer lugar, en este estudio se aislaron cepas bacterianas con morfologías de colonias similares a *Pseudomonas syringae* crecidas en medio BK. Estas características son: colonias mucosas, esféricas-convexas, de borde liso definido, superficie brillante y que presentaban un color amarillo fluorescente. Por otra parte, en medio TM-80 se seleccionaron aquellas colonias que presentaban un color blanco-verdoso o blanco-amarillo, con un halo blanco. Se seleccionaron 19 aislados representativos de las localidades de aislamiento (Tabla 3). En la figura 4 se muestra una placa a modo de ejemplo.

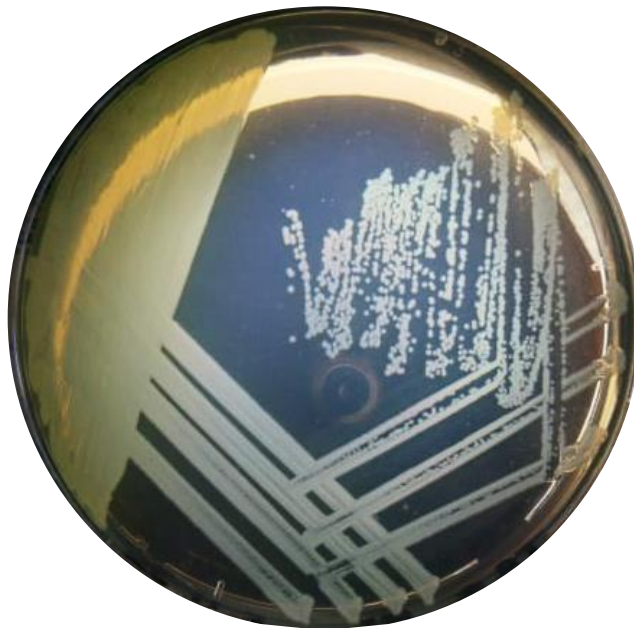


Figura 4: Aislamiento de *Pseudomonas* spp. desde plantas de tomates. Características de unidad formadora de colonia en placa con medio B de King sólido al 7,5%, cultivado a 28°C.

4.1.2 Secuenciación y análisis del gen 16S ARNr

Con el fin de establecer el género bacteriano de los 19 aislados ambientales seleccionados se secuenciaron los genes 16S ARNr, y se identificó el género bacteriano a través de la comparación nucleotídica en la base de datos de RPD II.

Todas las cepas resultaron pertenecer al género *Pseudomonas*, puesto que tuvieron un porcentaje de similitud nucleotídica de 100% con genes 16S ARNr de bacterias de dicho género.

4.2 Diversidad de *Pseudomonas* spp. mediante análisis de multilocus.

Los genes “*housekeeping*” son aquellos que se encuentran en el genoma central (*core genome*), son esenciales, se encuentran por definición en todas las bacterias y evolucionan más rápidamente que los genes 16S ARNr. Por tanto, son regiones más discriminatorias (Keim, 2005). Estos genes codifican para proteínas esenciales para la supervivencia del microorganismo, generalmente es menos probable que estos genes sean transferidos horizontalmente entre bacterias, suelen evolucionar neutralmente o están restringidos selectivamente. Es por ello que son utilizados para estudiar la historia evolutiva de linajes bacterianos clonales a través del tiempo y para identificar especies bacterianas (Sarkar y Guttman, 2004).

Con el fin de determinar la diversidad de las 19 cepas bacterianas aisladas se compararon las secuencias de los genes *housekeeping acn*, *pgi*, *cts* y *rpoD* con las secuencias de dichos genes de las cepas de referencia de la tabla 5. También se añadió a este análisis las secuencias de los genes 16S ARNr previamente estudiados. Se determinaron sus similitudes nucleotídicas por medio del alineamiento de las secuencias concatenadas, y en base a ello se construyó un cladograma (Figura 5).

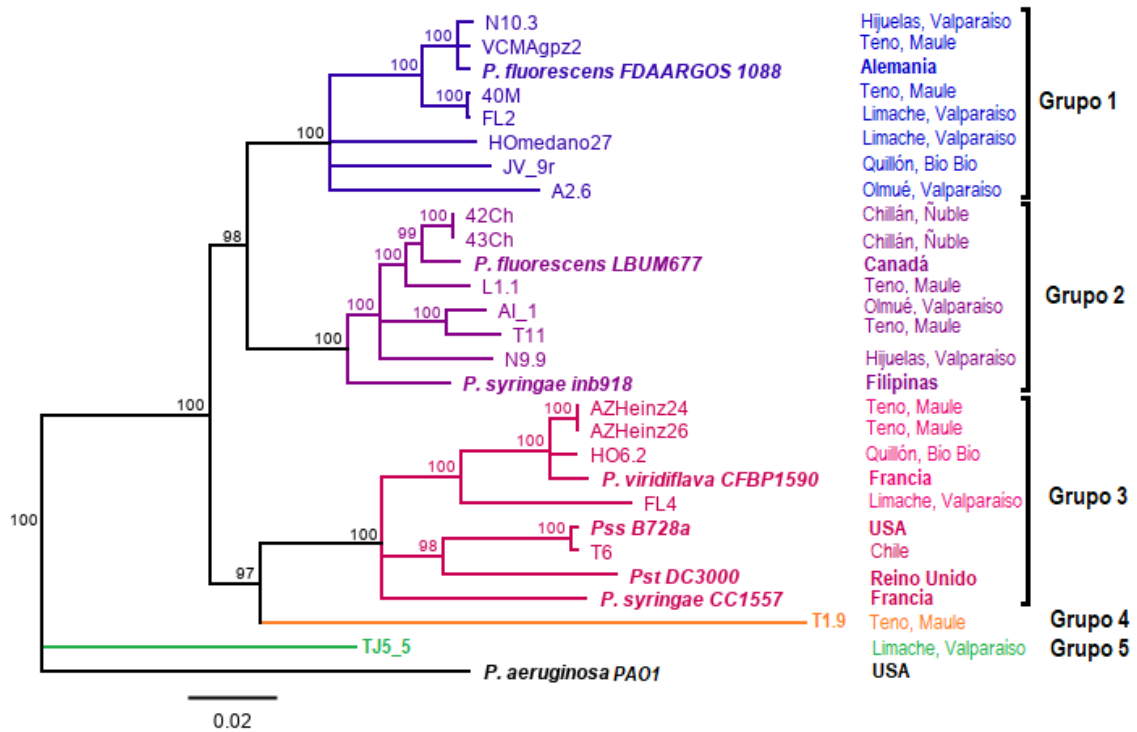


Figura 5: Cladograma de las cepas de *Pseudomonas* spp. aisladas derivadas del análisis de secuencia multilocus (MLSA). Cladograma construido utilizando el método de Neighbor-Joining (bootstrap: 1,000 repeticiones) y las secuencias concatenadas de los genes 16S ARNr, *acn*, *cts*, *pgi* y *rpoD* de tamaños 462, 638, 563, 780 y 533 bases respectivamente, para cada aislado y las cepas de referencia de la tabla 5. Como *outgroup* se usó a *P. aeruginosa* PAO1. El nombre y lugar de origen de las cepas se muestran en cada rama.

Al observar el cladograma de la figura 5 se distinguen cinco filogrupos. Los valores para el *bootstrap* varían entre 97 y 100 por lo que estas agrupaciones son probables o verdaderas.

El filogrupo 1 se conformó por siete cepas provenientes de las regiones de Valparaíso, Maule y Bío Bío. Además, se observó que cepas aisladas desde puntos distantes geográficamente se agruparon cercanamente. Como es el caso de N10.3, VCMAgpz2 y *P. fluorescens* FDAARGOS 1088, provenientes de las regiones de Valparaíso, Maule y Alemania, respectivamente.

Para el caso del filogrupo 2, seis cepas provenientes de las regiones de Valparaíso, Maule y Ñuble agruparon con las cepas de referencias *P. fluorescens* LBUM677 y *P.*

syringae *inb918*. Las cepas 42Ch y 43Ch son indistinguibles entre sí por este tipo de análisis, sumado a que son aislados provenientes del mismo lugar de muestreo, y están estrechamente relacionadas a *P. fluorescens* LBUM677 (Canadá) en comparación al restante de las cepas.

El filogrupo 3 se conformó por cuatro cepas provenientes de las regiones de Valparaíso, Maule y Bío Bío. AZHeinz24 y AZHeinz26 fueron indistinguibles entre sí, y junto a HO6.2 fueron cercanas en similitud a *P. viridiflava* CFBP1590, proveniente de Francia. Como era de esperar las cepas de referencia *Pss* B728 y T6 (*Pss* aislada en el laboratorio) agruparon juntas y están estrechamente relacionadas filogenéticamente. En este mismo filogrupo se encuentra, aunque más distante a los aislados de este estudio, la cepa de referencia *Pst* DC3000, que es una *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* patógena de tomates.

Las cepas T1.9 y TJ5_5 no se agruparon con las otras cepas de este estudio, por lo que cada una conformó el filogrupo 4 y 5, respectivamente. Cabe destacar que la cepa TJ5_5 tuvo la mayor diferencia nucleotídica en comparación al resto de cepas, divergiendo muy tempranamente.

Por otra parte, en la figura 5 en general se observa que en cada filogrupo cepas aisladas desde puntos distantes geográficamente se agruparon cercanamente de acuerdo a su similitud nucleotídica.

Finalmente, se realizó el análisis de manera separada de cada gen, y se obtuvo que el gen que confiere mayor diversidad correspondió a *pgi* puesto que contiene el menor porcentaje de bases nucleotídicas idénticas (81%) entre las secuencias de las cepas. El gen que confiere menor diversidad es 16S ARNr con un 97% de bases idénticas entre

las secuencias de las cepas, en segundo lugar, *cts* con un 89,1% (Ver anexo I).

4.2.1 Análisis del gen *cts* como predictor de afiliación filogenética.

El gen *housekeeping cts* es ampliamente utilizado para clasificar nuevas cepas de *Pseudomonas syringae*, debido a que corresponde a una de las secuencias de genes más confiables entre los genes utilizados en MLST para esta especie, según lo descrito por Sarkar y Guttman, 2004. Es decir, que el análisis del gen por si solo puede predecir con precisión la agrupación filogenética, a nivel de filogrupo y clado, para la mayoría de las cepas de esta especie (Berge y col., 2014)

Si bien, el gen ha demostrado ser una herramienta útil para este fin, incluso utilizando secuencias parciales de 409 pb para *P. syringae*, no se ha descrito esta misma utilidad con otros tipos de *Pseudomonas* ambientales asociadas a tomates.

Para el análisis de las 19 cepas en estudio, se comparó el gen *cts* de cada una con el de las cepas de referencia de la tabla 5. Los porcentajes más altos de similitud nucleotídica entre pares de cepas se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Porcentaje de similitud del gen *cts* con cepas de referencias. Porcentajes de similitud nucleotídica del gen *cts* para cada una de las 19 cepas de *Pseudomonas* en estudio, con el gen *cts* de las cepas de referencia.

Nombre cepa	% Similitud <i>cts</i>	Cepa de referencia*
VCMAgpz2	100	<i>P. fluorescens</i> FDAARGOS 1088
N10_3	99,6	<i>P. fluorescens</i> FDAARGOS 1088
HO6.2	99,5	<i>P. viridiflava</i> CFBP 1590
AZHeinz24	99,5	<i>P. viridiflava</i> CFBP 1590
AZHeinz26	99,5	<i>P. viridiflava</i> CFBP 1590
42Ch	99,3	<i>P. fluorescens</i> LBUM677
43Ch	99,3	<i>P. fluorescens</i> LBUM677
FL2	99,1	<i>P. fluorescens</i> FDAARGOS 1088
40M	99,1	<i>P. fluorescens</i> FDAARGOS 1088
L1.1	98,7	<i>P. fluorescens</i> LBUM677
T11	97,6	<i>P. fluorescens</i> LBUM677
N9_9	97,3	<i>P. fluorescens</i> LBUM677
AL_1	97,3	<i>P. fluorescens</i> LBUM677
HOmedano 27	96,7	<i>P. fluorescens</i> FDAARGOS 1088
JV_9r	96,2	<i>P. fluorescens</i> FDAARGOS 1088
FL4	94,6	<i>P. viridiflava</i> CFBP 1950
T1.9	90,2	<i>P. fluorescens</i> LBUM677
A2_6	88,6	<i>P. fluorescens</i> FDAARGOS 1088
TJ5_5	87,9	<i>P. aeruginosa</i> PAO1

*Los valores corresponden a las mayores similitudes nucleotídicas entre las cepas de *Pseudomonas* en estudio versus las de referencias.

Las secuencias parciales de este gen fueron alineadas y a partir del alineamiento se construyó un cladograma (Figura 6), en el cual además, se añadieron las secuencias de las cepas de referencias descritas en la tabla 5 y la cepa *Pss* T6.

En el cladograma de la figura 6 se observó la formación de cinco filogrupos con las cepas de estudio, los valores de *bootstrap* se muestran en cada nodo, y el rango fue de entre 83% a 100%. Todas las agrupaciones coinciden con los filogrupos formados en el árbol construido para el *MLSA* (figura 5).

