



---

**“Caracterización de bacteriófagos contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* como parte de una estrategia de biocontrol de la Peca Bacteriana en cultivos de tomate”**

---

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

Por

**Juan Pablo Rivera González**

Director del Seminario de Título

Dr. Gastón Higuera Guajardo

Co-Directora

Dra. Pamela Córdova Vargas

Patrocinante

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Abril, 2021.

Santiago de Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Juan Pablo Rivera González**

### **“Caracterización de bacteriófagos contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* como parte de una estrategia de biocontrol de la Peca Bacteriana en cultivos de tomate”**

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

**Director Seminario de Título:** Dr. Gastón Higuera Guajardo

#### **Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:**

**Evaluador:**

Santiago de Chile, 29 de Abril del 2021.

## BIOGRAFÍA



*XXVII Congreso Chileno de Fitopatología, Arica (2019)*

Nacido el 26 de agosto de 1996 en Chile, se crio entre las comunas de Quinta Normal y Maipú, ubicadas en la Región Metropolitana de Santiago.

El año 2003, comenzó sus estudios en el colegio Elvira Hurtado de Matte, donde consolidó su pasión por la ciencia durante la educación media en el electivo de biología. El constante esfuerzo y disciplina le permitieron ingresar a los estudios superiores en la Universidad de Chile el año 2015, cumpliendo así su meta de estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular.

De pequeño curioso y experimentando con lo que le rodeaba, es aficionado a la ciencia ficción y los virus. De hecho, participó como sujeto de prueba en el desarrollo de una vacuna para el virus respiratorio sincicial humano y actualmente prueba una vacuna contra el coronavirus SARS-CoV-2.

En el presente, mientras el mundo atraviesa una pandemia, persigue sus sueños dedicado a la carrera científica.

## AGRADECIMIENTOS

En este hito de mi vida, quisiera agradecerles fundamentalmente a las personas que me han acompañado durante todo este tiempo, pero también a quienes ya no están. Agradezco tanto las cosas buenas como las malas porque me ayudan a crecer, descubrir quien soy y quien puedo llegar a ser.

Gracias a mi familia, a mis padres Angélica y Juan Carlos, a mi hermana Melissa y a mi Porito (Dominga) que es parte de mi alma. Su amor y permanente apoyo es todo para mí.

Gracias a mis amigas y amigos, a mis compañeras y compañeros, por los momentos vividos, y con mención especial a Victoria porque la universidad no habría sido la misma sin ti.

Gracias al equipo del Laboratorio de Biotecnología del INTA, dirigido por el Dr. Jaime Romero, un espacio donde he podido crecer profesionalmente y expandir mis conocimientos.

Finalmente, agradezco al profesor Dr. Gastón Higuera y a mi tutora Dra. Pamela Córdova por todo su apoyo y cuyos proyectos PAI N°79170055 y FONDECYT Postdoctorado N°3180500, respectivamente, permitieron el financiamiento del presente estudio y la participación como expositor en el XXVII Congreso Chileno de Fitopatología.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Industria del tomate: Producción y dificultades del desarrollo .....	1
1.2. <i>Pseudomonas syringae</i> patovar <i>tomato</i> : Agente causal de la Peca Bacteriana .....	1
1.3. Estrategias de control: El problema de la resistencia a pesticidas convencionales .....	4
1.4. Microorganismos como agentes de biocontrol.....	6
1.5. Bacteriófagos: Características generales y clasificación.....	8
1.6. Biocontrol con bacteriófagos.....	10
1.7. Limitaciones del biocontrol con bacteriófagos y estrategias para su optimización.....	13
1.7.1. Tipos de ciclos de replicación de fagos .....	13
1.7.2. Bacterias resistentes a fagos.....	14
1.7.3. Persistencia de fagos en la filósfera y rizósfera .....	15
1.7.4. Baja consistencia de control de la enfermedad en comparación a los pesticidas convencionales .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1. Cepas de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> y condiciones de cultivo .....	20
3.2. Bacteriófagos .....	23
3.3. Caracterización morfológica de los bacteriófagos.....	27
3.3.1. Susceptibilidad a solvente orgánico (cloroformo).....	27
3.3.2. Microscopía electrónica de transmisión y análisis morfológico de las partículas virales.....	27
3.4. Caracterización molecular de los bacteriófagos.....	28
3.4.1. Extracción y purificación de ácido nucleico.....	28
3.4.2. Determinación del tipo de ácido nucleico.....	29
3.5. Potencial de biocontrol de los bacteriófagos.....	32
3.5.1. Rango de hospedero por ensayo de microgota .....	32
3.5.2. Translocación de bacteriófagos en plantas de tomate .....	33
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
4.1. Aislamiento de bacteriófagos y morfología de las placas de lisis .....	35
4.2. Caracterización morfológica de los bacteriófagos.....	37

4.2.1.	Presencia de membrana lipídica.....	37
4.2.2.	Morfología de los bacteriófagos por microscopía electrónica de transmisión .....	37
4.3.	Caracterización molecular de los bacteriófagos.....	39
4.3.1.	Tipo de ácido nucleico y tamaño del genoma .....	39
4.3.2.	Análisis de patrones de restricción de genomas.....	40
4.4.	Potencial de biocontrol de los bacteriófagos.....	43
4.4.1.	Rango de hospedero en cepas de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> ... 43	
4.4.2.	Translocación de bacteriófagos en plantas de tomate .....	49
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN Y PROYECCIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Origen y concentración mínima inhibitoria (CMI) de cobre y estreptomycin de las cepas de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> ( <i>Pst</i> ) utilizadas en este estudio. ....	21
<b>Tabla 2.</b> Nombre, procedencia, cepa hospedera y diámetro de las placas de lisis de los diez bacteriófagos aislados en este estudio. ....	36
<b>Tabla 3.</b> Clasificación y dimensiones de los viriones de ocho bacteriófagos examinados por microscopía electrónica de transmisión. ....	38
<b>Tabla 4.</b> Tamaño estimado del genoma de cada bacteriófago según la movilidad relativa respecto al marcador de peso molecular en gel de agarosa. ....	40
<b>Tabla 5.</b> Rango de hospedero de los bacteriófagos contra 77 cepas de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> ( <i>Pst</i> ) aisladas en Chile. ....	43
<b>Tabla 6.</b> Recuperación de bacteriófagos desde estructuras aéreas de plantas de tomate luego de ser ensayadas por 24 y 48 horas en medio hidropónico. ....	47
<b>Tabla 7.</b> Persistencia del fago $\Phi$ 18 en plantas de tomate ensayadas por hasta 5 días en medio hidropónico. ....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sintomatología de la Peca Bacteriana en plantas de tomate, causada por <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de las tres familias clásicas, basadas en la morfología, del orden <i>Caudovirales</i> . ....	9
<b>Figura 3.</b> Distribución geográfica de los huertos de tomates muestreados para la obtención de cepas de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> en Chile.....	20
<b>Figura 4.</b> Placas de lisis de los bacteriófagos caracterizados, formadas en doble agar por el método de plaqueo de microgotas. ....	36
<b>Figura 5.</b> Microfotografía por transmisión electrónica de seis bacteriófagos representativos. ....	38
<b>Figura 6.</b> Electroforesis en gel de agarosa de los genomas de tres bacteriófagos tratados con nucleasas para determinar la naturaleza de los ácidos nucleicos.....	39
<b>Figura 7.</b> Patrones de restricción de los genomas de los bacteriófagos. ....	41
<b>Figura 8.</b> Dendrograma de similitud de los bacteriófagos. ....	42
<b>Figura 9.</b> Representación en mapa de calor del rango de hospedero de los bacteriófagos.. ....	48
<b>Figura 10.</b> Detección de la translocación de bacteriófagos en plantas de tomate.....	50



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNbc</b>	ADN bicatenario
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>CCC</b>	Coefficiente de correlación cofenética
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DGREA</b>	Análisis directo del genoma con enzima de restricción (Direct Genome Restriction Enzyme Analysis)
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ICTV</b>	Comité Internacional de Taxonomía de Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses)
<b>kb</b>	Kilopares de bases
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección (Multiplicity of Infection)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b><i>Pst</i></b>	<i>Pseudomonas syringae</i> patovar <i>tomato</i>
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SEF</b>	Sobrenadante enriquecido con fagos
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UFP</b>	Unidades formadoras de placa
<b>UPGMA</b>	Método de pares no ponderados utilizando media aritmética (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)
<b>UV</b>	Ultravioleta

## RESUMEN

*Pseudomonas syringae* patovar *tomato* es la bacteria fitopatogena causante de la Peca Bacteriana en tomates. Actualmente, el manejo de la enfermedad se basa en el control cultural y químico, con uso frecuente de pesticidas en base a cobre y estreptomicina. No obstante, el abuso de estos productos ha derivado en la selección de bacterias resistentes, intensificando el desarrollo de estrategias de manejo alternativas. En este aspecto, los bacteriófagos o fagos han ganado un renovado interés como agentes de control biológico por su capacidad de infectar y lisar exclusivamente bacterias, incluso resistentes a pesticidas.