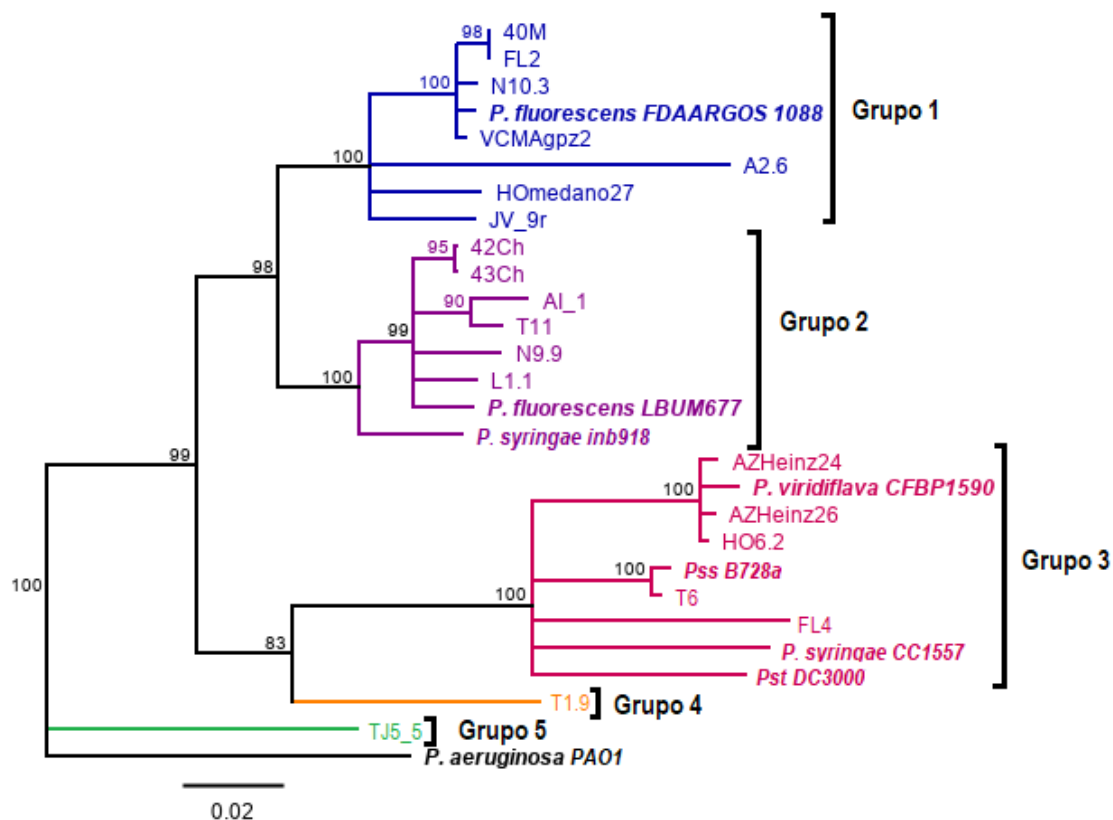


Figura 6: Cladograma del gen *cts* de las cepas de *Pseudomonas*. Se usaron las cepas de referencia de la tabla 5 y la cepa *Pss* T6 proveniente de Teno, Maule. Cladograma construido utilizando el método de Neighbor-Joining (bootstrap: 1,000 repeticiones) con la cepa *P. aeruginosa* como *outgroup* y las secuencias alineadas del gen *cts* (563 b) de cada aislado. Los nombres de las cepas se muestran en cada rama.

El filogrupo 1 (Figura 6) se conformó por siete cepas provenientes de las regiones de Valparaíso, Maule y Bío Bío, las cuales se agruparon con la cepa *P. fluorescens* FDAARGOS 1088 y su porcentaje de similitud fue superior a 96%. A excepción de la cepa A2.6 que presentó un porcentaje de similitud menor. En comparación con el cladograma de la figura 5, las cepas N10.3 y VCMAgpz2 se agruparon juntas, y A2.6 aumentó su distancia.

El filogrupo 2 se conformó por seis cepas provenientes de las regiones de Valparaíso, Maule y Ñuble, las cuales se agruparon con la cepa *P. fluorescens* LBUM677 con un porcentaje de similitud superior a 96%. En comparación con el cladograma de la figura

5, las cepas AI_1, N9.9 y T11 disminuyeron en 0,01 su distancia con la cepa de referencia, mientras que las cepas 42Ch y 43Ch aumentaron en 0,01 su distancia, y L1.1 mantuvo su distancia (Ver anexo II y III).

El filogrupo 3 se conformó por cuatro cepas provenientes de las regiones de Maule y Bío Bío, las cuales se agruparon con la cepa *P. viridiflava* CFBP1590, *P. syringae* CC1557 y *Pst DC3000*. El porcentaje de similitud para estas cepas en estudio y *P. viridiflava* CFBP1590 fue superior a 96%. Por otra parte, en comparación con el cladograma de la figura 5, AZHeinz24 y AZHeinz26 disminuyeron su porcentaje de similitud entre ellas. FL4 aumentó su distancia en 0,03 con la cepa de referencia.

Las cepas T1.9 y TJ5_5 no se agruparon con otras cepas de referencia por lo que cada conformaron los filogrupos 4 y 5 respectivamente, al igual que la figura 5. Tampoco tuvieron un porcentaje de similitud mayor al 96% con alguna cepa de la base de datos de NCBI. En comparación a la figura 5, T1.9 disminuyó considerablemente su distancia con el resto de las cepas, y el porcentaje de similitud con la cepa *P. fluorescens* LBUM677 aumentó a 79,6%. Por otro lado, TJ5_5 disminuyó en 0,02 su distancia con *P. aeruginosa* PAO1, pero no permite agruparlas entre sí.

4.3 Determinación de tolerancia a cobre y estreptomicina

Se determinó la tolerancia a cobre y estreptomicina de las 19 cepas bacterianas de estudio, los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para cada caso se muestran en la tabla 9. Las cepas con $CMI \leq 52,2 \mu\text{g/mL}$ de Cu^{+2} se clasificaron como susceptibles al cobre y, aquellas con valores superiores como tolerantes a cobre (Hwang y col., 2005). Si el $CMI \geq 182 \mu\text{g/mL}$ entonces se clasificaron como super tolerantes (Altimira y col., 2012). Por otra parte, para estreptomicina se clasificaron como

susceptibles las cepas con CMI ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, mientras que aquellas con un valor mayor como resistentes. Si el CMI ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$ entonces se clasificaron como super resistentes (Valenzuela y col., 2019).

Tabla 8: Tolerancia a cobre y estreptomycinina. Valores de la concentración mínima inhibitoria de crecimiento en medio con cobre y estreptomycinina, y su clasificación de tolerancia y susceptibilidad (S: susceptible; T: tolerante; ST: super tolerante; R: resistente y SR: super resistente).

Nombre cepa	Cobre		Estreptomycinina	
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	clasificación	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	clasificación
HO6.2	32	S	2	S
FL4	32	S	4	R
43Ch	32	S	10	R
N9.9	32	S	15	R
AZHeinz24	64	T	4	R
42Ch	64	T	15	R
TJ5_5	64	T	15	R
AZHeinz26	64	T	15	R
VCMAgpz2	64	T	100	SR
N10.3	64	T	250	SR
A2.6	64	T	250	SR
40M	80	T	250	SR
T11	80	T	500	SR
HMedano 27	100	T	15	R
T1.9	100	T	15	R
JV_9r	100	T	250	SR
FL2	100	T	500	SR
L1.1	100	T	500	SR
AI_1	228	ST	6	R

Solo la cepa HO6.2 resultó ser susceptible a ambos agroquímicos. El resto de las cepas fue tolerante a cobre y/o a estreptomycinina. Un 78,9% de las cepas estudiadas fueron tolerantes a concentraciones mayores a 64 $\mu\text{g/mL}$ de cobre, de estas solo AI_1 se clasificó como super tolerante. Para el caso de estreptomycinina el 94,7% de las cepas resistieron a concentraciones mayores a 4 $\mu\text{g/mL}$, ocho cepas se clasificaron como super resistentes, de las cuales 15,8% crecieron a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$. En la figura 7 se muestra un gráfico para visualizar las proporciones de tolerancia a cobre y

estreptomicina de las cepas aisladas.

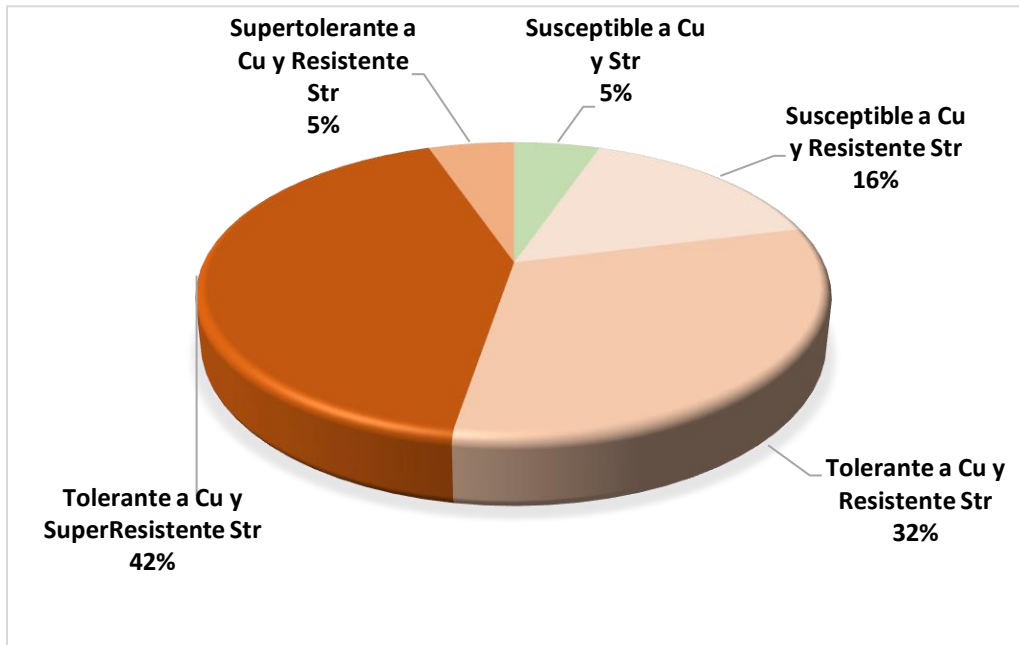


Figura 7: Gráfico de proporción de *Pseudomonas* spp. aisladas de acuerdo a su tolerancia a cobre y estreptomicina.

El 95% de las cepas presenta tolerancia a cobre o resistencia a estreptomicina. De este, el 79% es resistente a ambos y el 47% es super tolerante o super resistente a alguno de los agroquímicos de estudio.

4.4 Caracterización y clasificación de bacteriófagos

Dado que los bacteriófagos se han descrito como una potencial herramienta biocontroladora contra bacterias resistentes a agroquímicos, se buscó aislar ejemplares que lisaran a las bacterias caracterizadas en este estudio. Una de las fuentes de aislamiento de fagos más comunes son las aguas servidas, puesto que poseen una alta concentración bacteriana y a ellas llegan cursos de aguas ambientales tales como las provenientes de terrenos agrícolas. Entonces, es probable que las bacterias de interés o bacterias cercanas genéticamente a estas se encuentren presentes y en

consecuencia, también se encuentren fagos que las infecten (van Charante y col., 2019). Si bien la fagoterapia ha resultado efectiva, pueden surgir cepas bacterianas resistentes, y también, se ha reportado que en la adquisición de resistencia a fagos pueden existir costos de compensación que provoquen cambios en la virulencia de las bacterias (Koskella y col., 2011; Oechslin, 2018). Estos cambios han sido reportados principalmente para patógenos animales, por ello es necesario estudiar el fenómeno en fitopatógenos.

4.4.1 Rango de hospedero

Tres bacteriófagos, denominados Fago6, Fago12 y Fago18, fueron aislados previamente desde muestras de aguas servidas de las plantas de tratamiento de agua La Farfana y El Trebal. En primer lugar, para su caracterización se estudió sus rangos de hospederos, es decir, cuáles son las cepas de *Pseudomonas* en estudio susceptibles a la infección de estos.

Para determinar la especificidad de infección de los bacteriófagos seleccionados, los tres fagos aislados se co-cultivaron de manera individual con las 19 cepas bacterianas caracterizadas. La susceptibilidad de las bacterias se clasificó cualitativamente según el nivel de translucidez de la placa de lisis donde: (-) corresponde a ausencia de placas de lisis, (+) en aquellas en que se observó placas semi-translúcidas y (++) en aquellas donde se observó una lisis completa. Solo siete cepas bacterianas resultaron susceptibles a la infección de alguno de los tres bacteriófagos (Tabla 9).

Tabla 9: Rango de hospedero de bacteriófagos. Clasificación cualitativa de la lisis bacteriana: (-) corresponde a ausencia de placas de lisis, (+) a placas semi-translúcidas y (++) a lisis completa (translucidez).

	Bacteriófago		
	Fago 6	Fago 12	Fago 18
Bacteria			
40M	-	-	-
42Ch	+	+	+
43Ch	-	-	-
A2.6	-	-	-
AI_1	++	++	++
AZHeinz24	+	-	-
AZHeinz26	-	-	-
FL2	-	-	-
FL4	-	-	-
H06.2	++	++	++
H0medano27	-	-	-
JV_9r	-	-	-
L1.1	++	++	++
N10.3	-	-	-
N9.9	-	-	-
T1.9	+	+	+
T11	-	+	-
TJ5_5	-	-	-
VCMAgpz2	-	-	-

Los perfiles de infección (rango de hospedero) de cada uno de los fagos fue distinto. Los bacteriófagos Fago6 y Fago12 fueron capaces de lisar a seis de las cepas de *Pseudomonas*, diferenciándose solo en la infección individual de AZHeinz24 y T11, respectivamente. Mientras que Fago18 fue capaz de lisar las mismas 5 cepas compartidas por los Fago6 y Fago 12. Ninguno de los fagos en estudio fue capaz de infectar alguna cepa de los filogrupos 1 y 5. Por último, no se observó que el punto geográfico de origen de las cepas bacterianas se correlacionara con la susceptibilidad

de estas a los fagos aislados.

4.4.2 Determinación de ácidos nucleicos

Para determinar la naturaleza de los ácidos nucleicos de los bacteriófagos seleccionados se digirieron los genomas extraídos utilizando las enzimas ADNasa y RNAsa. Como resultado se obtuvo que los genomas de los tres fagos seleccionados son de doble cadena de ADN (figura 8). Puesto que las muestras tratadas con ADNasa fueron digeridas mientras que las tratadas con RNAsa no, y se observó la misma banda que la muestra sin digerir (SD). Los geles completos se muestran en el anexo.

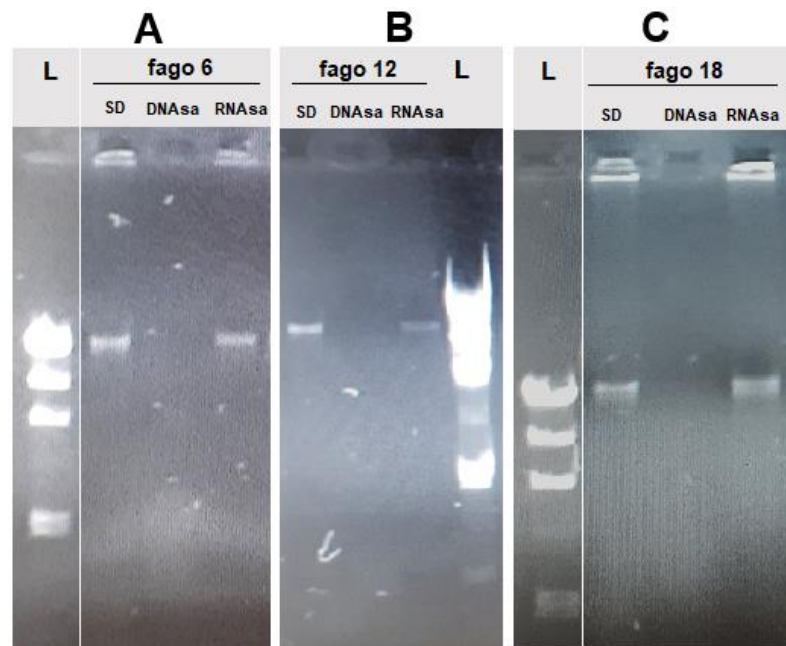


Figura 8: Determinación de ácidos nucleicos por digestión enzimática. A. Gel de acrilamida 0,6% con el producto de la digestión del genoma del Fago6. B. Gel de acrilamida 0,6% con el producto de la digestión del genoma del Fago12. C. Gel de acrilamida 0,6% con el producto de la digestión del genoma del Fago18. SD: Sin digerir.

4.4.3 Caracterización morfológica por microscopía electrónica de transmisión

Para determinar la morfología de los tres fagos seleccionados, estos fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión. Se observó que el Fago12 tiene una cápside icosaédrica de tamaño de 60 nm y una cola de 15 nm, aproximadamente. Por otra parte,

el tamaño de la cápside del Fago18 es de aproximadamente 65 nm y no se observó cola. Ambas morfologías, sumado a que poseen un genoma de ADN doble cadena, corresponden a la familia *Podoviridae* (Figura 9), como se describe en Ackermann, 2009. Para el Fago6 no se pudo determinar su morfología.

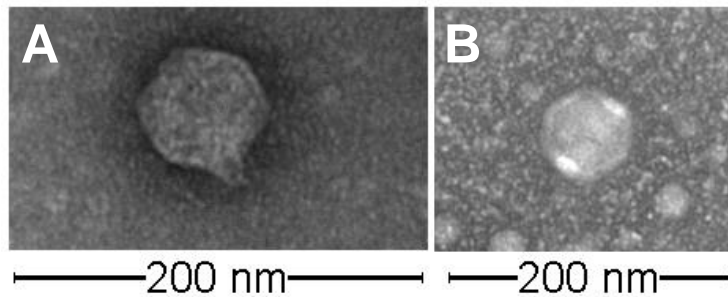


Figura 9: Microfotografía de bacteriófagos en TEM. A. Fago12 en buffer SM, 87000x. B. Fago18 en medio NB, 60000x.

4.5 Obtención de variantes de *Pseudomonas* spp. resistentes a bacteriófagos

Para el análisis de aparición espontánea de bacterias resistentes a los fagos seleccionados, se utilizaron las cepas denominadas AI_1 y T1.9, consideradas parentales. Estas fueron expuestas a cada uno de los tres fagos (Fago6, Fago12 y Fago18). Luego fueron diluidas y sembradas en medio NB sólido. Después de 24h de incubación se evaluó la aparición de colonias potencialmente resistentes a fagos.

Como resultado, se obtuvieron variantes de *Pseudomonas* resistentes para cada una de las combinaciones de bacterias y fagos, estas se denominaron según el nombre de la cepa parental de la que derivaban (AI_1 o T1.9) seguido de una letra (A, B o C) dependiendo del fago al que desarrollaron resistencia. Las cepas resistentes al Fago6 se denominaron "A", las resistentes al Fago12 se denominaron "B", mientras que las resistentes al Fago18 se denominaron "C".

En la figura 10 se muestran a modo de ejemplo, los resultados obtenidos en el caso de

la cepa parental T1.9 tratada con el Fago18.

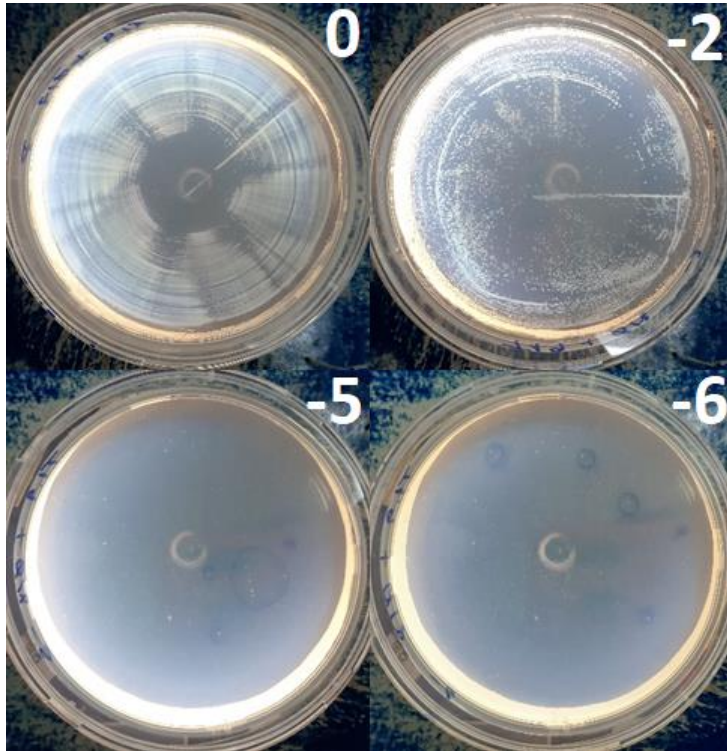


Figura 10: Obtención de cepas resistentes a fagos derivadas de la cepa parental T1.9. Placas de cultivo de la cepa T1.9 a distintas diluciones con el fago 18; 0 para sin diluir, -2 para dilución 10^{-2} , -5 para la dilución 10^{-5} y -6 para la dilución 10^{-6} .

Para la selección de variantes de *Pseudomonas* potencialmente resistentes a bacteriófagos, se tomaron cinco colonias únicas de cada ensayo, las cuales provenían de las diluciones más altas.

Se calculó el porcentaje de resistencia en base al cociente entre el título de las cepas parentales (ausencia de fago) y las variantes de cepas resistentes. En la tabla 11 se muestra el porcentaje de resistencia obtenido correspondiente para cada en estudio. Donde la cepa T1.9 tuvo los mayores porcentajes de resistencia en comparación a la cepa AI_1.

Tabla 5: Porcentaje de resistencia de las bacterias tratadas con bacteriófagos.

Ensayo	Nombre variante resistente	Porcentaje de resistencia (%)
AI_1 + Fago6	AI_1 A	0,002
AI_1 + Fago12	AI_1 B	0,001
AI_1 + Fago18	AI_1 A C	0,26
T1.9 + Fago6	T1.9 A	18,57
T1.9 + Fago12	T1.9 B	60,71
T1.9 + Fago18	T1.9 C	12,86

Posteriormente, se seleccionaron y resembraron treinta colonias individuales potencialmente resistentes a fagos y se procedió a verificar su resistencia. Para ello, se cultivó un césped de cada cepa de *Pseudomonas* derivada en placas con medio NB y se depositó sobre este tres microgotas de 10 μ L de fagos ($\geq 10^9$ UFP/mL). Se confirmó la resistencia de veintinueve de las treinta cepas analizadas. En la figura 11 se muestran dos placas a modo de ejemplo, en A se muestra una variante resistente a fagos, puesto que no se observan áreas de lisis. Por otra parte, en B la cepa no es resistente a fagos puesto que se observan áreas de lisis.

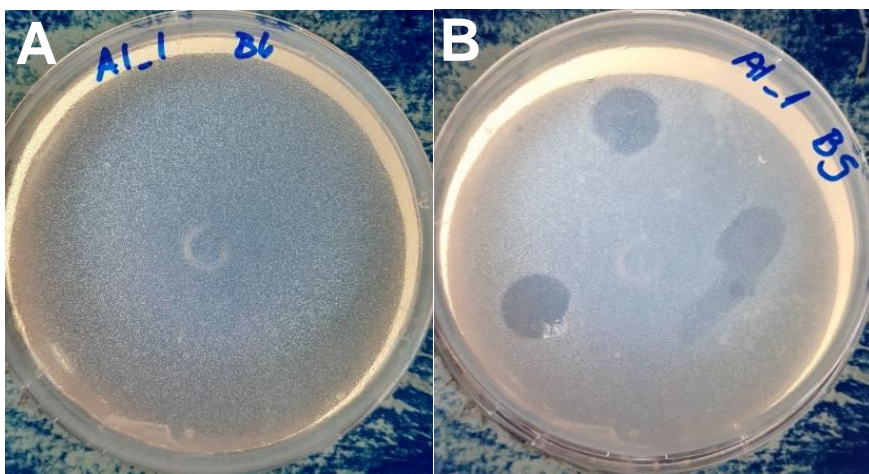


Figura 11: Confirmación de la resistencia a fagos adquirida por las cepas bacterianas tratadas. A. placa NB con césped AI_1 B resistente a fago (sin área de lisis). B. placa NB con césped AI_1 B sensible a fago (con placas de lisis).

4.6 Estudio motilidad *Pseudomonas* spp. parentales y variantes resistentes a fagos

Pseudomonas para desplazarse e infectar a su huésped utiliza dos tipos de nado dependientes de la rotación del flagelo: *swimming* y *swarming*. *Swimming* corresponde a un movimiento individual en medio líquido, mientras que *swarming* corresponde a una translocación rápida y coordinada de una población bacteriana a través de una superficie sólida o semisólida (Kearns, 2010).

El desplazamiento es un factor de virulencia importante para que *Pseudomonas* infecte exitosamente a su hospedero. Además, existen antecedentes que el desarrollo de resistencia a bacteriófagos puede afectar la motilidad de cepas bacterianas (Koskella y col., 2011). Dadas estas razones, se comparó la motilidad de las cepas parentales AI_1 y T1.9, versus sus respectivas variantes resistentes. Para ello, se determinó si es que la adquisición de resistencia a bacteriófagos produjo o no un cambio en la motilidad en las bacterias (*swimming* y *swarming*).

En la figura 12 se muestran las colonias obtenidas luego de 48 h de cultivo, para *swimming*. Se añadieron 3 microgotas de cultivo bacteriano por placa y para cuantificar el desplazamiento se midió el diámetro máximo de la extensión de la colonia. En todos los casos el patrón de desplazamiento fue radial y uniforme.

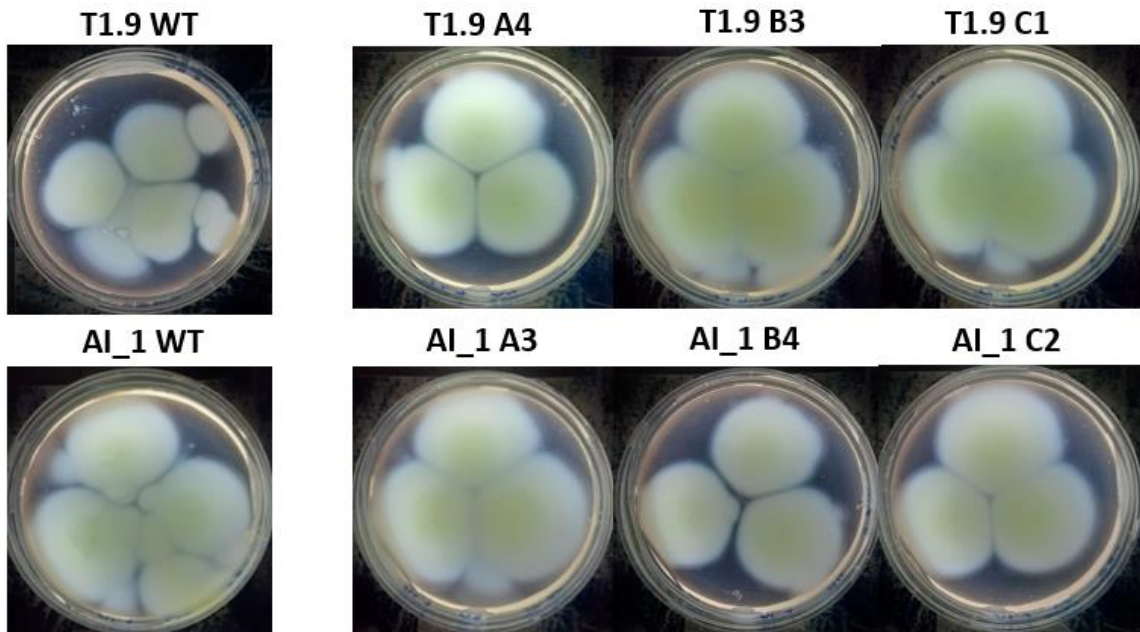


Figura 12: Estudio de motilidad *swimming* de las cepas bacterianas. Cepas bacterianas parentales y resistentes a fagos cultivadas en medio B de King sólido al 0,28%. Cultivadas por 48 horas a 28°C.

A partir de estos resultados se midió, graficó y comparó estadísticamente las medias de los diámetros alcanzados entre las cepas parentales y las variantes resistentes a fagos.

En cuanto a la medición del diámetro transversal máximo de la colonia en *swimming* (figura 12), tanto para la cepa AI_1 como para T1.9 las variantes bacterianas resistentes a fagos (A, B y C) en promedio presentaron un diámetro entre 0,22 y 0,65 cm mayor que la cepa parental. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa para AI_1. En cambio, para T1.9 sí hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la cepa parental y las tres variantes resistentes. La media de extensión de colonia de las bacterias resistentes a cada fago resultó entre 0,46 y 0,65 cm mayor que la media de la cepa parental (figura 13).