El presente estudio tuvo por objetivo aislar y caracterizar fagos como potenciales agentes de biocontrol de cepas de *P. syringae* patovar *tomato* aisladas desde cultivos de tomate en la Zona Central de Chile, algunas tolerantes a pesticidas. Como resultado, se aislaron diez fagos desde muestras de aguas servidas y una acequia, los cuales se procedió a caracterizar morfológica y molecularmente. Entre sus características principales, todos produjeron placas de lisis transparentes, carecen de membrana lipídica y sus genomas se componen de ADN bicatenario. Sumado a esto, las morfologías observadas por microscopía electrónica de transmisión determinaron que los diez fagos pertenecen al orden *Caudovirales* y poseen las morfologías de las familias *Myoviridae* (fagos  $\Phi 1$  y  $\Phi 16$ ), *Podoviridae* (fagos  $\Phi 11$ ,  $\Phi 12$ ,  $\Phi 15$  y  $\Phi 18$ ) y *Siphoviridae* (fagos  $\Phi 7$  y  $\Phi 8$ ). El análisis directo del genoma con enzima de restricción reveló que los fagos son genéticamente diversos, distinguiendo cinco clústeres que se asocian con la morfología. Posteriormente, se determinó el rango de hospedero de los fagos evaluando la capacidad de lisar 77 cepas de *P. syringae* patovar *tomato*. Los fagos lisaron 44 cepas,

de las cuales 41% son tolerantes a cobre, 9% a estreptomina y 30% a ambos pesticidas.

También, se evaluó la capacidad de translocación de los fagos a través de las raíces de plantas jóvenes de tomates en medio hidropónico. Para los ensayos, seis fagos fueron seleccionados según la diversidad morfológica y, como resultado, los fagos  $\Phi 6$ ,  $\Phi 8$ ,  $\Phi 12$  y  $\Phi 18$  se detectaron en el tallo y el fago  $\Phi 1$  también en las hojas.

Finalmente, este es el primer estudio que reporta el aislamiento y caracterización de bacteriófagos que infectan cepas de *P. syringae* patovar *tomato* aisladas en Chile. Los fagos lisaron 57% del cepario, incluso cepas tolerantes a cobre y/o estreptomina. Además, tienen la capacidad de translocar en plantas de tomate desde las raíces hacia tejidos superiores. Los resultados muestran el potencial para ser utilizados en una estrategia de biocontrol efectiva contra *P. syringae* patovar *tomato*.

## ABSTRACT

*Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* is the phytopathogenic bacterium that causes Bacterial Speck in tomatoes. Currently, the management of the disease is based on cultural and chemical control, with frequent use of pesticides based on copper and streptomycin. However, the abuse of these products has led to the selection of resistant bacteria, intensifying the development of alternative management strategies. In this regard, bacteriophages or phages have gained renewed interest as biological control agents due to their ability to exclusively infect and lyse bacteria, even those resistant to pesticides.

The present study aimed to isolate and characterize phages as potential biocontrol agents of *P. syringae* pathovar *tomato* strains isolated from tomato crops in the Central Zone of Chile, some of them tolerant to pesticides. As a result, ten phages were isolated from sewage samples and an acequia, which were proceeded to characterize morphological and molecularly. Among their main characteristics, they all produced clear plaques, they lack lipid membrane, and their genomes are composed of double-stranded DNA. In addition to this, the morphologies observed by transmission electron microscopy determined that the ten phages belong to the *Caudovirales* order and possess the morphologies of the families *Myoviridae* (phages  $\Phi$ 1 and  $\Phi$ 16), *Podoviridae* (phages  $\Phi$ 11,  $\Phi$ 12,  $\Phi$ 15 and  $\Phi$ 18) and *Siphoviridae* (phages  $\Phi$ 7 and  $\Phi$ 8). Direct genome restriction enzyme analysis revealed that the phages are genetically diverse, distinguishing five clusters that are associated with morphology. Subsequently, the host range of the phages was determined by evaluating the ability to lyse 77 strains of *P. syringae* pathovar *tomato*. The phages lysed 44 strains, of which 41% are tolerant to copper, 9% to streptomycin and 30% to both pesticides.

Also, the translocation capability of the phages through the roots of young tomato plants in a hydroponic medium was evaluated. For the tests, six phages were selected according to morphological diversity and, as a result, phages  $\Phi 6$ ,  $\Phi 8$ ,  $\Phi 12$  and  $\Phi 18$  were detected in stem and phage  $\Phi 1$  also in leaves.

Finally, this is the first study that reports the isolation and characterization of bacteriophages that infect *P. syringae* pathovar *tomato* strains isolated in Chile. The phages lysed 57% of strains, including copper and/or streptomycin tolerant strains. In addition, they are able to translocate in tomato plants from the roots into higher tissues. The results indicate the potential to be used in an effective biocontrol strategy against *P. syringae* pathovar *tomato*.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Industria del tomate: Producción y dificultades del desarrollo**

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los vegetales más importantes para la alimentación humana y la hortaliza de mayor producción a nivel mundial (FAOSTAT, 2020). Considerado cosmopolita, se cultiva tanto para consumo fresco como para procesado industrial. La producción estimada superó los 182 millones de toneladas en 2018, liderada por China con el 34% de la producción y seguido por India con el 11%. En Chile, el tomate es la tercera hortaliza más cultivada, cuya superficie de cultivo superó las 15.000 ha el 2018, equivalente a una producción por sobre de 951.000 toneladas para el mismo año (FAOSTAT, 2020; Muñoz, 2020).

La industria chilena del tomate presenta una alta rentabilidad, en gran medida impulsado por las exportaciones, las cuales superaron una cifra récord de USD 164.000.000 el año 2019 (Muñoz, 2020). No obstante, la industria del tomate es afectada por una serie de enfermedades asociadas a este cultivo, que repercuten directamente en la calidad del fruto y, por ende, en mermas productivas. En la actualidad, el tomate es susceptible a cerca de 200 enfermedades y plagas, causadas por nemátodos agalladores, bacterias, hongos y virus (Singh y col., 2017).

### **1.2. *Pseudomonas syringae* patovar *tomato*: Agente causal de la Peca Bacteriana**

Entre las principales bacterias fitopatógenas del tomate destacan: *Xanthomonas campestris*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* y *Pseudomonas syringae* patovar *tomato*, causantes de las enfermedades Mancha Bacteriana, Marchitez Bacteriana, Cancro Bacteriano y Peca Bacteriana, respectivamente. Esta última es una enfermedad importante desde el punto de vista económico en muchas regiones

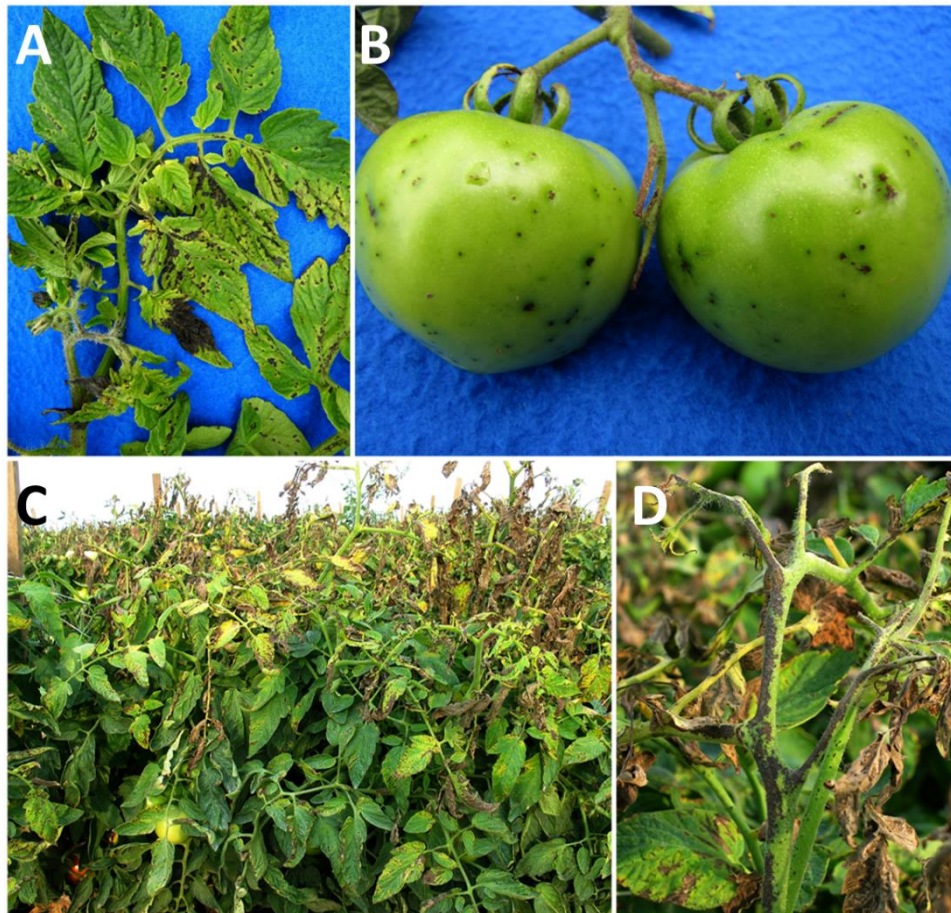
productoras de tomate del mundo, capaz de afectar también los cultivos de pimiento (Basim y col., 2004; Goode, 1980; Pernezny & Zhang, 2017; Sahin, 2001).