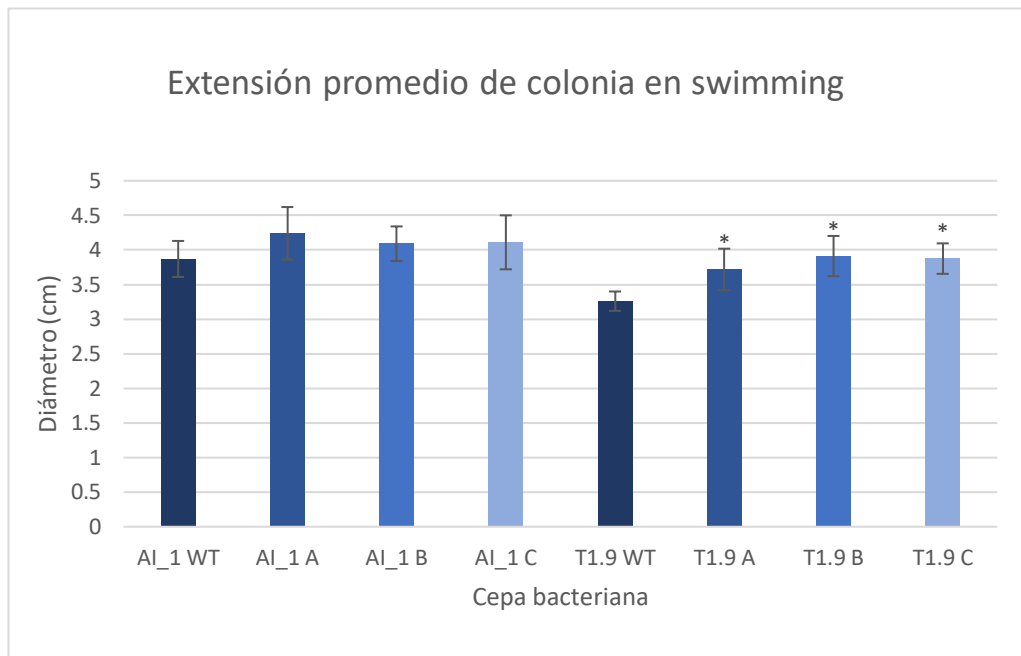


Figura 13: Gráfico de la extensión promedio de la colonia alcanzada en *swimming* para cada tratamiento. Se muestran las medias y las desviaciones estándar de ocho experimentos con triplicado, donde WT: silvestre; A: resistentes a Fago6; B: resistentes a Fago12 y C: resistentes a Fago18. Las cepas marcadas con (*) son significativamente diferentes de su cepa parental ($p < 0.05$).

Por otra parte, en la figura 14 se muestran las colonias obtenidas luego de 48 h de cultivo para *swarming*. Se añadieron 3 microgotas de cultivo bacteriano por placa y para cuantificar el desplazamiento se midió el diámetro máximo de la extensión de la colonia.

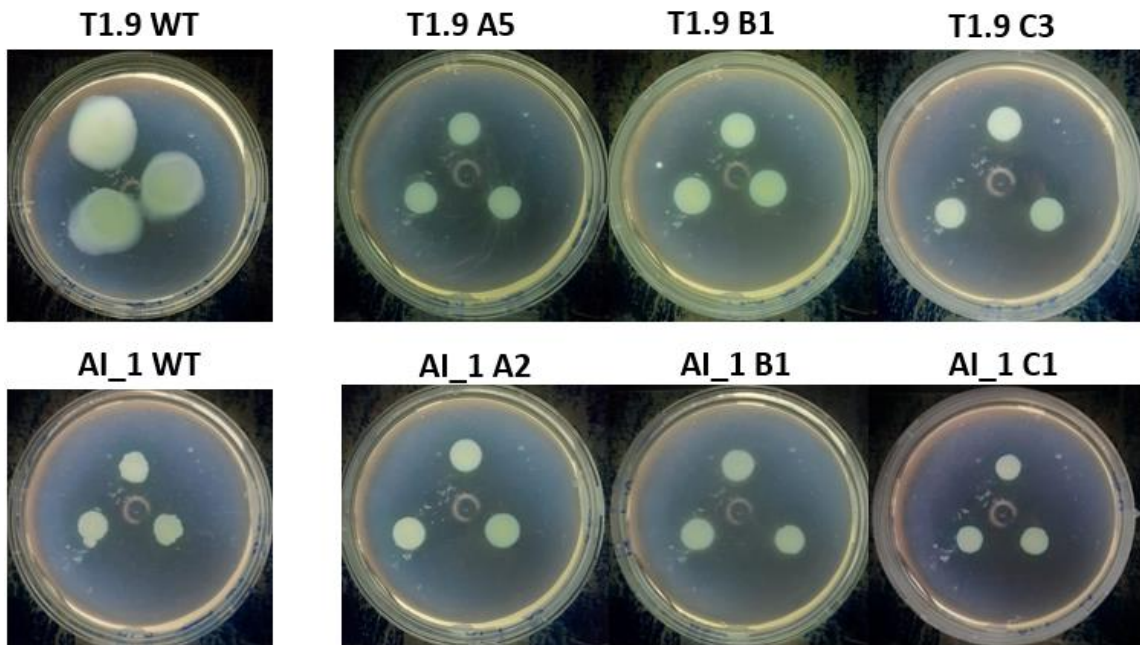


Figura 14: Estudio de motilidad *swarming* de las cepas bacterianas. Cepas bacterianas parentales y resistentes a fagos cultivadas en medio B de King sólido al 0,5%. Cultivadas por 48 horas a 28°C.

En el estudio de *swarming* (Figura 14), la cepa parental AI_1 en comparación con cada una de las variantes resistentes (A, B y C) aumentó entre 0,05 y 0,09 cm la distancia de nado superficial, pero estadísticamente no hubo diferencias significativas en ninguno de los casos. Por otra parte, para la cepa parental T1.9 en comparación con cada una de las variantes resistentes (A, B y C), se observó una disminución de los diámetros de entre 1,35 y 1,16 cm, las cuales fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El diámetro de nado superficial promedio de las bacterias resistentes a fagos de cada tratamiento disminuyó a la mitad, en comparación a la cepa parental (figura 15).

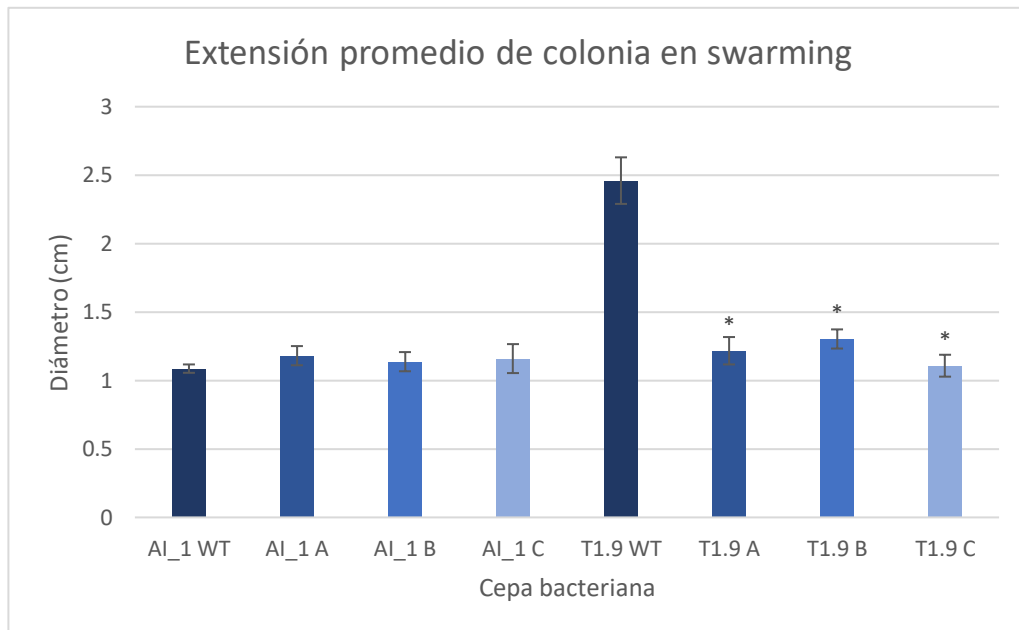


Figura 15: Gráfico de la extensión promedio de la colonia alcanzada en *swarming* para cada tratamiento. Se muestran las medias y las desviaciones estándar de ocho experimentos con triplicado, donde WT: silvestre; A: resistentes a Fago6; B: resistentes a Fago12 y C: resistentes a Fago18. Las cepas marcadas con (*) son significativamente diferentes de su cepa parental ($p < 0.05$).

En conclusión, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre la extensión promedio alcanzada por la cepa bacteriana AI_1 y sus variantes resistentes a fagos (A, B y C) ni para *swimming* ni para *swarming*. Mientras que para la cepa bacteriana T1.9 existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la extensión promedio alcanzada en los distintos tratamientos para ambos tipos de nado. En el caso de *swimming*, las variantes resistentes a fagos aumentaron su distancia de nado entre un 14% y 20% en comparación a la cepa control. En cambio, para *swarming* las variantes resistentes disminuyeron su distancia de nado superficial entre un 45% y 53%.

4.7 Estudio tolerancia a cobre *Pseudomonas* spp. parentales y variantes resistentes a fagos

La tolerancia a cobre de las cepas *Pseudomonas* parentales AI_1 y T1.9, y de sus

variantes resistentes a fagos fueron evaluadas en las concentraciones finales de CuSO_4 de 0; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 o 3,5 mM. Para ello se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a través de su crecimiento en medio líquido. Se definió CMI como el punto donde la DO_{600} del cultivo bacteriano a las 24h y 48h de cultivo fue igual o menor que a las 0h.

El crecimiento bacteriano ocurrió para todas las cepas (parentales y variantes resistentes a fagos) a las 24h y 48h, para todas las concentraciones de CuSO_4 . No hubo una concentración mínima inhibitoria de crecimiento en este estudio, solo diferencias en el crecimiento para las concentraciones mayores de CuSO_4 (3 y 3,5 mM). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a las 48 h de cultivo en la concentración 3,5 mM de CuSO_4 para todas las cepas resistentes a fagos derivadas de T1.9, y sólo para las variantes resistentes C de AI_1, estos resultados fueron graficados y se muestran en la figura 16.

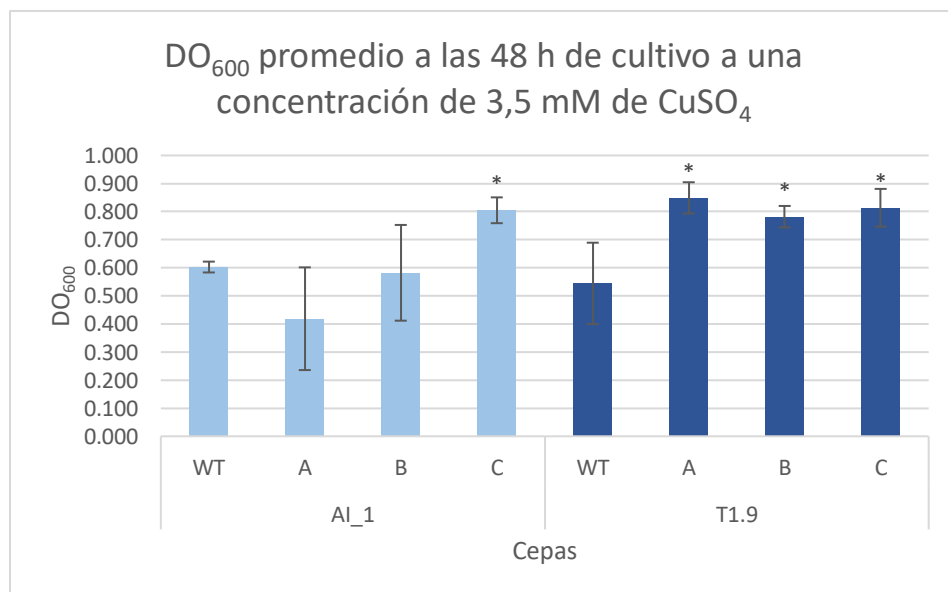


Figura 16: Tolerancia a cobre de cepas parentales y resistentes a fagos. Gráfico de la DO_{600} promedio alcanzada a las 48 h de cultivo a una concentración de 3,5 mM de CuSO_4 . Se muestran los resultados de ocho experimentos con triplicado, donde WT: parental; A: resistentes a fago 6; B: resistentes a fago 12 y C: resistentes a fago 18. Las cepas marcadas con (*) son significativamente diferentes de su cepa parental ($p < 0,05$).

De la figura 16 se observó que tanto las cepas parentales como las cepas variantes resistentes resultaron tolerantes a concentraciones de cobre superiores a 3,5 mM, puesto que tuvieron densidades ópticas mayores a 0,5. Para la cepa parental AI_1 se observó que las variantes resistentes a fagos A y B en promedio redujeron su crecimiento en 30,5% y 3,4% respectivamente, lo que no resultó estadísticamente significativo. Mientras que la variante resistente C superó en promedio un 33,5%.

Por otro lado, para la cepa parental T1.9 se observó que las variantes resistentes a fagos A, B y C en promedio de crecimiento superaron en 56%, 43,6% y 49,5% respectivamente. Dado que estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,05$), la adquisición de resistencia a fagos por parte de las bacterias derivadas pudo afectar notablemente la capacidad de tolerar cobre por parte de estas cepas.

5. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

Las enfermedades bacterianas en plantas de cultivos agrícolas significan grandes pérdidas económicas. La prevalencia de estas enfermedades en el campo indica que los agroquímicos empleados para su control no son efectivos. Mas aún, se han reportado cepas resistentes y multirresistentes a estos (Fatmi y col., 2008; Scheck y col., 1996). Por otra parte, en agricultura se han enfocado este tipo de estudios en bacterias fitopatógenas principalmente, dejando en segundo plano el efecto sobre las bacterias inocuas ambientales asociadas a estos tipos de cultivos.

La pérdida de eficiencia de agroquímicos bactericidas ha sido la principal razón del desarrollo de nuevas alternativas para control de bacterias fitopatógenas, donde la fagoterapia surge como una alternativa prometedora. Sin embargo, el fenómeno de cambios en factores de virulencia para bacterias fitopatógenas que han adquirido resistencia a bacteriófagos ha sido poco estudiado (Koskella y col., 2011; Oechslin, 2018). En este trabajo se estudió el efecto en la motilidad y la tolerancia a cobre del desarrollo de resistencia a bacteriófagos en cepas ambientales de *Pseudomonas*. Además, se analizó la diversidad de aislados nacionales de *Pseudomonas* ambientales y su resistencia fenotípica a agroquímicos.

5.1 Caracterización de bacterias

La diversidad de las *Pseudomonas* ambientales aisladas fue analizada mediante *MLSA*, utilizando cinco genes *housekeeping* (16S ARNr, *acn*, *cts*, *pgi* y *rpoD*). Como resultado se distinguieron cinco filogrupos (Figura 5), sin embargo, las cepas no son diversas puesto que son cercanas filogenéticamente, sus similitudes genéticas de distancias fluctúan entre 0,01 y 0,08 (Ver anexos II y III). Por otra parte, no se pudo establecer una

correlación entre la localidad de aislamiento y el filogrupo puesto que las cepas de distintos orígenes geográficos se agruparon juntas.