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), se identificó por primera vez en Chile en 1988 (Latorre & Lolas, 1988) y, al igual que muchos patovares de *P. syringae*, crece de forma epifita. Hasta el momento, se han identificado más de 60 patovares en la especie (Bull y col., 2010), y cada patovar infecta un grupo característico de planta hospedera. El año 2012 *Pseudomonas syringae* ocupó la primera posición en un ranking de las 10 bacterias patógenas de plantas, destacándose además como la fitopatógena de todos los tiempos (Mansfield y col., 2012). El uso de esta bacteria modelo para el estudio de mecanismos de patogenicidad ha resultado fundamental para comprender interacciones del tipo planta-patógeno (Preston, 2000). Se ha determinado que *P. syringae* tiene dos fases de crecimiento interconectadas: la fase epifita, cuando las bacterias viven en la superficie de los tejidos vegetales, generalmente las partes superiores, como las hojas, tallos, flores y frutos (filósfera); y la fase endofítica, cuando las bacterias ingresan al tejido vegetal y colonizan el espacio apoplástico intercelular (Xin y col., 2018).

La enfermedad de la Peca Bacteriana puede ser transmitida por semillas, material vegetal y equipamiento contaminado, siendo dispersada naturalmente por aerosoles y salpicaduras de lluvia. Sobrevive como un saprófito en los restos vegetales, el suelo y las superficies de las hojas. Al mismo tiempo, la enfermedad es favorecida por la alta humedad, lluvia y las temperaturas frías desde los 13 °C hasta los 25 °C (Preston, 2000).

La sintomatología se manifiesta sobre hojas con manchas de 2 a 3 mm de diámetro con color marrón oscuro, a veces rodeadas por un halo clorótico (Figura 1 A). Generalmente, las lesiones en el fruto son pequeñas (1 mm). Cuando se encuentra inmaduro las manchas son superficiales y oscuras (Figura 1 B), mientras que en el fruto maduro

pueden hundirse y estar rodeadas por un tejido verde de maduración tardía. Si no se controla a tiempo, la extensión de esta enfermedad puede generar un amarillamiento generalizado, seguido de desecación foliar (Figuras 1 C y D). En casos severos, las plantas infectadas presentan retraso en la madurez de los frutos y reducen la producción, afectando negativamente el valor de los tomates en el mercado y el rendimiento con pérdidas hasta de un 25% (Basim y col., 2004; Preston, 2000; Sanguinetti, 2005).



**Figura 1. Sintomatología de la Peca Bacteriana en plantas de tomate, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. (A) Hojas con manchas oscuras rodeadas por un halo clorótico y tejido necrótico (B) Frutos inmaduros con manchas oscuras superficiales y con hendiduras (C) Cultivo de tomate infectado que presenta amarillamiento y desecación foliar (D) Planta con desecación foliar y tallo necrosado. Adaptado de *Bacterial Speck of Tomato* (2020).**



### **1.3. Estrategias de control: El problema de la resistencia a pesticidas convencionales**

La estrategia para controlar la Peca Bacteriana consiste básicamente en el control cultural y el químico con pesticidas convencionales. En primer lugar, el control cultural consiste en el empleo de prácticas agrícolas comunes, o algunas modificaciones de ellas, con el propósito de contribuir a prevenir infecciones. Entre ellas, eliminar restos de plantas enfermas, utilización de semillas certificadas libres de patógenos y eliminación de restos vegetales postcosecha. Además, se sugiere el riego por goteo y la aireación en invernaderos para reducir la humedad de las hojas. No obstante, esta metodología tiene sus limitaciones, por ejemplo, la desinfección de semillas con ácido clorhídrico, acetato cúprico o agua caliente pueden afectar su germinabilidad (Sanguinetti, 2005). En segundo lugar, el control químico es una estrategia frecuente donde predominan los productos en base a cobre y antibióticos, denominados pesticidas convencionales.

Los pesticidas en base a cobre son habitualmente usados para controlar la Peca Bacteriana. Dentro de esta gama de productos destacan el hidróxido de cobre, oxiclورو de cobre y sulfato tribásico de cobre, entre otros (Griffin y col., 2017). Pese a esto, la resistencia a cobre se ha identificado y caracterizado en bacterias patógenas de plantas, incluyendo algunas de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, la cual se asocia principalmente a genes en plásmidos pero también presente a nivel cromosomal (Jones y col., 2012; Kering y col., 2019). Específicamente, en cepas de *Pst* resistentes, se ha determinado que la resistencia al cobre es codificada principalmente en plásmidos portadores del operón *cop* (Sundin y col., 1994). La aparición de cepas resistentes ha llevado a un aumento de las dosis necesarias para controlar la enfermedad, llevando a una acumulación de cobre en los suelos y provocando un impacto negativo en las plantas

al alterar su capacidad de metabolizar nitrógeno, el crecimiento de raíces y brotes, dañar pigmentos fotosintéticos, causando clorosis, e incluso, la muerte (Singh y col., 2016). Más aun, los problemas de salud humana y animal que se han asociado con la toxicidad del cobre incluyen trastornos gastrointestinales, hepáticos, reproductivos y neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer (Kering y col., 2019).

Los pesticidas en base a antibióticos se aplican en alternancia para controlar cepas de bacterias fitopatógenas resistentes a cobre. Se recomienda la utilización de estreptomicina más oxitetraciclina para el control preventivo y curativo de la Peca Bacteriana. No obstante, el uso generalizado (desde la década de 1950) y poco riguroso de la estreptomicina ha derivado en la selección de cepas bacterianas resistentes a este antibiótico, incluyendo bacterias fitopatógenas de los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Kering y col., 2019). La mayoría de los determinantes conocidos de resistencia a la estreptomicina codifican enzimas que confieren resistencia a través de la inactivación de la molécula de estreptomicina mediante fosforilación o adenililación. En *Pseudomonas*, solo se han detectado los genes *strA* y *strB*, que confieren resistencia a la estreptomicina mediante la codificación de una aminoglucósido fosfotransferasa (Sundin & Bender, 1993). Estos genes se asocian a plásmidos y también a la presencia de un transposón denominado Tn5393. Se ha reportado que dichos genes pueden transferirse de una bacteria a otra, incluso si pertenecen a diferentes especies o géneros, por lo que este tipo de resistencia a estreptomicina puede propagarse rápidamente, limitando la actividad del antibiótico en los cultivos (Vanneste y col., 2008). En *Erwinia*, la mutación espontánea en el gen cromosómico *rpsL* es otro mecanismo de resistencia bacteriana a la estreptomicina. Esta mutación altera la afinidad de unión a la proteína ribosómica S12, resultando en una resistencia de alto nivel que permite que las cepas

crezcan en presencia de más de 4096 ppm. Dado que las mutaciones en los genes cromosómicos solo pueden transmitirse por división celular, es poco probable que este tipo de resistencia se propague a otras poblaciones bacterianas (Sundin & Wang, 2018).

La situación se agrava si se considera la existencia de cepas de *P. syringae* que acarrean determinantes de resistencia al cobre y estreptomicina en el mismo plásmido, el cual podría transferirse de una bacteria a otra. Además, esto aumenta la posibilidad de seleccionar cepas resistentes a uno de estos compuestos cuando se usa el otro (Vanneste y col., 2008).

El acibenzolar-S-metil, inductor de resistencia sistémica adquirida, también puede ser integrado como alternativa para el manejo de esta enfermedad, particularmente donde predominen las poblaciones de *Pst* resistentes a los pesticidas mencionados, aunque puede tener efectos fisiológicos negativos sobre el crecimiento y el rendimiento de las plantas (Iriarte y col., 2012; Louws y col., 2001).

En definitiva, el control actual con químicos resulta ineficiente y la propagación de estas resistencias entre bacterias fitopatógenas dejaría pocas opciones para el control fitosanitario.

#### **1.4. Microorganismos como agentes de biocontrol**

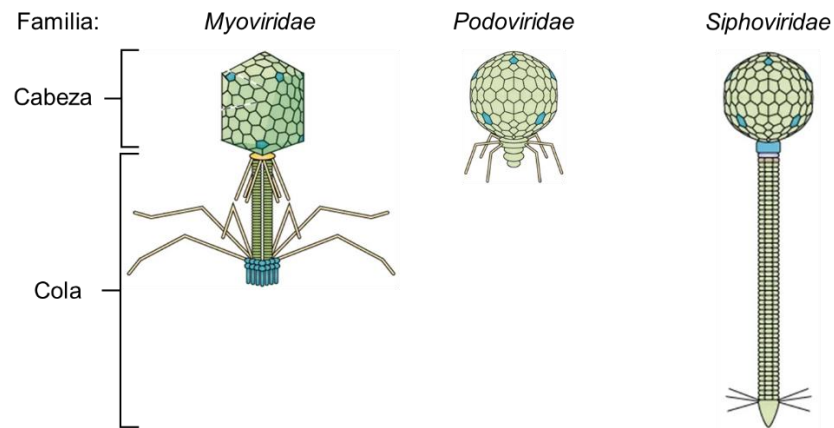
Actualmente, la prevalencia de bacterias resistentes a pesticidas convencionales, la preocupación por la acumulación de estos compuestos en el medio ambiente, la escasez de nuevos antibióticos en las líneas de desarrollo de fármacos, junto con la creciente demanda de productos “orgánicos” o libres de pesticidas ha llevado a los esfuerzos para considerar y desarrollar nuevas estrategias de control para bacterias fitopatógenas (Dy y col., 2018; Svircev y col., 2018).