Dado que *cts* fue uno de los genes que confirió menor diversidad se analizó como un posible predictor de clasificación de cepas de *Pseudomonas* spp. Se utilizaron las secuencias del gen *housekeeping cts* de las 19 cepas y las cepas de referencia de la tabla 5 para determinar la especie bacteriana y se construyó un cladograma a partir de su alineamiento. Se formaron cinco filogrupos, aquellas cepas con un porcentaje de similitud mayor o igual al 96% se consideraron del mismo grupo filogenético de la cepa de referencia, mientras que aquellas que presentan un porcentaje mayor o igual a 98,2% de similitud se consideraron dentro del mismo clado (Berge y col., 2014). En base a esta clasificación siete cepas se agrupan con *P. fluorescens* y tres con *P. viridiflava*. De las nueve cepas restantes, cinco se encuentran dentro del filogrupo de *P. fluorescens* mientras que las otras cuatro no pudieron clasificarse con esta metodología.

Todas las cepas de referencia del filogrupo 3 pertenecen al complejo filogenético de *Pseudomonas syringae* (Berge y col., 2014), por lo que el agrupamiento es coherente. Sin embargo, en el filogrupo 2 existió una incongruencia en la posición de la cepa de referencia *P. syringae ibn918*, la cual no se agrupó con las otras dos cepas de referencia de la misma especie. Es posible que los genes *housekeeping* utilizados de la cepa *P. syringae ibn918* sean genéticamente cercanos a la especie *P. fluorescens*, incluso para el gen *cts* existe un 100% de coincidencia con *P. fluorescens* YK-310 (Número de acceso: CP071797) utilizando la herramienta BLAST, además de consigo misma. Posiblemente, *P. syringae ibn918* no es una cepa de referencia esclarecedora.

Entonces, no se puede afirmar que el gen *cts* sea un buen predictor de afiliación para

Pseudomonas spp. En un estudio previo se realizó *MLSA* utilizando la secuencia parcial del gen 16S ARNr y otros genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD* y *rpoB*) (Garrido-Sanz y col., 2016). En dicho análisis fue posible clasificar cepas pertenecientes al complejo *P. syringae* y *P. fluorescens* robustamente. En base este antecedente, podrían utilizarse dichos genes *housekeeping* para clasificar a las 19 *Pseudomonas* ambientales de este trabajo.

Por otra parte, podrían añadirse más cepas de referencia, y también evaluar la posibilidad de que se hayan aislado cepas de nuevas especies, como es el caso de T1.9 la cual para el gen *cts* no tiene un porcentaje considerable de similitud con alguna cepa bacteriana en la base de datos de NCBI, la especie más cercana corresponde a *Pseudomonas graminis* con un 92% de similitud, lo cual no es suficiente para clasificarla y, sin embargo, es virulenta porque genera reacción de hipersensibilidad en tabaco como se describió en una caracterización previa (Resultados no publicados del Proyecto Fondecyt Postdoctorado N°3180500).

Cabe mencionar, que no hay estudios preliminares que analicen la diversidad de *Pseudomonas* utilizando los cinco genes *housekeeping* de este estudio, con cepas de origen chileno que a su vez son resistentes a agroquímicos. Generalmente se han realizado con cepas provenientes principalmente de Europa y Norte América (Cai y col., 2011), por lo que estos resultados serían los primeros en Chile para *Pseudomonas* spp. asociadas a cultivos de tomate y se deben seguir haciendo análisis genéticos con más cepas de la región. Esto último para clasificar robustamente nuevas cepas de dicho género, para determinar si las diferencias genéticas influyen en la patogenicidad de estas bacterias.

Por otra parte, aun cuando las 19 cepas de estudio fueron aisladas desde muestras de tejido de tomate con signos de enfermedad, no se encontraron ejemplares de *Pst*. Sin embargo, se han reportado cepas de *P. viridiflava* patógenas (CABI, 2020) y *P. fluorescens* patógenas oportunistas de plantas de tomate que provocan síntomas similares a *Pst* y *P. corrugata* (Dimartino y col., 2011; Molan y Ibrahim, 2007; Pekhtereva y col., 2009). Por lo que estos resultados son congruentes con lo descrito en la literatura. Se debe continuar haciendo estudios genéticos y quizás proponer nuevas cepas de referencia, especialmente para Sudamérica o Chile, regiones en las que hay escasos reportes genéticos de *Pseudomonas* spp. (Cai y col, 2011) . Por ejemplo, en el caso de *Pst DC3000*, cepa modelo de *P. syringae* pv. *tomato*, de origen estadounidense y otras *Pst* de distintos puntos geográficos se han reportado considerables diferencias genéticas, tanto que incluso Yan y col., 2008 han planteado la posibilidad dividir el patovar en dos grupos.

Por último, se estudió la tolerancia de las 19 cepas seleccionadas a cobre y estreptomycinina, obteniendo un 79% de cepas resistentes a ambos. El 42,1% de las cepas resultó ser altamente resistente a estreptomycinina (CMI ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$), y correspondieron a ocho cepas que se agruparon en el grupo 2 (dos cepas) y casi en su totalidad en el filogrupo 1 (seis cepas) de la figura 5. Estas observaciones son preocupantes puesto que demuestran que existen *Pseudomonas* ambientales resistentes a cobre y estreptomycinina en Chile, algunas de ellas patogénicas, probablemente provocado por el uso intensivo y fuera de las cantidades recomendadas de agroquímicos (INIA, 2015). Es alarmante puesto que se ha reportado que las bacterias de distintas especies transfieren sus genes de resistencia a cobre y estreptomycinina entre ellas (Bender y Cooksey, 1987; Lamichhane y col., 2018; Walsh, 2000). De esta forma, pueden actuar como reservorio

de dichos genes, no solo para fitopatógenos, sino que también se ha propuesto para patógenos humanos (Jensen y col., 2001; Morris y col., 2007). Por ello es importante continuar con este tipo de estudios, añadiendo otras especies bacterianas del suelo agrícola para dimensionar la expansión de la resistencia bacteriana a antibióticos. Podrían evaluarse antibióticos comúnmente utilizados en humanos puesto que se ha reportado la presencia de *Pseudomonas* en cultivos agrícolas resistentes a estos (Hwang y col., 2005), y si está ocurriendo una transferencia de genes de resistencia entre ellas.

5.2 Caracterización de bacteriófagos

Adicionalmente en este estudio, se procedió a caracterizar de forma clásica y molecular a tres cepas de bacteriófagos aislados desde aguas servidas capaces de infectar cepas de *Pseudomonas*. Los tres fagos presentaron un rango de hospedero distinto y genoma ADN doble hebra. Esto último, junto con la forma icosaédrica de la cápside con o sin cola (figura 9) del Fago12 y Fago18 se clasificaron dentro de la familia *Podoviridae*, como se describe en Ackermann,(2009) (Tabla 1). El conjunto de resultados de rango de hospedero, naturaleza del genoma y morfología, según la clasificación histórica indican que los tres fagos estudiados son distintos, sin embargo en la actualidad se deben secuenciar sus genomas para corroborarlo (Dion y col., 2020).

Actualmente, la secuenciación de los genomas es imprescindible para confirmar naturaleza vírica, analizar su trayectoria evolutiva, características de sus proteínas y clasificarlos apropiadamente (Bolduc y col., 2017; Cesar Ignacio-Espinoza y col., 2013). Sumado, a que se puede evaluar su potencialidad como biocontroladores, para ello se busca la ausencia de genes de resistencia, de toxinas o genes de lisogenia (Gill y

Hyman, 2010).

5.3 *Pseudomonas* resistentes a fagos

Se seleccionaron dos cepas bacterianas caracterizadas que fueron susceptibles a los tres fagos en estudio, y que generaron variantes resistentes a estos. Se observó que el porcentaje de resistencia alcanzado por la cepa T1.9 fue de entre 12% y 60%, para las variantes generadas expuestas a los fagos, que fue considerablemente mayor al determinado por la cepa AI_1 (entre 0,002% y 0,26%). Es decir, la cepa T1.9 presentó una mayor resistencia a fagos que la cepa AI_1. Dicha respuesta, puede deberse a la naturaleza genética de la bacteria como concluye Koskella y col., (2011) y se ha observado en bacterias patógenas de células animales (Oechslin, 2018). Un ejemplo de esto fue reportado por Lennon y col., 2007 para cianobacterias marinas (*Synechococcus*), construyeron un perfil de amplitud de resistencia a virus genéticamente diferentes y obtuvieron que la tasa de susceptibilidad y resistencia a los virus variaba entre las distintas cepas bacterianas. Dichos perfiles se mantuvieron estables durante un periodo de 12 meses y descubrieron que la magnitud de los costos de resistencia a fagos que presentaban las cepas bacterianas variaban según la identidad del virus utilizado.

Para saber si la adquisición de resistencia a fagos por parte de las dos cepas de *Pseudomonas* seleccionadas generaban cambios funcionales, se estudió su motilidad y tolerancia a cobre. La motilidad corresponde a un factor de virulencia importante para la infección del hospedero, mientras que la tolerancia cobre es una característica que puede afectar el *fitness* de las bacterias (Ladomersky y Petris, 2015). Se utilizaron

microorganismos ambientales para estudiar eventos que podrían ocurrir en la naturaleza. Este enfoque permite la caracterización directa de la diversidad fenotípica en poblaciones naturales de microorganismos, pero puede ser difícil de interpretar porque los aislamientos de bacterias suelen presentar numerosas diferencias genéticas entre ellas, lo mismo ocurre con los aislados de fagos (Koskella y col., 2011).

En cuanto a la motilidad, *Pseudomonas* para desplazarse e infectar a su hospedero utiliza diferentes tipos de nado. En este estudio se analizaron los nados *swimming* y *swarming*, los cuales son dependientes de la rotación del flagelo. El primero corresponde a un movimiento individual en medio líquido mientras que el segundo corresponde a una translocación rápida y coordinada de una población bacteriana a través de una superficie sólida o semisólida (Kearns, 2010). Se observaron diferencias en el desplazamiento de *Pseudomonas* entre los dos tipos de nado. Para todas las cepas (parentales y resistentes a fagos) en *swimming* se observó un patrón de desplazamiento radial y uniforme, mientras que en *swarming* se observaron zonas de desplazamiento discretas, lo cual se condice con la literatura (Clarke y col., 2016)

Para la cepa T1.9 en el caso de *swimming*, las cepas resistentes a fagos de cada tratamiento aumentaron su distancia promedio de nado entre 14% y 20% en comparación a la cepa parental. En cambio, en *swarming* las variantes resistentes de cada condición disminuyeron su distancia de nado superficial entre un 45% y 53%. Para las cepas derivadas de AI_1 no hubo cambios estadísticamente significativos en ninguno de los dos tipos de nado.

Estos resultados indican que la adquisición de resistencia a bacteriófagos puede afectar la motilidad de las bacterias resistentes, ya sea de forma negativa o positiva, ambas

maneras han sido reportadas con anterioridad para bacterias que infectan células animales (Icho y Iino, 1978; Koskella y col., 2011), pero no para fitopatógenos. En el caso de la cepa T1.9, un mayor desplazamiento en *swimming* es positivo, mientras que el menor desplazamiento *swarming* es negativo. Las cepas bacterianas tendrían ventaja al desplazarse de forma individual, pero desventaja al desplazarse de manera grupal y coordinada. Entonces, posiblemente el mecanismo que contrarrestó la susceptibilidad a bacteriófagos para esta cepa está interfiriendo con el flagelo y/o pili y dicha coordinación.

Por la literatura los factores de virulencia de motilidad que actúan como receptores de fagos pueden perderse, disminuir su expresión o mutar. Los primeros dos casos corresponden a cambios transitorios mediados por *quorum sensing* mientras que el último es un cambio permanente y heredable (van Houte y col., 2016). Dado que hubo desplazamiento de las bacterias resistentes a fagos para *swimming*, el flagelo no se perdió. Por otra parte, en poblaciones naturales de bacterias es común las mutaciones de receptores de membranas, siendo una respuesta favorable como mecanismo de resistencia (Seed y col., 2014), y puesto que se comprobó que las colonias seleccionadas eran efectivamente resistentes a fagos una vez que se encontraban sin presión selectiva (Figura 10), lo más probable es que haya ocurrido una mutación en el receptor, en este caso el flagelo y/o pili.

Los bacteriófagos utilizan diversos receptores presentes en la bacteria al momento de infección (adsorción). Los fagos de estudio podrían utilizar alguno que no esté involucrado con motilidad (caso de AI_1). Tal como se ha descrito para otros fagos que poseen más de una vía de entrada y que incluso poseen un orden preferencias entre estas (Doore y col., 2019)

Otra característica estudiada que afecta al *fitness* bacteriano fue la tolerancia a cobre. El cobre es un elemento citotóxico por lo que ha sido ampliamente utilizado como bactericida en la agricultura. Su citotoxicidad es el resultado de la formación de radicales libres a través de reacciones de tipo Fenton y/o por oxidación de grupos sulfhidrilo. Estos intermediarios reactivos pueden causar daño al ADN, degradar lípidos y alterar la función proteica normal lo que conduce a la muerte celular (Dupont y col., 2011). Sin embargo, las bacterias poseen naturalmente mecanismos para contrarrestarlo, y cada vez surgen más cepas tolerantes a cobre. Este hecho, se explicaría a la selección progresiva de cepas tolerantes por el exceso de su uso en el campo, lo cual permite la persistencia de las enfermedades vegetales causadas por bacterias. Diversos estudios han demostrado la tolerancia de cepas de *Pseudomonas* a cobre en todo el mundo (Griffin y col., 2017).

Las bacterias parentales y sus derivadas resistentes a fagos crecieron hasta una concentración de 3,5 mM de CuSO_4 (228,2 $\mu\text{g/ml}$ de Cu^{+2}). En la literatura se han descrito cepas del género *Pseudomonas* que crecen a una concentración de hasta 4,5 mM de CuSO_4 (293,4 $\mu\text{g/ml}$ de Cu^{+2}) (Goto y col., 1994) y en Chile, bacterias de otros géneros que crecen hasta concentraciones de 306,4 $\mu\text{g/ml}$ de Cu^{+2} (Altimira y col., 2012). Además, en el campo suelen utilizarse concentraciones de 8mM CuSO_4 de por hectárea (521,6 $\mu\text{g/ml}$ de Cu^{+2}) (SAG, 2020), por ende, el resultado concuerda con lo descrito en estudios previos.

Por otra parte, se ha reportado que la incidencia de *Pseudomonas* ambientales tolerantes a cobre es bastante alta (78,5%) (Griffin y col., 2017), por lo tanto que ambas cepas parentales fueran tolerantes a cobre era probable. Existieron diferencias estadísticamente significativas en el promedio de la DO_{600} alcanzada a las 48 h de cultivo, es decir, hubo una disimilitud en cuanto al crecimiento de las cepas. Para las

cepas resistentes a fagos derivadas de T1.9 el crecimiento fue mayor, al igual que para las cepas C de AI_1. En cambio, para las cepas AI_1 A y B el crecimiento promedio fue menor, sin embargo, no resultó estadísticamente significativo. Dicha distinción ocurrió en la mayor concentración estudiada (3,5 mM de CuSO₄). Por lo tanto, se debe determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para saber si existe una diferencia de tolerancia a cobre en las cepas resistentes a fagos. Para ello, estudios futuros se deben realizar que permitan determinar las concentraciones mínimas inhibitorias a CuSO₄, así como estudios genómicos para la identificación de los mecanismos que se modificaron en la tolerancia a cobre.

La diferencia de crecimiento de las cepas pudo deberse a que los fagos utilicen receptores como transportadores transmembrana de cobre o bombas de eflujo (Solioz, 2018), que en las bacterias al generar resistencia mutaron afectando la tolerancia a cobre.

En resumen, T1.9 fue la cepa que presentó más costos de compensación al adquirir resistencia a bacteriófagos, las variantes A, B y C presentaron cambios en los dos tipos de nado y en el crecimiento a 3,5 mM de CuSO₄ en comparación a la cepa parental. Además, presentó una alta razón de resistencia a fagos, entre un 12% y 26%. Por lo que, se podría concluir que esta cepa tiende a adaptarse cuando se enfrenta a este tipo de patógeno, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Lennon y col., 2007), a diferencia de la cepa AI_1.

Se hace necesario estudiar la respuesta de más cepas de *Pseudomonas* spp. que adquieren resistencia a fagos y evaluar más factores de virulencia. Añadiendo el estudio de la virulencia de las cepas resistentes a fagos *in vivo* en plantas de tomate, para así

determinar si en general las cepas bacterianas ven afectado su *fitness* y su capacidad infectiva al adquirir dicha resistencia. Este escenario, sería un buen antecedente para la fagoterapia vegetal, puesto que aquellas bacterias que desarrollaran resistencia a fagos podrían ser menos virulentas. De esta forma, también se contralaría la enfermedad debido a la interacción bacteria-fago, puesto que se favorecería poblaciones menos virulentas, como se ha reportado para variantes resistentes a fagos en bacterias patógenas humanas (Fuhrman y Schwalbach, 2003; Koskella y col., 2011). Esto último no es un fenómeno que se considere generalizado, por lo cual es necesario seguir investigando.

Finalmente, la adquisición de resistencia a bacteriófagos en *Pseudomonas* puede o no afectar características bacterianas relacionadas con la virulencia, y dicho cambio puede ser positivo o negativo para las bacterias, tal como se ha reportado en bacterias que infectan células animales (Koskella y col., 2011; van Houte y col., 2016) . En este estudio, la motilidad de las bacterias resistentes a fagos para las cepas derivadas de T1.9 se vio afectada, y dicha alteración fue ventajosa para *swimming* y desventajosa para *swarming*. Por otra parte, la resistencia a fagos puede o no afectar otras características en la misma cepa, como la tolerancia a cobre.

Este trabajo es uno de los primeros en analizar la diversidad genética de *Pseudomonas* spp. patógenas y no patógenas asociadas a tomate en Chile y cómo las características de dichas bacterias ambientales cambian cuando adquieren resistencia a fagos. Es un tema importante para la fitopatología y el contexto actual. En primera instancia se hace necesario conocer la diversidad genética tanto de las *Pseudomonas* presentes en Chile como de los bacteriófagos. Segundo, investigar cómo se relacionan los fitopatógenos con las partículas virales, si existen marcadores genéticos que establezcan su

susceptibilidad. Tercero, determinar la extensión de la presencia de cepas *Pseudomonas* resistentes a cobre y a otros agroquímicos en el territorio nacional como un posible reservorio de genes de resistencias. Por último, estudiar los cambios en la virulencia *in planta* y en el *fitness* de un mayor número de *Pseudomonas* ambientales que adquieren resistencia a fagos. De esta forma podrán desarrollarse mejores estrategias para su control.

6. CONCLUSIONES

- El análisis de secuencias de genes *housekeeping* conformó cinco filogrupos, que fueron las mismas agrupaciones resultantes por el estudio individual del gen *cts*. Son necesarios más estudios genéticos con otros genes *housekeeping*, que incluyan más cepas de referencia para clasificar con robustez las 19 cepas de *Pseudomonas* spp. de este estudio.
- Cepas de *Pseudomonas* aisladas desde huertos de tomates en Chile presentaron multitolerancia a cobre y estreptomina. Estos resultados constituyen un antecedente de un problema a nivel país, dado que estos campos podrían eventualmente ser un reservorio de genes de resistencia. Por esta razón se hace fundamental estudiar su distribución en el territorio nacional y evaluar su tolerancia a otros agroquímicos como un reservorio de genes de resistencia.
- El porcentaje de resistencia a fagos varió entre las cepas hospederas estudiadas y también su respuesta fenotípica al adquirir resistencia. La cepa T1.9 tuvo una mayor capacidad de resistencia a la infección de fagos comparativamente que AI_1.
- La adquisición de resistencia a bacteriófagos indujo cambios en la motilidad de las variantes *Pseudomonas* de T1.9, este cambio puede ser ventajoso o desventajoso. En este estudio se concluyó que al menos una de las estructuras celulares afectadas fue el flagelo y/o el pili.
- La adquisición de resistencia a fagos provocó un cambio en una mayor tolerancia a cobre en al menos cuatro de las variantes de *Pseudomonas* resistentes, lo que se reflejó en diferencias en el crecimiento de estas cepas a la más alta concentración de estudio.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, H.-W. (2009). Phage Classification and Characterization. In *Methods in molecular biology* (pp. 127–140). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13
- Adriaenssens, E. M., & Rodney Brister, J. (2017). How to name and classify your phage: An informal guide. *Viruses*, *9*(4), 1–9. <https://doi.org/10.3390/v9040070>
- Alonso, M. D. C., Rodríguez, J., & Borrego, J. J. (2002). Characterization of marine bacteriophages isolated from the Alboran Sea (Western Mediterranean). *Journal of Plankton Research*, *24*(10), 1079–1087. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.10.1079>
- Altimira, F., Yáñez, C., Bravo, G., González, M., Rojas, L. A., & Seeger, M. (2012). Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-193>
- Argerich, C., Troilo, L., Fazzone, M. R., Izquierdo, J., Strassera, M. E., Balcaza, L., Santo, S. D., Miranda, O., Rivero, M. L., Castro, G. G., & Iribarren, M. J. (2013). Manual de Buenas prácticas Agrícolas en la cadena de tomate. *Fao*, 1–258.
- Arnold, D. L., & Preston, G. M. (2019). *Pseudomonas syringae*: Enterprising epiphyte and stealthy parasite. *Microbiology (United Kingdom)*, *165*(3), 251–253. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000715>
- Balogh, B., Jones, J., Iriarte, F., & Momol, M. (2010). Phage Therapy for Plant Disease Control. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *11*(1), 48–57. <https://doi.org/10.2174/138920110790725302>
- Baquero, D. P., Contursi, P., Piochi, M., Bartolucci, S., Liu, Y., Cvirkaite-Krupovic, V., Prangishvili, D., & Krupovic, M. (2020). New virus isolates from Italian hydrothermal environments underscore the biogeographic pattern in archaeal virus communities. *ISME Journal*, *14*(7), 1821–1833. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0653-z>
- Basim, H., Basim, E., Yilmaz, S., Dickstein, E. R., & Jones, J. B. (2004). An Outbreak of Bacterial Speck Caused by *Pseudomonas syringae* pv. tomato on Tomato Transplants Grown in Commercial Seedling Companies Located in the Western Mediterranean Region of Turkey. *Plant Disease*, *88*(9), 1050–1050. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.9.1050A>
- Bender, C. L., & Cooksey, D. A. (1986). Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. tomato: conjugative transfer and role in copper resistance. *Journal of Bacteriology*, *165*(2), 534–541. <https://doi.org/10.1128/jb.165.2.534-541.1986>
- Bender, C. L., & Cooksey, D. A. (1987). Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Journal of Bacteriology*, *169*(2), 470–474. <https://doi.org/10.1128/JB.169.2.470-474.1987>
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., & Morris, C. E. (2014). A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS ONE*, *9*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105547>
- Bertozzi Silva, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters*, *363*(4), fnw002. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
- Bolduc, B., Jang, H. Bin, Doulcier, G., You, Z.-Q., Roux, S., & Sullivan, M. B. (2017). vConTACT: an iVirus tool to classify double-stranded DNA viruses that infect Archaea and Bacteria. *PeerJ*, *5*, e3243. <https://doi.org/10.7717/peerj.3243>
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M. J., Haft, D. H., Nelson, W. C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., ... Collmer, A. (2003). The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(18), 10181–10186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1731982100>
- Burmeister, A. R., & Turner, P. E. (2020). Trading-off and trading-up in the world of bacteria–

- phage evolution. *Current Biology*, 30(19), R1120–R1124.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.036>
- CABI. (2020). *Pseudomonas viridiflava* (bacterial leaf blight of tomato).
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/45024>
- Cai, R., Lewis, J., Yan, S., Liu, H., Clarke, C. R., Campanile, F., Almeida, N. F., Studholme, D. J., Lindeberg, M., Schneider, D., Zaccardelli, M., Setubal, J. C., Morales-Lizcano, N. P., Bernal, A., Coaker, G., Baker, C., Bender, C. L., Leman, S., & Vinatzer, B. A. (2011). The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity. *PLoS Pathogens*, 7(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002130>
- Cesar Ignacio-Espinoza, J., Solonenko, S. A., & Sullivan, M. B. (2013). The global virome: not as big as we thought? *Current Opinion in Virology*, 3(5), 566–571.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.07.004>
- Cha, J. S., & Cooksey, D. A. (1993). Copper Hypersensitivity and Uptake in *Pseudomonas syringae* Containing Cloned Components of the Copper Resistance Operon. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5), 1671–1674. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.5.1671-1674.1993>
- Chan, B. K., Siström, M., Wertz, J. E., Kortright, K. E., Narayan, D., & Turner, P. E. (2016). Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 6(May), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep26717>
- Clarke, C. R., Hayes, B. W., Runde, B. J., Markel, E., Swingle, B. M., & Vinatzer, B. A. (2016). Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* reveals novel chemotaxis pathways associated with motility and plant pathogenicity. *PeerJ*, 2016(10), 1–24. <https://doi.org/10.7717/peerj.2570>
- Cody, Y. S., & Gross, D. C. (1987). Characterization of pyoverdinin (pss), the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(5), 928–934. <https://doi.org/10.1128/aem.53.5.928-934.1987>
- Córdova, P., Vera, F., Quiroz, V., Romero, J., & Higuera, G. (2018). Presencia de bacterias fitopatógenas que afectan cultivos de tomate en Chile: Análisis de susceptibilidad a cobre. In *XXVI Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología, Universidad Austral de Chile*.
- Cuppels, D. A. (1983). Isolation and Characterization of Phages Useful for Identifying *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. In *Phytopathology* (Vol. 73, Issue 10, p. 1376).
<https://doi.org/10.1094/phyto-73-1376>
- Davies, E. V., Winstanley, C., Fothergill, J. L., & James, C. E. (2016). The role of temperate bacteriophages in bacterial infection. *FEMS Microbiology Letters*, 363(5), fnw015.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnw015>
- Dimartino, M., Panebianco, S., Vitale, A., Castello, I., Leonardi, C., Cirvilleri, G., & Polizzi, G. (2011). Occurrence and pathogenicity of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* on tomato plants in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 93(1), 78–87.
<https://doi.org/10.1400/169640>
- Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Dong, C. J., Wang, L. L., Li, Q., & Shang, Q. M. (2019). Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLoS ONE*, 14(11), 1–17.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223847>
- Doore, S. M., Parent, K. N., Subramanian, S., Schrad, J. R., & Hubbs, N. B. (2019). Bacteriophage Receptor Proteins of Gram-Negative Bacteria. In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20952-7>
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., & Berekzi, N. (2017). A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *Viruses*, 9(3), 50. <https://doi.org/10.3390/v9030050>
- Dupont, C. L., Grass, G., & Rensing, C. (2011). Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications. *Metallomics*, 3(11), 1109.
<https://doi.org/10.1039/c1mt00107h>

- Estay, P., & Bruna, A. (2002). *Insectos, ácaros y enfermedades asociadas al tomate en Chile*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile.
- FAO. (2013). *El cultivo de tomate con buenas prácticas agrícolas en la agricultura urbana y periurbana*. <http://www.fao.org/3/a-i3359s.pdf>
- FAOSTAT. (2018). *Crops*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Consultado el 20 de marzo de 2020.
- Fatmi, M., Collmer, A., Iacobellis, N. S., Mansfield, J. W., Murillo, J., Schaad, N. W., & Ullrich, M. (2008). *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6901-7>
- Filloux, A., & Walker, J. M. (2014). *Pseudomonas Methods and Protocols* (A. Filloux & J.-L. Ramos (eds.); Vol. 1149). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0>
- Flores, O., Prince, C., Nuñez, M., Vallejos, A., Mardones, C., Yañez, C., Besoain, X., & Bastías, R. (2018). Genetic and phenotypic characterization of indole-producing isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* obtained from Chilean Kiwifruit Orchards. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01907>
- Fuhrman, J. A., & Schwalbach, M. (2003). Viral Influence on Aquatic Bacterial Communities. *The Biological Bulletin*, 204(2), 192–195. <https://doi.org/10.2307/1543557>
- Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., & Redondo-Nieto, M. (2016). Correction: Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLOS ONE*, 11(4), e0153733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153733>
- Gill, J., & Hyman, P. (2010). Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 2–14. <https://doi.org/10.2174/138920110790725311>
- Goszczynska, T., & Serfontein, J. J. (1998). *Journal of Methods Microbiological*. 32, 65–72.
- Goto, M., Hikota, T., Nakajima, M., Takikawa, Y., & Tsuyumu, S. (1994). Occurrence and Properties of Copper-resistance in Plant Pathogenic Bacteria. *Japanese Journal of Phytopathology*, 60(2), 147–153. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.60.147>
- Griffin, K., Gambley, C., Brown, P., & Li, Y. (2017). Copper-tolerance in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas* spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper. A systematic literature review. *Crop Protection*, 96, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.02.008>
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006>
- Higuera, G., Bastías, R., Tsertsvadze, G., Romero, J., & Espejo, R. T. (2013). Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 392–395, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.013>
- Hwang, M. S. H., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W., & Guttman, D. S. (2005). Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5182–5191. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5182-5191.2005>
- Icho, T., & Iino, T. (1978). Isolation and characterization of motile *Escherichia coli* mutants resistant to bacteriophage chi. *Journal of Bacteriology*, 134(3), 854–860. <https://doi.org/10.1128/JB.134.3.854-860.1978>
- INIA. (2015). *INIA advierte sobre riesgos de excesos de agroquímicos en hortalizas: “En Chile falta fiscalización de lo que llega a la feria o los supermercados.”* <https://www.inia.cl/en/2015/11/02/inia-advierte-sobre-riesgos-de-excesos-de-agroquimicos-en-hortalizas-en-chile-falta-fiscalizacion-de-lo-que-llega-a-la-feria-o-los-supermercados/>
- Jääliñoja, H. (2015). *Electron cryo-microscopy studies of bacteriophage I 8 and archaeal virus SH1* (Issue March).
- Jensen, L. B., Baloda, S., Boye, M., & Aarestrup, F. M. (2001). Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil.