Según Eilenberg y col. (2001, p. 391), el control biológico o biocontrol se define como “el uso de organismos vivos [incluidos los virus] para suprimir la densidad poblacional o el impacto de un organismo plaga específico, haciéndolo menos abundante o menos dañino de lo que sería”. En este aspecto, se ha desarrollado una gama de productos ecológicos que incluyen agentes de biocontrol tanto bacterianos como fúngicos y que están disponibles comercialmente. Su modo de acción consiste básicamente en la colonización de la superficie de las plantas y la rizósfera, donde ejercen una actividad antagonista contra los patógenos o estimulan de las defensas de la planta hospedera. En Chile, solo tres productos están autorizados por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para biocontrolar *P. syringae* en el tomate (BACIFORTE®, NACILLUS HORT PRO® y SERENADE® MAX), los cuales se componen de cepas de *Bacillus* spp. y *Brevibacillus parabrevis*. Pese a estar recomendados para tratar la Peca Bacteriana, la eficacia de estos biocontroladores está limitada al éxito de la colonización para desplazar la población fitopatógena. Además, su aplicación conjunta con antibióticos y/o productos cúpricos es incompatible (ficha técnica del producto). Por estos motivos, surge la necesidad de generar alternativas adicionales para el control de infecciones bacterianas, siendo una de las opciones más promisorias y atractivas el uso de bacteriófagos como tratamiento antibacteriano.

### 1.5. Bacteriófagos: Características generales y clasificación

Los bacteriófagos o fagos son virus que específicamente infectan bacterias. Dada su abundancia en prácticamente todos los entornos, desde el tracto gastrointestinal humano hasta el océano profundo, existe una amplia diversidad genética y morfológica. El genoma de un bacteriófago se compone de ADN o ARN, el que a su vez puede ser bicatenario (ADNbc o ARNbc) o monocatenario (ADNmc o ARNmc). Este material genético está empaquetado en una cápside que puede ser poliédrica (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* y *Cystoviridae*), filamentosa (*Inoviridae*), pleomórfica (*Plasmaviridae*) o conectada a una cola (*Caudovirales*), además de poseer lípidos (Dion y col., 2020).

El orden *Caudovirales* (recientemente reclasificado) comprende fagos con genoma ADNbc, cuyo virión carece de lípidos y consta de dos partes, la cápside o cabeza y una cola. Corresponde al orden más abundante (>85%) en bases de datos genómicas públicas (Dion y col., 2020) y, actualmente, comprende nueve familias. Estas son, las clásicas *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae* y, las recientemente creadas, *Ackermannviridae*, *Autographiviridae*, *Chaseviridae*, *Demereciviridae*, *Drexelviridae* y *Herelleviridae*. Morfológicamente, como se aprecia en la Figura 2, la familia *Myoviridae* se caracteriza por la presencia de una cola larga y contráctil, *Podoviridae* por una cola corta no contráctil y *Siphoviridae* por una cola larga no contráctil (*International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*, 2020).



**Figura 2. Representación esquemática de las tres familias clásicas, basadas en la morfología, del orden *Caudovirales*.** En este orden los viriones carecen de membrana lipídica y contienen un genoma de ADN bicatenario dentro de una cabeza conectada a una cola. En la familia *Myoviridae* la cola se caracteriza por ser larga y contráctil (extendida en la figura), en *Podoviridae* por ser corta no contráctil y en *Siphoviridae* por ser larga y no contráctil. Las especies virales ilustradas son, de izquierda a derecha, *Escherichia virus T4*, *Escherichia virus T7* y *Escherichia virus Lambda*. Ilustración no escalada, adaptada de Dion y col. (2020).

Según el ciclo replicativo, los bacteriófagos pueden dividirse además como virulentos o temperados. En el caso de los *Caudovirales*, al inicio de la infección los fagos se unen a receptores específicos de la superficie celular bacteriana, y tras una unión irreversible inyectan su ADN. Los fagos que utilizan la vía lítica se denominan "virulentos", y por definición, la infección por un fago virulento dará lugar a la lisis del hospedero, seguido de la liberación de la progenie del fago. Por otro lado, los fagos "temperados" pueden seguir tanto la ruta lítica de infección, descrita anteriormente, como la ruta lisogénica donde el genoma del fago se integra en el cromosoma bacteriano o persiste como un plásmido. De esta forma, el genoma del fago integrado se conoce como profago y así se replica como parte del genoma bacteriano de su hospedero hasta que un factor induzca un cambio al ciclo lítico (Fauquet y col., 2005).

Históricamente, la clasificación de los fagos se ha basado en características tales como el tipo de genoma, la morfología viral y el rango de hospedero, aunque se está sometiendo a una revisión importante, principalmente utilizando métodos basados en secuenciación y análisis de genomas. Actualmente, la clasificación taxonómica de los taxones de fagos es realizada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), cuyo reporte del 2018 los agrupó en cinco familias, 26 subfamilias, 363 géneros y 1.320 especies (Dion y col., 2020).

### **1.6. Biocontrol con bacteriófagos**

La aplicación de bacteriófagos para estudiar su potencial antimicrobiano comenzó en la década de 1920, luego de su descubrimiento de manera independiente por Frederic Twort en 1915 y Felix D'Herelle en 1917. Aunque las primeras aplicaciones de los fagos se centraron en la medicina humana, otros campos, incluida la agricultura, pronto comenzaron a explorar su potencial, proporcionando resultados prometedores (Frampton y col., 2012; Summers, 2001).

La primera evidencia experimental de que los fagos podían estar asociados con bacterias patógenas de plantas se produjo en 1924, cuando se demostró que un filtrado obtenido de col en descomposición podía inhibir la Pudrición de la Col causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Mallmann & Hemstreet, 1924). Al año siguiente, Kotila y Coons demostraron que la exposición de *Pectobacterium atrosepticum* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* a fagos podía prevenir la Pudrición Blanda en rodajas de tubérculo de papa y zanahoria, respectivamente (Coons & Kotila, 1925; Kotila & Coons, 1925). La primera prueba de campo registrada ocurrió en 1935, cuando la enfermedad del Maíz Marchito de Stewart, causada por *Pantoea stewartii*, se redujo mediante el pretratamiento de semillas con fagos, demostrando así su efectividad

(Thomas, 1935). Sin embargo, los importantes avances en la aplicación de bacteriófagos no convencieron en cuanto a eficacia y fiabilidad, más aún, su naturaleza biológica era poco entendida (Okabe & Goto, 1963). En los Estados Unidos y la mayor parte de Europa Occidental los ensayos de terapia con fagos en humanos cesaron después de la Segunda Guerra Mundial, y la investigación en esta materia fue desplazada por el descubrimiento de los antibióticos de amplio espectro en la década de 1940 (Summers, 2001). La aplicación generalizada de los antibióticos en el mundo occidental permitió controlar bacterias fitopatógenas y tratar enfermedades tanto en humanos como en la cría de animales (Svircev y col., 2018).

Actualmente, la incorporación de bacteriófagos como agentes de biocontrol ha recobrado el interés, ganando relevancia en la medicina humana y veterinaria, acuicultura y seguridad alimentaria, con estudios que demuestran su eficacia incluso en bacterias resistentes a antibióticos (Dy y col., 2018; Jikia y col., 2005). En agricultura se han descrito fagos con potencial bactericida para controlar enfermedades tales como: Agallas de la Corona en tomate, Pudrición Blanda de la papa, Fuego Bacteriano, Marchitez Bacteriana del tabaco, Sarna de la papa, Mancha Bacteriana del tomate, entre otras (Frampton y col., 2012). En este contexto, los positivos resultados tanto en pruebas de invernadero como en pruebas de campo han permitido que algunos pesticidas en base a fagos lleguen al mercado en el último tiempo (Buttimer y col., 2017). En el año 2005, Omnilytics fue la primera compañía en registrar un biopesticida (Agriphage™) en la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés). Este producto está indicado para el control de la Mancha y Peca Bacteriana en tomates y pimientos (específico para *X. campestris* pv. *vesicatoria* y *P. syringae* pv. *tomato*) (AgriPhage™ – Bactericide | Sandy, UT, 2020). A esto se suma la reciente



publicación del primer estudio que demuestra, con alentadores resultados, una potencial aplicación de bacteriófagos para tratar semillas de tomates contaminadas con *Pst* (Cemen y col., 2018).