- Environment International*, 26(7–8), 581–587. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00045-9)
- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2008). Bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 245–262. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Keen, E. C. (2012). Phage Therapy: Concept to Cure. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00238>
- Keim, P. (2005). Bacterial Pathogens. In *Microbial Forensics* (pp. 99–107). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012088483-4/50008-1>
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301–307. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:002221435490222X>
- Knowles, A. (2008). Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *Environmentalist*, 28(1), 35–44. <https://doi.org/10.1007/s10669-007-9045-4>
- Koskella, B., Taylor, T. B., Bates, J., & Buckling, A. (2011). Using experimental evolution to explore natural patterns between bacterial motility and resistance to bacteriophages. *ISME Journal*, 5(11), 1809–1817. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.47>
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Ladomersky, E., & Petris, M. J. (2015). Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics*, 7(6), 957–964. <https://doi.org/10.1039/c4mt00327f>
- Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., & Aubertot, J. N. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(3). <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(12), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>
- Lennon, J. T., Khatana, S. A. M., Marston, M. F., & Martiny, J. B. H. (2007). Is there a cost of virus resistance in marine cyanobacteria? *The ISME Journal*, 1(4), 300–312. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.37>
- León, M., & Bastías, R. (2015). Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00343>
- Maki, L. R., Galyan, E. L., Chang-Chien, M. M., & Caldwell, D. R. (1974). Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiology*, 28(3), 456–459. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4371331>
- Matthijs, S., Tehrani, K. A., Laus, G., Jackson, R. W., Cooper, R. M., & Cornelis, P. (2007). Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-Pythium activity. *Environmental Microbiology*, 9(2), 425–434. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01154.x>
- Mattick, J. S. (2002). Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 289–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938>
- Mc Grath, S., & van Sinderen, D. (2007). *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Portland, USA.
- Mohanraju, P., Makarova, K. S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E. V., & van der Oost, J. (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, 353(6299), aad5147. <https://doi.org/10.1126/science.aad5147>
- Molan, Y., & Ibrahim, Y. (2007). First Report of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Pith Necrosis Caused by *Pseudomonas fluorescens* and *P. corrugata* in the Kingdom of Saudi Arabia. *Plant Disease*, 91(1), 110–110. <https://doi.org/10.1094/PD-91-0110B>
- Morris, C. E., Kinkel, L. L., Xiao, K., Prior, P., & Sands, D. C. (2007). Surprising niche for the

- plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.05.002>
- NCBI. (n.d.). *BLAST*. Retrieved September 21, 2020, from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Consultado el 21 de septiembre de 2020.
- Nogales, J., Vargas, P., Farias, G. A., & Olmedilla, A. (2015). FleQ coordinates flagellum-dependent and -independent motilities in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(21), 7533–7545. <https://doi.org/10.1128/AEM.01798-15>. Editor
- ODEPA. (2019). *Estadísticas Productivas*. <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/estadisticas-productivas>. Consultado el 20 de marzo de 2020.
- Oechslin, F. (2018). Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/v10070351>
- Ottesen, A. R., González Peña, A., White, J. R., Pettengill, J. B., Li, C., Allard, S., Rideout, S., Allard, M., Hill, T., Evans, P., Strain, E., Musser, S., Knight, R., & Brown, E. (2013). Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-114>
- Parasion, S., Kwiatek, M., Gryko, R., Mizak, L., & Malm, A. (2014). Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Polish Journal of Microbiology*, 63(2), 137–145. <https://doi.org/10.33073/pjm-2014-019>
- Parte, A. C. (2018). LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(6), 1825–1829. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>
- Pekhtereva, E. S., Kornev, K. P., Matveeva, E. V., Polityko, V. A., Budenkov, N. I., Ignatov, A. N., & Schaad, N. W. (2009). Pith Necrosis Of Tomato in Russia. *Acta Horticulturae*, 808, 251–254. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.808.38>
- Pietilä, M. K., Atanasova, N. S., Oksanen, H. M., & Bamford, D. H. (2013). Modified coat protein forms the flexible spindle-shaped virion of haloarchaeal virus His1. *Environmental Microbiology*, 15(6), 1674–1686. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12030>
- Prangishvili, D., Arnold, H. P., Götz, D., Ziese, U., Holz, I., Kristjansson, J. K., & Zillig, W. (1999). A novel virus family, the Rudoviridae: Structure, virus-host interactions and genome variability of the sulfobolus viruses SIRV1 and SIRV2. *Genetics*, 152(4), 1387–1396.
- RDP. (2016). *RDP 11 Classifier*. <https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>. Consultado el 21 de septiembre de 2020.
- Romantschuk, M., & Bamford, D. H. (1985). Function of Pili in Bacteriophage o6 Penetration. *Journal of General Virology*, 66(11), 2461–2469. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-11-2461>
- SAG. (2020). *Plaguicidas y fertilizantes*. <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/plaguicidas-y-fertilizantes/78/registros>. Consultado el 10 de junio de 2020.
- Samuel, A. D. T., Pitta, T. P., Ryu, W. S., Danese, P. N., Leung, E. C. W., & Berg, H. C. (1999). Flagellar determinants of bacterial sensitivity to chi -phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17), 9863–9866. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9863>
- Sarkar, S. F., & Guttman, D. S. (2004). Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen. *Society*, 70(4), 1999–2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1999>
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (3rd ed.). St. Paul, USA. American Phytopathological Society (APS Press).
- Scheck, H. J., Pscheidt, J. W., & Moore, L. W. (1996). Copper and streptomycin resistance in strains of *Pseudomonas syringae* from Pacific Northwest Nurseries. In *Plant Disease* (Vol. 80, Issue 9, pp. 1034–1039). <https://doi.org/10.1094/PD-80-1034>
- Seed, K. D., Yen, M., Shapiro, B. J., Hilaire, I. J., Charles, R. C., Teng, J. E., Ivers, L. C., Boncy, J., Harris, J. B., & Camilli, A. (2014). Evolutionary consequences of intra-patient phage predation on microbial populations. *ELife*, 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.03497>

- Shasha, S. M., Sharon, N., & Inbar, M. (2004). Bacteriophages as antibacterial agents. *Harefuah*, 143(2), 121–125, 166. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15143702>
- Siegel, S., & Castellan, J. (1988). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Hill Book Company. New York, USA.
- Soliz, M. (2018). *Copper Homeostasis in Gram-Negative Bacteria* (pp. 49–80). https://doi.org/10.1007/978-3-319-94439-5_4
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>
- Sundin, G. W., & Bender, C. L. (1993). Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1018–1024. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.4.1018-1024.1993>
- Sundin, G. W., & Bender, C. L. (1995). Expression of the strA-strB streptomycin resistance genes in *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* and characterization of IS6100 in *X. campestris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2891–2897. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.8.2891-2897.1995>
- Thomas, R. C. (1935). A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn. *Phytopathology*, 25, 371.372.
- Tian, B., Zhang, C., Ye, Y., Wen, J., Wu, Y., Wang, H., Li, H., Cai, S., Cai, W., Cheng, Z., Lei, S., Ma, R., Lu, C., Cao, Y., Xu, X., & Zhang, K. (2017). Beneficial traits of bacterial endophytes belonging to the core communities of the tomato root microbiome. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 247(2), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.041>
- Valenzuela, M., Méndez, V., Montenegro, I., Besoain, X., & Seeger, M. (2019). Streptomycin resistance in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from Chile is related to an rpsL gene mutation. *Plant Pathology*, 68(3), 426–433. <https://doi.org/10.1111/ppa.12971>
- van Charante, F., Holtappels, D., Blasdel, B., & Burrowes, B. (2019). Isolation of Bacteriophages. In *Bacteriophages* (pp. 1–32). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_14-1
- Van de Peer, Y., & Salemi, M. (2012). Phylogenetic inference based on distance methods. In P. Lemey, M. Salemi, & A.-M. Vandamme (Eds.), *The Phylogenetic Handbook* (pp. 142–180). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511819049.007>
- van Houte, S., Buckling, A., & Westra, E. R. (2016). Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 745–763. <https://doi.org/10.1128/mubr.00011-16>
- Voloudakis, A. E., Bender, C. L., & Cooksey, D. A. (1993). Similarity between Copper Resistance Genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5), 1627–1634. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.5.1627-1634.1993>
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797), 775–781. <https://doi.org/10.1038/35021219>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wichels, A., Biel, S. S., Gelderblom, H. R., Brinkhoff, T., Muyzer, G., & Schütt, C. (1998). Bacteriophage diversity in the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4128–4133. <https://doi.org/10.1128/aem.64.11.4128-4133.1998>
- Wirth, J. F., Snyder, J. C., Hochstein, R. A., Ortmann, A. C., Willits, D. A., Douglas, T., & Young, M. J. (2011). Development of a genetic system for the archaeal virus *Sulfolobus turreted icosahedral virus* (STIV). *Virology*, 415(1), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.03.023>
- Yan, S., Liu, H., Mohr, T. J., Jenrette, J., Chiodini, R., Zaccardelli, M., Setubal, J. C., & Vinatzer, B. A. (2008). Role of recombination in the evolution of the model plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, a very atypical tomato strain. *Applied and*

Environmental Microbiology, 74(10), 3171–3181. <https://doi.org/10.1128/AEM.00180-08>
Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C. L., Schaller, A., He, S. Y., & Howe, G. A. (2003). Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant Journal*, 36(4), 485–499. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01895.x>

8. ANEXOS

Description	Name	Sequence Le...	% Pairwise Identity ▼
Alignment of 27 sequences	16S rRNA	776	96.1%
Alignment of 27 sequences	cts	563	89.1%
Alignment of 27 sequences	acn	638	89.0%
Neighbor-Joining consensus tree 16S rRNA - acn - cts - pgi - rpoD	16S rRNA - acn - cts - pgi - rpoD consensus tree	3,290	88.3%
Alignment of 27 sequences	16S rRNA - acn - cts - pgi - rpoD	3,290	88.3%
Alignment of 27 sequences	rpoD	533	83.8%
Alignment of 27 sequences	pgi	780	81.0%

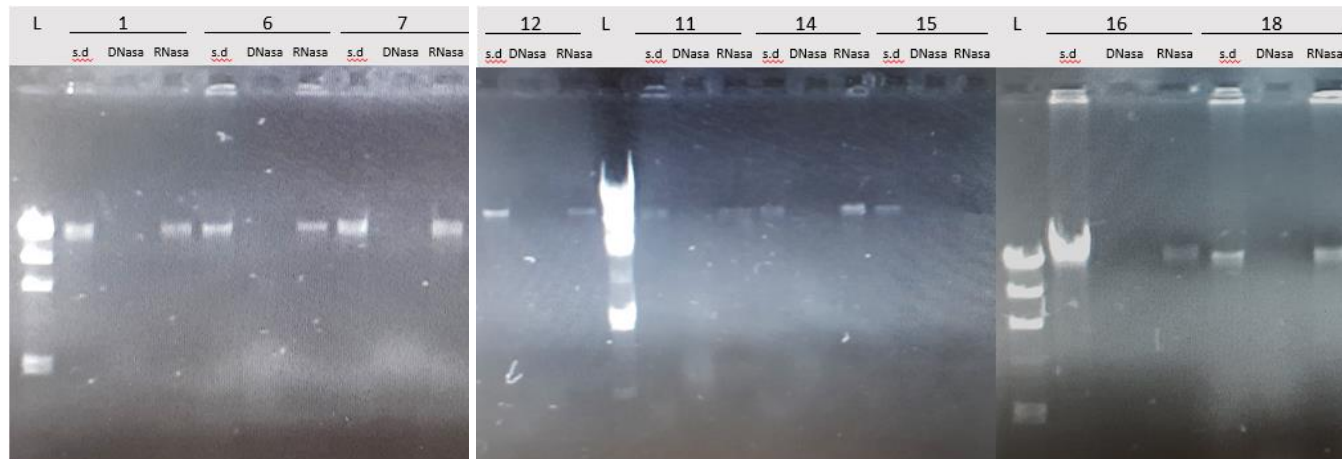
Anexo I. Información sobre el alineamiento y concatenación de secuencias para el análisis *MLSA*. Características del alineamiento y concatenación para las 27 secuencias utilizadas en el análisis *MLSA*, 19 correspondientes a los aislados ambientales y 8 a cepas de referencia. Se muestra el número de secuencias utilizadas, el gen de las secuencias, el largo de las secuencias y el porcentaje de identidad entre las 27 secuencias alineadas.

Matrix: Patristic Distances	Decimal Places: 2	Style: Heatmap and Numbers	40M	42Ch	43Ch	A2.6	AI.1	AZHeinz24	AZHeinz26	FL2	FL4	HO6.2	HOmeda...	JV_9r	L1.1	N9.9	N10.3	P. fluore...	P. fluore...	P. syring...	P. viridi fl...	P. aerugi...	P. syring...	Pss B728a	Pst DC300...	T1.9	T11	TJ5_5	VCMAgpz2	
			40M	0.09	0.09	0.08	0.09	0.13	0.13	0.00	0.14	0.13	0.06	0.06	0.09	0.10	0.02	0.02	0.09	0.13	0.13	0.18	0.09	0.12	0.13	0.17	0.10	0.15	0.02	
			42Ch	0.09	0.00	0.10	0.04	0.12	0.12	0.09	0.13	0.12	0.09	0.09	0.02	0.04	0.09	0.09	0.01	0.12	0.13	0.17	0.04	0.12	0.13	0.17	0.04	0.15	0.09	
			43Ch	0.09	0.00	0.10	0.04	0.12	0.12	0.09	0.13	0.12	0.09	0.09	0.02	0.04	0.09	0.09	0.01	0.12	0.13	0.17	0.04	0.12	0.13	0.17	0.04	0.15	0.09	
			A2.6	0.08	0.10	0.10	0.11	0.15	0.15	0.08	0.15	0.15	0.08	0.08	0.11	0.11	0.08	0.08	0.11	0.14	0.15	0.19	0.10	0.14	0.15	0.19	0.11	0.17	0.08	
			AI.1	0.09	0.04	0.04	0.11	0.13	0.13	0.09	0.14	0.13	0.10	0.10	0.04	0.04	0.10	0.09	0.04	0.13	0.13	0.18	0.05	0.13	0.14	0.18	0.02	0.16	0.10	
			AZHeinz24	0.13	0.12	0.12	0.15	0.13	0.00	0.13	0.06	0.01	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.08	0.01	0.20	0.12	0.08	0.09	0.18	0.13	0.18	0.13		
			AZHeinz26	0.13	0.12	0.12	0.15	0.13	0.00	0.13	0.06	0.01	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.08	0.01	0.20	0.12	0.08	0.09	0.18	0.13	0.18	0.13		
			FL2	0.00	0.09	0.09	0.08	0.09	0.13	0.13	0.14	0.13	0.06	0.06	0.09	0.10	0.02	0.02	0.09	0.13	0.13	0.18	0.09	0.12	0.13	0.17	0.10	0.15	0.02	
			FL4	0.14	0.13	0.13	0.15	0.14	0.06	0.06	0.14	0.06	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	0.09	0.06	0.21	0.13	0.09	0.10	0.19	0.14	0.19	0.14	
			HO6.2	0.13	0.12	0.12	0.15	0.13	0.01	0.01	0.13	0.06	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.08	0.01	0.20	0.12	0.08	0.09	0.18	0.13	0.18	0.13		
			HOmedano27	0.06	0.09	0.09	0.08	0.10	0.13	0.13	0.06	0.14	0.13	0.07	0.07	0.09	0.10	0.06	0.06	0.09	0.13	0.13	0.18	0.09	0.13	0.13	0.18	0.10	0.16	0.07
			JV_9r	0.06	0.09	0.09	0.08	0.10	0.13	0.13	0.06	0.14	0.13	0.07	0.10	0.10	0.06	0.06	0.09	0.13	0.13	0.18	0.09	0.13	0.14	0.18	0.10	0.16	0.07	
			L1.1	0.09	0.02	0.02	0.11	0.04	0.13	0.13	0.09	0.14	0.13	0.09	0.10	0.04	0.04	0.09	0.09	0.02	0.13	0.13	0.18	0.05	0.12	0.13	0.17	0.04	0.15	0.10
			N9.9	0.10	0.04	0.04	0.11	0.04	0.13	0.13	0.10	0.14	0.13	0.10	0.10	0.04	0.10	0.10	0.04	0.13	0.13	0.18	0.05	0.13	0.14	0.18	0.05	0.16	0.10	
			N10.3	0.02	0.09	0.09	0.08	0.10	0.13	0.13	0.02	0.14	0.13	0.06	0.06	0.09	0.10	0.01	0.01	0.09	0.13	0.13	0.18	0.09	0.13	0.13	0.17	0.10	0.16	0.01
			P. fluorescens FDAARGOS ...	0.02	0.09	0.09	0.08	0.09	0.13	0.13	0.02	0.14	0.13	0.06	0.06	0.09	0.10	0.01	0.01	0.09	0.13	0.13	0.18	0.09	0.12	0.13	0.17	0.10	0.15	0.01
			P. fluorescens LBUM677	0.09	0.01	0.01	0.11	0.04	0.13	0.13	0.09	0.13	0.13	0.09	0.09	0.02	0.04	0.09	0.09	0.12	0.13	0.17	0.04	0.12	0.13	0.17	0.04	0.15	0.09	
			P. syringae CC1557	0.13	0.12	0.12	0.14	0.13	0.08	0.08	0.13	0.09	0.08	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.12	0.08	0.08	0.20	0.12	0.08	0.09	0.18	0.13	0.18	0.13	
			P. viridi flava CFBP1590	0.13	0.13	0.13	0.15	0.13	0.01	0.01	0.13	0.06	0.01	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.08	0.08	0.20	0.12	0.08	0.09	0.18	0.14	0.18	0.13	
			P. aeruginosa	0.18	0.17	0.17	0.19	0.18	0.20	0.20	0.18	0.21	0.20	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.17	0.20	0.20	0.17	0.20	0.20	0.25	0.18	0.18	0.15	0.18	
			P. syringae inb918	0.09	0.04	0.04	0.10	0.05	0.12	0.12	0.09	0.13	0.12	0.09	0.09	0.05	0.05	0.09	0.09	0.04	0.12	0.12	0.17	0.12	0.13	0.17	0.05	0.15	0.09	
			Pss B728a	0.12	0.12	0.12	0.14	0.13	0.08	0.08	0.12	0.09	0.08	0.13	0.13	0.12	0.13	0.12	0.12	0.08	0.08	0.20	0.12	0.08	0.06	0.17	0.13	0.17	0.13	
			Pst DC3000	0.13	0.13	0.13	0.15	0.14	0.09	0.09	0.13	0.10	0.09	0.13	0.14	0.13	0.14	0.13	0.13	0.09	0.09	0.20	0.13	0.06	0.18	0.14	0.18	0.14		
			T1.9	0.17	0.17	0.17	0.19	0.18	0.18	0.17	0.19	0.18	0.18	0.18	0.17	0.18	0.17	0.17	0.17	0.18	0.18	0.25	0.17	0.17	0.18	0.18	0.18	0.22	0.18	
			T11	0.10	0.04	0.04	0.11	0.02	0.13	0.13	0.10	0.14	0.13	0.10	0.10	0.04	0.05	0.10	0.10	0.04	0.13	0.14	0.18	0.05	0.13	0.14	0.18	0.16	0.10	
			TJ5_5	0.15	0.15	0.15	0.17	0.16	0.18	0.18	0.15	0.19	0.18	0.16	0.16	0.15	0.16	0.16	0.15	0.15	0.18	0.18	0.15	0.17	0.18	0.22	0.16	0.16		
			VCMAgpz2	0.02	0.09	0.09	0.08	0.10	0.13	0.13	0.02	0.14	0.13	0.07	0.07	0.10	0.10	0.01	0.01	0.09	0.13	0.13	0.18	0.09	0.13	0.14	0.18	0.10	0.16	

Anexo II. Matriz de distancia del análisis *MLSA*. Matriz de distancias patrísticas calculadas del alineamiento de los genes *housekeeping* 16S ARNr, *acn*, *cts*, *pgi* y *rpoD* de los diecinueve aislados de estudio y las ocho cepas de referencia.

	40M	42Ch	43Ch	A2.6	AI.1	AZHeinz24	AZHeinz26	FL2	FL4	HO6.2	Homeda...	JV_9r	L1.1	N9.9	N10.3	P. aerugi...	P. fluore...	P. fluore...	P. syring...	P. syring...	P. viridi f...	Pss B728a	Pst DC300...	T1.9	T11	TJ5_5	VCMAgpx2
40M	0.08	0.08	0.08	0.10	0.09	0.16	0.16	0	0.18	0.16	0.05	0.04	0.03	0.09	0.01	0.16	0.01	0.08	0.17	0.08	0.16	0.15	0.17	0.13	0.09	0.15	0.01
42Ch	0.08	0.08	0.00	0.12	0.03	0.15	0.15	0.08	0.17	0.15	0.08	0.07	0.02	0.03	0.07	0.15	0.07	0.02	0.16	0.04	0.16	0.15	0.16	0.12	0.03	0.14	0.07
43Ch	0.08	0.00	0.00	0.12	0.03	0.15	0.15	0.08	0.17	0.15	0.08	0.07	0.02	0.03	0.07	0.15	0.07	0.02	0.16	0.04	0.16	0.15	0.16	0.12	0.03	0.14	0.07
A2.6	0.10	0.12	0.12	0.14	0.14	0.21	0.21	0.10	0.22	0.21	0.09	0.09	0.13	0.13	0.09	0.21	0.09	0.13	0.22	0.13	0.21	0.20	0.21	0.18	0.13	0.20	0.09
AI.1	0.09	0.03	0.03	0.14	0.03	0.17	0.17	0.09	0.18	0.16	0.09	0.09	0.03	0.04	0.09	0.17	0.09	0.03	0.18	0.05	0.17	0.16	0.17	0.13	0.02	0.16	0.09
AZHeinz24	0.16	0.15	0.15	0.21	0.17	0.00	0.00	0.16	0.08	0.00	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.20	0.16	0.15	0.08	0.15	0.01	0.06	0.07	0.13	0.16	0.19	0.16
AZHeinz26	0.16	0.15	0.15	0.21	0.17	0.00	0.00	0.16	0.08	0.00	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.20	0.16	0.15	0.08	0.15	0.01	0.06	0.07	0.13	0.16	0.19	0.16
FL2	0	0.08	0.08	0.10	0.09	0.16	0.16	0.18	0.16	0.05	0.04	0.08	0.09	0.01	0.16	0.01	0.08	0.17	0.08	0.16	0.15	0.17	0.13	0.09	0.15	0.01	
FL4	0.18	0.17	0.17	0.22	0.18	0.08	0.08	0.18	0.18	0.17	0.17	0.17	0.18	0.17	0.22	0.17	0.17	0.09	0.17	0.09	0.08	0.09	0.15	0.18	0.21	0.17	
HO6.2	0.16	0.15	0.15	0.21	0.16	0.00	0.00	0.16	0.08	0.00	0.16	0.15	0.16	0.16	0.16	0.20	0.15	0.15	0.08	0.15	0.01	0.06	0.07	0.13	0.16	0.19	0.15
Homedano27	0.05	0.08	0.08	0.09	0.09	0.16	0.16	0.05	0.17	0.16	0.04	0.04	0.08	0.08	0.04	0.16	0.04	0.08	0.17	0.08	0.16	0.15	0.17	0.13	0.09	0.15	0.04
JV_9r	0.04	0.07	0.07	0.09	0.09	0.16	0.16	0.04	0.17	0.15	0.04	0.08	0.08	0.08	0.08	0.16	0.04	0.07	0.17	0.07	0.16	0.15	0.16	0.12	0.08	0.15	0.04
L1.1	0.08	0.02	0.02	0.13	0.03	0.16	0.16	0.08	0.17	0.16	0.08	0.08	0.03	0.03	0.08	0.16	0.08	0.02	0.17	0.04	0.16	0.15	0.16	0.13	0.03	0.15	0.08
N9.9	0.09	0.03	0.03	0.13	0.04	0.16	0.16	0.09	0.18	0.16	0.08	0.08	0.03	0.03	0.08	0.16	0.08	0.03	0.17	0.05	0.17	0.16	0.17	0.13	0.04	0.15	0.08
N10.3	0.01	0.07	0.07	0.09	0.09	0.16	0.16	0.01	0.17	0.16	0.04	0.04	0.08	0.08	0.16	0.01	0.08	0.17	0.08	0.16	0.15	0.16	0.13	0.08	0.15	0.01	
P. aeruginosa	0.16	0.15	0.15	0.21	0.17	0.20	0.20	0.16	0.22	0.20	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.20	0.15	0.15	0.08	0.15	0.01	0.06	0.07	0.13	0.16	0.19	0.15
P. fluorescens FDAARGOS ...	0.01	0.07	0.07	0.09	0.09	0.16	0.16	0.01	0.17	0.15	0.04	0.04	0.08	0.08	0.01	0.16	0.01	0.07	0.17	0.07	0.16	0.15	0.16	0.12	0.08	0.15	0.00
P. fluorescens LBUM677	0.08	0.02	0.02	0.13	0.03	0.15	0.15	0.08	0.17	0.15	0.08	0.07	0.02	0.03	0.08	0.15	0.07	0.07	0.17	0.04	0.16	0.15	0.16	0.12	0.08	0.14	0.07
P. syringae CC1557	0.17	0.16	0.16	0.22	0.18	0.08	0.08	0.17	0.09	0.08	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.21	0.17	0.17	0.17	0.17	0.08	0.07	0.09	0.14	0.17	0.20	0.17
P. syringae inb918	0.08	0.04	0.04	0.13	0.05	0.15	0.15	0.08	0.17	0.15	0.08	0.07	0.04	0.05	0.08	0.15	0.07	0.04	0.17	0.16	0.15	0.16	0.12	0.05	0.14	0.07	
P. viridiflava CFBP 1590	0.16	0.16	0.16	0.21	0.17	0.01	0.01	0.16	0.09	0.01	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.21	0.16	0.16	0.08	0.16	0.07	0.08	0.13	0.17	0.20	0.16	
Pss B728a	0.15	0.15	0.15	0.20	0.16	0.06	0.06	0.15	0.08	0.06	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.20	0.15	0.15	0.07	0.15	0.07	0.07	0.12	0.16	0.19	0.15	
Pst DC3000	0.17	0.16	0.16	0.21	0.17	0.07	0.07	0.17	0.09	0.07	0.17	0.16	0.16	0.17	0.16	0.21	0.16	0.16	0.09	0.16	0.08	0.07	0.14	0.17	0.20	0.16	
T1.9	0.13	0.12	0.12	0.18	0.13	0.13	0.13	0.13	0.15	0.13	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.17	0.12	0.12	0.14	0.12	0.13	0.12	0.14	0.13	0.16	0.12	
T11	0.09	0.03	0.03	0.13	0.02	0.16	0.16	0.09	0.18	0.16	0.09	0.08	0.03	0.04	0.08	0.16	0.08	0.03	0.17	0.05	0.17	0.16	0.17	0.13	0.15	0.08	
TJ5_5	0.15	0.14	0.14	0.20	0.16	0.19	0.19	0.15	0.21	0.19	0.15	0.15	0.15	0.15	0.13	0.15	0.14	0.20	0.14	0.20	0.19	0.20	0.16	0.15	0.15	0.15	
VCMAgpx2	0.01	0.07	0.07	0.09	0.09	0.16	0.16	0.01	0.17	0.15	0.04	0.04	0.08	0.08	0.01	0.16	0.00	0.07	0.17	0.07	0.16	0.15	0.16	0.12	0.08	0.15	

Anexo III. Matriz de distancia del alineamiento del gen *cts*. Matriz de distancias patrísticas calculadas del alineamiento del gen *cts* de los diecinueve aislados de estudio y las ocho cepas de referencia.



Anexo IV. Geles completos de digestión enzimática. Gel de acrilamida 0,6% con el producto de la digestión con ADNasa y ARNasa.