Las características que impulsan el uso de fagos en el control de enfermedades causadas por bacterias son:

- Los fagos se **autorreplican** y son **autolimitantes**; se replican solo mientras la bacteria hospedera esté presente en el ambiente y en su ausencia se reduce la población.
- Los fagos son la entidad biológica más abundante de la biósfera (Suttle, 2005), **ampliamente distribuidos** y pueden aislarse fácilmente desde cualquier lugar donde haya bacterias presentes.
- Los fagos son virus que **infectan específicamente a las bacterias**, no a células eucariotas, por lo que no representan un peligro para humanos, animales o plantas.
- Su estrecho rango de hospedero permite **eliminar solo las bacterias deseadas**, sin dañar a otros miembros, posiblemente beneficiosos, de la microbiota nativa.
- Los fagos **pueden integrarse a tratamientos con otros pesticidas** sin pérdida significativa en la concentración de fagos, y por lo tanto en su eficacia.

## **1.7. Limitaciones del biocontrol con bacteriófagos y estrategias para su optimización**

Aunque las características mencionadas pueden resultar muy atractivas, existe una serie de desafíos que deben superarse para lograr una mayor efectividad en la aplicación de fagos para controlar enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. A continuación, se mencionan las principales limitaciones y las soluciones propuestas.

### **1.7.1. Tipos de ciclos de replicación de fagos**

Como se mencionó anteriormente, los fagos temperados pueden seguir la ruta de infección lítica, pero también la ruta de la lisogenia. Esta última involucra a los fagos temperados en mayor transferencia horizontal de material genético entre las bacterias, ya que facilita la propagación de genes de virulencia por un mecanismo de transducción exclusivo, denominado transducción especializada, además de la transducción generalizada. A menudo, el ADN profágico puede acarrear genes que aumentan el *fitness* de la bacteria hospedera, elevando su virulencia (Fauquet y col., 2005; Schneider, 2017).

En fagos filamentosos se ha identificado un tercer mecanismo de interacción fago-hospedero, donde los fagos provocan una infección crónica no letal con producción continua de su progenie (Fauquet y col., 2005; Hampton y col., 2020). Sin embargo, la idoneidad de estos fagos para el biocontrol es cuestionable ya que su infección puede tener efectos variables sobre la virulencia del hospedero. Para evitar este problema, idealmente un fago para aplicaciones de biocontrol debiera ser exclusivamente lítico y poseer un rango de hospedero amplio, que permita la infección productiva en todas las cepas del género/especie patógena a la que se dirige (Buttimer y col., 2017).

Preferentemente, deben elegirse los fagos que producen placas de lisis transparentes para reducir la posibilidad de aislar fagos temperados ya que estos últimos pueden realizar la indeseada conversión lisogénica (Frampton y col., 2012).

### **1.7.2. Bacterias resistentes a fagos**

Para una estrategia de biocontrol exitosa, es fundamental comprender cómo los patógenos bacterianos pueden volverse resistentes a los fagos. La carrera armamentista coevolutiva entre fagos y bacterias ha llevado al surgimiento de múltiples mecanismos de resistencia a los fagos en bacterias, así como también los fagos utilizan una amplia batería de estrategias de contradefensa para coexistir en presencia de ellos (Hampton y col., 2020).

Las bacterias han evolucionado mecanismos tanto innatos como adaptativos que evitan la infección de bacteriófagos. Brevemente, para prevenir la adsorción, las bacterias pueden alterar u ocultar receptores requeridos por los fagos, además de liberar vesículas con receptores “señuelo” de modo de reducir infecciones productivas. Posterior a la infección, destacan mecanismos como: sistemas de restricción-modificación, CRISPR-Cas, infección abortiva, entre otros que, en conjunto, tienen como objetivo evitar la replicación productiva de fagos (Hampton y col., 2020).

Por otra parte, los bacteriófagos coevolucionan con las bacterias, evadiendo estos mecanismos de resistencia. En este aspecto, la modificación de receptores bacterianos puede seleccionar fagos que reconocen receptores alternativos o que generan enzimas depolimerasas que degradan la matriz extracelular, permitiéndoles el acceso. Para evadir sistemas de restricción-modificación y CRISPR-Cas, los mecanismos de contradefensa incluyen: la modificación química de bases y/o mutaciones puntuales en

el ADN del fago, eliminación de secuencias de reconocimiento de su genoma y la codificación de enzimas que interfieren los complejos efectores de la resistencia en la bacteria hospedera (Hampton y col., 2020).

En vista de lo anterior, la determinación del rango de hospedero de cada fago permite diseñar un cóctel capaz de infectar todas las cepas patógenas conocidas involucradas en la enfermedad (Frampton y col., 2012). Los cócteles de fagos se utilizan en el biocontrol por dos razones principales: primero, se usan para apuntar a diferentes patógenos (ya sea especies diferentes que causan una enfermedad similar o diferentes cepas de una misma especie), extendiendo de esta forma el rango de hospedero. Segundo, los cócteles de fagos se utilizan para prevenir el surgimiento de bacterias resistentes a los fagos, dado que la probabilidad de selección de una cepa resistente decrece a medida que aumenta el número de fagos que la infectan. Favorablemente, la evolución de la resistencia puede ocurrir a un gran costo de *fitness* que conlleva un deterioro en la virulencia y/o una reducción en la tasa de crecimiento, disminuyendo así la gravedad de la enfermedad (Kering y col., 2019).

### **1.7.3. Persistencia de fagos en la filósfera y rizósfera**

La eficacia del biocontrol depende del encuentro de ambas partes, por lo que es crucial mantener una alta población del agente biocontrolador muy cerca de la bacteria objetivo. La principal forma de aplicar los fagos es mediante aspersion. Sin embargo, el entorno de la filósfera es extremadamente nocivo, lo que conduce a una fuerte disminución en la población de fagos con el tiempo. Esta baja persistencia en las superficies de las hojas de las plantas es el principal factor limitante para lograr el biocontrol, y está influenciado por la desecación, la temperatura, el pH, la irradiación de la luz solar (especialmente en el espectro UV) y la exposición a ciertos pesticidas, como algunos basados en cobre

mencionados anteriormente (Iriarte y col., 2007). De todos ellos, la irradiación solar es el factor más perjudicial para la persistencia del fago (Jones y col., 2012).

En respuesta a la problemática que plantea la irradiación solar, se han investigado formulaciones protectoras para minimizar el daño de los rayos UV. Se ha reportado que extractos naturales de zanahoria, pimiento y remolacha protegen, al igual que la caseína, peptona de soya, aminoácidos aromáticos purificados, astaxatina y Tween® 80 sin efectos comprometedores sobre la infección y la estabilidad de los fagos. Asimismo, se ha demostrado que algunos polímeros biodegradables e incluso la leche descremada también mejoran la capacidad de los fagos de persistir en las superficies de las hojas, no obstante, existe una gran necesidad de identificar formulaciones de efectividad superior. Dado que la hora del día en que se aplican los fagos también puede afectar su eficacia, como propuesta, se ha demostrado que la aplicación nocturna de fagos a hojas de tomate logra una mayor persistencia de estos en la filósfera, dándoles más tiempo para ejercer su acción bactericida (Buttimer y col., 2017; Iriarte y col., 2007).

Por otro lado, en la rizósfera, los distintos tipos de suelos afectan la difusión en el sustrato, debido a la adsorción inespecífica, y también la persistencia, debido al pH del suelo y la humedad, lo que puede limitar la actividad de los fagos (Kering y col., 2019).

Se ha visto que la persistencia del fago puede mejorarse en la filósfera y la rizósfera si van acompañados de un hospedero viable, basado en la capacidad de autorreplicación.

El suministro de fagos a través del suelo es otro enfoque que se ha analizado para mejorar la persistencia de los fagos en la filósfera. En relación con esto, existe una ruta de translocación del fago desde las raíces a las hojas de las plantas a través del sistema vascular, posiblemente vía xilema. En la última década se ha demostrado que los fagos

de *R. solanacearum*, *X. perforans* y *X. euvesicatoria* pueden translocar en plantas de tomate (Iriarte y col., 2012), aunque el fenómeno también se ha reportado en otras especies vegetales como melón, espinos de fuego y manzana, en esta última además se ha informado que los fagos podrían movilizarse desde las hojas a las raíces (Koložsváriné Nagy y col., 2015; Rahimi-Midani & Choi, 2020). Los estudios en esta materia indican que la translocación puede estar influenciada por el tipo de fago, la edad, la salud, el tamaño, especie de planta y posiblemente el tipo de suelo en el que esté creciendo (Ward & Mahler, 1982). Se sugiere que, si los fagos pueden translocar sistémicamente en la planta, entonces posiblemente pueden emplearse después de la infección por un patógeno bacteriano aplicándolos al suelo circundante de una planta en lugar de la pulverización foliar (Buttimer y col., 2017).

#### **1.7.4. Baja consistencia de control de la enfermedad en comparación a los pesticidas convencionales**

Mientras algunos fagos exhiben un rango de hospedero limitado, otros fagos incluso podrían infectar diferentes géneros bacterianos (Dy y col., 2018). Pese al potencial riesgo de afectar a las poblaciones bacterianas no objetivo, como la microbiota nativa, el impacto de esto podría ser mínimo (Kering y col., 2019).

Estudios han demostrado que el momento de la aplicación de los bacteriófagos es esencial para extender la persistencia de altas poblaciones en las proximidades de la bacteria objetivo para promover el control biológico (Jones y col., 2012). Por ejemplo, la estrategia de biocontrol puede consistir en la aplicación de fagos para reducir una población de patógenos preexistente o una aplicación a lo largo de la temporada, anticipada a su aparición para evitar la proliferación.

En el marco de la agricultura sostenible, el manejo integrado de plagas propone combatir plagas y enfermedades de las plantas utilizando todos los métodos disponibles, minimizando al mismo tiempo la aplicación de pesticidas químicos (Stenberg, 2017). Dicho esto, para lograr un control efectivo de la enfermedad, el control biológico de bacterias fitopatógenas con fagos puede integrarse a los métodos tradicionales. En la práctica, el manejo integrado de plagas reduciría no solo la exposición de los agricultores, los consumidores y el medio ambiente a compuestos tóxicos, sino también los problemas causados por bacterias resistentes a los pesticidas. No obstante, la compatibilidad de fagos con otros pesticidas químicos no se ha examinado a fondo, por lo que se requerirá de pruebas de viabilidad adicionales (Frampton y col., 2012).

Finalmente, en todos los casos es importante considerar que cada sistema patógeno-planta es único y debe estudiarse a profundidad para optimizar la estrategia de biocontrol deseada.

En Chile, actualmente existen un reducido número de proyectos afines al biocontrol con bacteriófagos de bacterias fitopatógenas. Estos se enfocan en *P. syringae* pv. *actinidiae*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Junto a esto, existen solo dos solicitudes de patente en el Instituto Nacional de Propiedad Industrial (INAPI), las cuales no hacen referencia al tratamiento de la Peca Bacteriana. Estos antecedentes impulsan la investigación de un método de control efectivo basado en la aplicación de bacteriófagos contra cepas de *Pst* presentes en el país.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Caracterizar bacteriófagos como potenciales agentes de biocontrol de cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* aisladas desde cultivos de tomate en Chile.

### **2.2. Objetivos específicos**

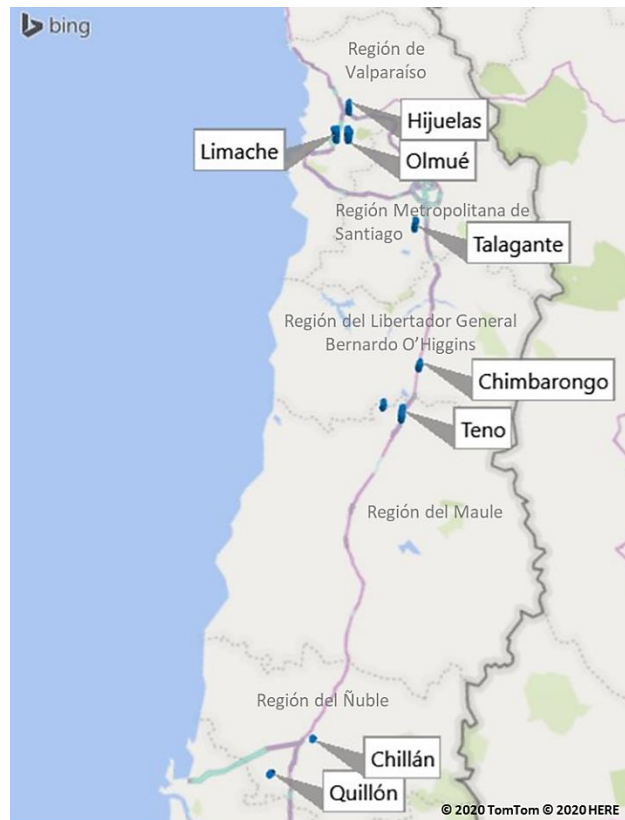
1. Aislar bacteriófagos de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.
2. Caracterizar morfológica y molecularmente bacteriófagos de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.
3. Caracterizar el potencial de biocontrol de los bacteriófagos.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y condiciones de cultivo

Un total de 77 cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), con distinto nivel de tolerancia a cobre y estreptomycin, se utilizaron para el aislamiento y caracterización de los bacteriófagos del presente estudio. Tales cepas provienen de muestras de huertos de tomate bajo invernadero y campo abierto, ubicados a lo largo de cinco regiones de la Zona Central de Chile, y fueron aisladas entre los meses de mayo y diciembre del año 2018 (Figura 3).



**Figura 3. Distribución geográfica de los huertos de tomates muestreados para la obtención de cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en Chile. Aislamiento realizado el año 2018.**

Las 77 cepas de *Pst* fueron previamente aisladas, codificadas y caracterizadas bajo el Proyecto Fondecyt Postdoctorado N°3180500 dirigido por la Dra. Pamela Córdova Vargas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Origen y concentración mínima inhibitoria (CMI) de cobre y estreptomina de las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) utilizadas en este estudio.

SITIO DE AISLAMIENTO		CEPA DE <i>Pst</i>	CMI COBRE (µg/mL)	CMI ESTREPTOMICINA (µg/mL)
REGIÓN DE CHILE	LOCALIDAD			
Valparaíso	Hijuelas	N1_12	80	12
		N10_3	64	250
		N2_2	80	15
		N4_1	32	12
		N4_11	64	6
		N4_8	64	15
		N9_7	32	15
		N9_9	32	15
		NII_1	64	15
		NII_2	64	4
	NIV_3	64	4	
	Limache	FL13	32	100
		FL16	32	12
		FL17	64	250
		FL2	100	500
		FL3	80	500
		FL4	32	4
		FL5	32	4
		FL8	32	15
		Jv 8r	32	100
		Jv 9r	100	250
		JV I	64	50
		JV II 2	32	100
		JV III 2	64	15
		JV IV 1	64	50
		JV IV 2	100	250
		JV V 1	32	100
		JV V 2	64	250
		JV VI 3	80	100
	TJ 4_2	64	20	
	TJ 5_5	64	15	
	Olmué	17LP	80	2
		A2_4	64	15
A2_5		32	4	
A2_6		64	250	
AA1_1		32	50	
AI_1		32	6	
AII_1		64	100	
AII_2	80	50		
Metropolitana de Santiago	Talagante	1FC	32	4

**Tabla 1.** (continuación)

SITIO DE AISLAMIENTO		CEPA DE <i>Pst</i>	CMI COBRE (µg/mL)	CMI ESTREPTOMICINA (µg/mL)
REGIÓN DE CHILE	LOCALIDAD			
Libertador General Bernardo O'Higgins	Chimbarongo	LO2.3	80	100
		LO3.4	64	20
		LO4.1	64	500
		LO4.2	100	100
		LO5.2	64	20
Maule	Teno	14M	32	2
		40M	80	250
		Azheinz24	64	4
		Azheinz25	32	2
		Azheinz26	64	15
		L1_1	100	500
		L1_9	80	500
		L3_12	64	2
		LI_1	64	10
		LI_2	64	100
		LI_3	64	100
		T1_9	100	15
		T11	80	500
VCMAgpz2	64	100		
Ñuble	Chillán	27Ch	32	15
		29Ch	32	15
		42Ch	64	15
		43Ch	32	10
	Quillón	HO medano 27	100	15
		HO medano 28	80	15
		HO4.7	80	15
		HO6.1	32	4
		HO6.2	32	2
		HO6.5	32	10
		HO6.6	32	4
		HO7.10	80	6
		HO7.13	64	15
		HO7.14	100	2
		HO7.15	80	6
		HO7.17	100	2
		HO7.18	100	4
HO7.9	80	4		

El cepario de *Pst* se encuentra en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile.

Para propósitos de este estudio, las cepas se consideraron tolerantes a cobre cuando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de este elemento fue mayor a 48 µg/mL (Nakajima y col., 2002), tolerantes a estreptomicina cuando la CMI de este antibiótico fue mayor a 25 µg/mL y muy tolerantes cuando fue mayor a 200 µg/mL (Pernezny y col., 1995; Sundin & Bender, 1993).

Estas se mantuvieron almacenadas a -80 °C en caldo nutritivo (extracto de carne 0,3%(m/v), peptona 0,5%(m/v)) con glicerol en proporción 1:1. Para recuperarlas, se realizó el aislamiento de una colonia en placa de agar B de King (agar 1,5%(m/v), glicerol 1%(v/v), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,6 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6,1 mM, proteosa peptona 2%(m/v); pH 7), la cual se seleccionó para crecer en caldo nutritivo a 28 °C con agitación constante de 200 rpm durante toda la noche (16 horas aprox.), posteriormente, se almacenó a 4 °C hasta su utilización (King y col., 1954). Para los cultivos experimentales, se utilizaron inóculos de las cepas guardadas a 4 °C, las cuales fueron crecidas en caldo nutritivo como se mencionó anteriormente.

## **3.2. Bacteriófagos**

### **3.2.1.1. Toma de muestras y enriquecimiento**

El año 2018 se colectaron muestras de aguas de regadío y tierra de huertos de tomate provenientes de los mismos lugares muestreados para la obtención de cepas de *Pst* (Figura 3). Además, se colectó muestras de aguas servidas provenientes de las plantas de tratamiento La Farfana y El Trebal, ubicadas en las comunas de Maipú y Padre Hurtado, respectivamente, en la Región Metropolitana de Santiago. A partir de estas muestras se realizaron enriquecimientos (aumento de título) con el fin de aislar bacteriófagos mediante un protocolo modificado de Van Twest & Kropinski (2009).

Para el enriquecimiento de los posibles bacteriófagos presentes en las muestras de agua, se centrifugó 10 mL de cada muestra de agua a 7.000 g por 15 min a temperatura ambiente y se filtró con filtros de jeringa de 0,2 µm de poro (Sartorius™ Minisart™) para remover células bacterianas. Luego, se agregó caldo nutritivo a la muestra de agua filtrada en proporción 1:1 y se inoculó con 100 µL de un cultivo de cepa de *Pst* candidata a hospedera. Se incubó a 28 °C con agitación constante de 200 rpm durante toda la noche y posteriormente se centrifugó a 7.000 g y 4 °C por 10 min. Finalmente, el sobrenadante enriquecido con fagos (SEF) se filtró con filtros de jeringa de 0,2 µm de poro y se guardó a 4 °C hasta su uso.

Para el enriquecimiento de los posibles bacteriófagos presentes en las muestras de tierra, a 25 mL de submuestra de tierra se le añadieron 25 mL de tampón AFT (NaCl 0,14 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 2,6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 7,5 mM; pH 7,2) y la mezcla se agitó en vórtex por 5 min. Esta se mantuvo a 28 °C con agitación constante de 150 rpm por toda la noche y luego se centrifugó a 6.000 g por 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se filtró con filtros de jeringa de 0,2 µm de poro y a 10 mL se le agregó caldo nutritivo en proporción 1:1. Luego, se inoculó con 100 µL de cultivo de cepa de *Pst* candidata a hospedera y se incubó a 28 °C con agitación constante de 200 rpm por toda la noche y posteriormente se centrifugó a 7.000 g y 4 °C por 10 min. El sobrenadante SEF se filtró con filtros de jeringa de 0,2 µm de poro y se guardó a 4 °C hasta su uso.

### **3.2.1.2. Detección por ensayo de microgota**

La presencia de bacteriófagos contenidos en el sobrenadante SEF se determinó a través de “ensayo de microgota” (Kutter, 2009). Para esto, a 3,5 mL de agar nutritivo blando (agar 0,7%(m/v), extracto de carne 0,3%(m/v), peptona 0,5%(m/v); precalentado a 40 °C) se le añadieron 150 µl de cultivo de cepa hospedera a una densidad óptica a 600

nm ( $DO_{600}$ ) de 0,3 (equivalente a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL aprox.) y, luego de mezclar en agitador vórtex, se vertió en placas de agar nutritivo (agar 1,5 % (m/v), extracto de carne 0,3% (m/v), peptona 0,5% (m/v),) generando un doble agar, el cual se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 20 min. Después, se aplicaron 10  $\mu$ L del enriquecido sobre el césped bacteriano inmaduro y se incubó a 28 °C entre 24 y 48 horas. Se consideró que el sobrenadante SEF contenía fagos si se observaba placas de lisis o zonas de aclaramiento por la inhibición del crecimiento bacteriano. Nota: las zonas de aclaramiento se visualizan como áreas circulares más grandes que una placa de lisis y que pueden formarse por lisis confluyente.

### **3.2.1.3. Aislamiento y obtención de *stocks***

Para el aislamiento de bacteriófagos contenidos en el sobrenadante SEF positivo al “ensayo de microgota”, se realizó un protocolo modificado de Sambrook & Russell (2001). A partir de un sobrenadante SEF se hizo diluciones seriadas ( $10^0$ - $10^{-8}$ ) y se agregó 10  $\mu$ L de cada dilución sobre césped bacteriano inmaduro en doble agar, el cual se incubó a 28 °C entre 24 y 48 horas. Transcurrido ese tiempo, con una pipeta de Pasteur se picó una placa de lisis aislada producida por alguna(s) de las diluciones plaqueadas y se resuspendió en 150  $\mu$ L de tampón SM (gelatina 0,01% (m/v),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  8 mM, NaCl 100 mM, Tris 50 mM; pH 7,5). Posteriormente, se agitó en vórtex y se dejó difundir por 2 horas a 4 °C. Esta muestra (primer aislamiento) se centrifugó a 7.000 *g* y 4 °C por 15 min y se utilizó para volver a aislar una única placa de lisis 2 veces (mediante el procedimiento anterior) con el fin de asegurar la clonalidad del fago aislado. Con la muestra obtenida del último aislamiento se realizó un enriquecimiento para obtener un *stock* del fago aislado. Este consistió en inocular 150  $\mu$ L de cultivo de cepa hospedera a 15 mL de caldo nutritivo y se infectó con 150  $\mu$ L

de muestra obtenida del último aislamiento. Se incubó a 28 °C con agitación constante de 200 rpm por toda la noche y posteriormente se centrifugó a 7.000 g y 4 °C por 10 min. Finalmente, el sobrenadante se filtró con filtros de jeringa de 0,2 µm de poro y el *stock* se guardó tanto a 4 °C como a -80 °C con 1/3 de glicerol hasta su uso.

#### **3.2.1.4. Cuantificación de fagos infecciosos por el método de plaqueo de microgotas**

Para determinar la concentración de partículas de fago infecciosas, se utilizó un protocolo adaptado de Mazzocco y col. (2009) denominado “plaqueo de microgotas”. El procedimiento consistió en realizar diluciones seriadas de cada *stock* de fago y se aplicó 10 µL de cada una sobre césped bacteriano inmaduro, de la respectiva cepa hospedera, en doble agar. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 min y luego se incubó por toda la noche a 28 °C. Finalmente, se realizó el conteo de placas de lisis para determinar el título en unidades formadoras de placa (UFP) por mL.

#### **3.2.1.5. Producción de *stocks* de trabajo**

Con el fin de lograr volúmenes suficientes de bacteriófagos para su utilización en los distintos experimentos, se realizó enriquecimientos según un protocolo adaptado de Sambrook & Russell (2001). A partir de un cultivo de cepa hospedera crecido toda la noche se preparó una suspensión bacteriana de una dilución 1/10 en caldo nutritivo, la cual se incubó a 28 °C con agitación constante de 200 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600}$  0,3. Luego, se agregó el respectivo fago al cultivo a una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0,01 y se dejó incubando en las condiciones de cultivo ya mencionadas por toda la noche. El cultivo se centrifugó a 7.000 g y 4 °C por 10 min y el sobrenadante resultante se filtró con filtros de jeringa de 0,2 µm de poro. Finalmente, se

obtuvo *stocks* con un título de  $10^{10}$  UFP/mL aprox., los cuales se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

### **3.3. Caracterización morfológica de los bacteriófagos**

#### **3.3.1. Susceptibilidad a solvente orgánico (cloroformo)**

Para determinar si los bacteriófagos tienen membrana lipídica, se evaluó el efecto del cloroformo sobre la estabilidad de los viriones. Para esto, se añadió 50 µL de cloroformo a 500 µL de fago y luego se agitó en vórtex por 1 minuto, después de este tiempo, las muestras se centrifugaron a 5.000 *g* por 10 min. Posteriormente, se determinó la concentración de partículas de fago infecciosas en paralelo de los fagos tratados con cloroformo y los no tratados (control). Los fagos se consideraron susceptibles cuando el título disminuyó en más de tres órdenes de magnitud (Higuera y col., 2013).

#### **3.3.2. Microscopía electrónica de transmisión y análisis morfológico de las partículas virales**

Los bacteriófagos se examinaron mediante el microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 perteneciente a la Unidad de Microscopía Avanzada de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las muestras se prepararon según Higuera y col. (2013). Brevemente, los pasos de la tinción negativa consistieron en colocar 15 µL de fago en una grilla de carbón-cobre por 30 s. Luego, se añadió 15 µL de acetato de uranilo 2%(m/v) por 1 min. Las grillas se secaron a temperatura ambiente hasta observar.

Las imágenes obtenidas se analizaron para estimar el tamaño de las partículas virales mediante el *software* Adobe® Photoshop® CS5. Según la morfología, los bacteriófagos se clasificaron tentativamente siguiendo las directrices del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (Fauquet y col., 2005).



### **3.4. Caracterización molecular de los bacteriófagos**

#### **3.4.1. Extracción y purificación de ácido nucleico**

La extracción y purificación del ácido nucleico de los bacteriófagos se realizó por el método fenol-cloroformo, adaptado de Higuera y col. (2013). Se concentró 20 mL de fago con título superior a  $10^8$  UFP/mL en ultracentrífuga a 100.000 g por 1 hora a 4 °C. Luego, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 200 µL de tampón SM. Se agregó 2 µL de ADNasa I (Promega), 20 µL de tampón de la enzima, 2 µL ARNsa A (Promega) y se dejó a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, se agregó 0,6 µL de proteinasa K (20 mg/mL), 11 µL de dodecilsulfato sódico 10%(m/v) y se mantuvo a 65 °C por 1 hora. Para extraer el material genético se añadieron 2 volúmenes de fenol saturado y se agitó en vórtex por 30 s, luego se adicionó 2 volúmenes de cloroformo y se agitó en vórtex por 30 s. La mezcla se centrifugó a 10.000 g por 15 min y se recuperó la fase acuosa. Este paso se repitió 3 veces, hasta no ver impurezas en la interfase. Luego, se precipitó el material genético agregando 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol puro. Se centrifugó a 15.000 g por 10 min y se descartó el sobrenadante, se lavó el *pellet* con 500 µL de etanol 70%(v/v) frío y se centrifugó a 15.000 g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol para luego resuspender el *pellet* en 100 µL de agua libre de nucleasas. Los ácidos nucleicos purificados se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

### 3.4.2. Determinación del tipo de ácido nucleico

#### 3.4.2.1. Digestión enzimática de genomas

Para determinar si los ácidos nucleicos de los bacteriófagos corresponden a ADN o ARN, estos se sometieron a digestión enzimática por nucleasas siguiendo un protocolo adaptado de Cuppels (1983). Para el tratamiento con desoxirribonucleasa; 1  $\mu\text{L}$  de los ácidos nucleicos purificados se trataron con 1  $\mu\text{L}$  de ADNasa I (Promega) más 20  $\mu\text{L}$  del tampón de la enzima. Para el tratamiento con ribonucleasa; 1  $\mu\text{L}$  de los ácidos nucleicos purificados se trataron con 2  $\mu\text{L}$  de ARNasa A (Promega) y se llevó a un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  con agua libre de nucleasas. Como control de digestión de la enzima se utilizó el ARN ribosomal de *Pseudomonas syringae*. Las muestras se incubaron a 37 °C por 2 horas en termociclador.

Posteriormente, los resultados de la digestión se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa, cuyas muestras se prepararon como se indica a continuación. Las muestras del tratamiento con ADNasa I consistieron en 10  $\mu\text{L}$  de ácido nucleico digerido y 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga, las muestras del tratamiento con ARNasa A consistieron en 6  $\mu\text{L}$  de ácido nucleico digerido, 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga y 4  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Como control de integridad del genoma se utilizó una muestra del ácido nucleico de cada fago sin digerir, compuesta de 3  $\mu\text{L}$  de ácido nucleico, 1  $\mu\text{L}$  de tampón de carga y 2  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Como marcador de peso molecular se utilizó lambda *HindIII* (Thermo Scientific™) según las instrucciones del fabricante. Luego, se cargaron las muestras y se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0,6%(m/v) (30 mL de agua destilada, 0,18 g de agarosa, 2  $\mu\text{L}$  de marcador de ácidos nucleicos SafeView, 0,6 mL de tampón TAE 50X (ácido acético 1 M, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódico 50 mM, Tris 2 M)) en tampón TAE (ácido acético 20 mM, EDTA disódico 1 mM, Tris 40

mM), corrido por 30 min a 100 V. Finalmente, el gel se observó en transiluminador a 290 nm.

#### **3.4.2.2. Estimación de tamaño del genoma**

Para estimar el tamaño del genoma de los bacteriófagos se realizó electroforesis en gel de agarosa, la cual permitió comparar las migraciones de los genomas con el marcador de peso molecular (Prior y col., 2007). Tanto la preparación de las muestras de genoma de cada fago como la electroforesis en gel de agarosa al 0,6%(m/v) se realizaron según lo descrito anteriormente. Como marcador de peso molecular se utilizó lambda *HindIII* (Thermo Scientific™) según las instrucciones del fabricante.

El gel resultante se analizó en el *software* Adobe® Photoshop® CS5 y se realizó una curva de calibración graficando el logaritmo del peso molecular de los fragmentos de ADN del marcador de peso molecular frente a la distancia recorrida. Finalmente, la ecuación obtenida permitió estimar el tamaño del genoma de cada fago según la distancia recorrida en el gel.

#### **3.4.2.3. Análisis directo del genoma con enzima de restricción (DGREA)**

Con el fin de diferenciar cada bacteriófago según el patrón de digestión de su genoma, estos se trataron con enzima de restricción. Para esto, se empleó un protocolo de análisis directo del genoma con enzima de restricción (DGREA, por sus siglas en inglés) adaptado de Fuenzalida y col. (2006). El protocolo consistió en tratar 3 µL de ADN de cada fago con 1 µL de la enzima de restricción *TaqI* (Thermo Scientific™), 2 µL del tampón de la enzima, 2 µL de albúmina de suero bovino 0,1%(m/v) y se llevó a un volumen final de 20 µL con agua libre de nucleasas para luego incubar a 65 °C por 3

horas en baño termostático. Posteriormente, se agregó 5  $\mu$ L de Proteinasa K (20 mg/mL) a cada tubo y se incubó a 37 °C por 1 hora en termociclador.

La electroforesis de los productos de digestión se realizó en gel de poliacrilamida al 8%(m/v) (3,25 mL de agua bidestilada, 6,6 mL de acrilamida 15%(m/v)-bisacrilamida 0,4%(m/v), 2,5 mL de tampón TBE 5X (Tris 0,45 M, ácido bórico 0,45 M, EDTA disódico 0,01 M), 65  $\mu$ L de persulfato de amonio 25%(m/v), 12,5  $\mu$ L de tetrametiletilendiamina (TEMED)) en tampón TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA disódico 2 mM), corrido a 100 V por 2 horas. Como marcador del peso molecular se utilizó 100 bp DNA Ladder (Promega). El gel se reveló mediante protocolo de tinción con nitrato de plata (Espejo & Escanilla, 1993). Este consistió en agregarle una solución de fijado (50 mL de solución con etanol 10%(v/v), ácido acético 0,5%(v/v) en agua bidestilada) y se llevó al microondas por 10 s a su máxima potencia. A continuación, se incubó el gel en solución de tinción (50 mL de agua bidestilada, 0,5 mL de nitrato de plata (180 mg/mL)) y se llevó al microondas por 10 s. Después, se retiró la solución de tinción y se lavó el gel 2 veces con agua bidestilada por 10 s. Se agregó la solución de revelado (30 mL de agua bidestilada, 20 mL de hidróxido de sodio 7,5%(m/v), 0,5 mL de formaldehído 37%(v/v)), se llevó al microondas por 20 s y se agitó suavemente hasta visualizar las bandas. Por último, para fijar el gel, este se lavó con agua bidestilada y luego se agregó la solución de fijado.

Para la construcción del dendrograma, se distinguieron bandas (fragmentos de ADN) con migración similar y diferente que, luego, se identificaron por su migración relativa en el gel utilizando el *software* GelAnalyzer 19.1 (GelAnalyzer, 2020). Los datos generados se trabajaron en el *software* R (R Project, 2020) para construir una matriz de similitud, calculada utilizando el coeficiente de asociación de Jaccard. Dicha matriz se utilizó para

obtener el dendrograma aplicando el algoritmo de método de pares no ponderados utilizando media aritmética (UPGMA, por sus siglas en inglés) como método de agrupamiento jerárquico y el coeficiente de correlación cofenética (CCC) como medida de la distorsión. Finalmente, se determinó el número óptimo de clústeres según el método del codo (Fuenzalida y col., 2006; Palacio y col., 2020).

### **3.5. Potencial de biocontrol de los bacteriófagos**

#### **3.5.1. Rango de hospedero por ensayo de microgota**

Para determinar el rango de hospedero de los 10 bacteriófagos, se evaluó la capacidad de lisis en las 77 cepas de *Pst* mediante “ensayo de microgota” sobre césped bacteriano. Para esto, se hizo un césped en doble agar de cada cepa, al cual se le colocó 10 µL de *stock* de cada fago (todos a un título de magnitud  $10^8$  UFP/mL) para evaluar la susceptibilidad de las bacterias y se incubó a 28 °C por toda la noche. Al día siguiente se examinó, a simple vista, la presencia y apariencia de zonas de aclaramiento con las cuales se generó un perfil de lisis para cada fago. Las zonas de aclaramiento se clasificaron cualitativamente en: transparente (++) , turbia (+) o ausente (-) (Kutter, 2009).

Los perfiles de lisis generados se utilizaron para realizar un análisis de agrupamiento jerárquico con el *software* R, el cual permitió agrupar los fagos considerando la capacidad de lisar o no lisar cada cepa. La matriz de similitud y su representación en un dendrograma se realizaron de la misma forma descrita anteriormente. Finalmente, se determinó el número óptimo de clústeres según el método del codo y el análisis de rango de hospedero se representó en un mapa de calor (Palacio y col., 2020).

### 3.5.2. Translocación de bacteriófagos en plantas de tomate

Para la evaluación de la translocación de los bacteriófagos se utilizó plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Cal Ace (Ergo®) y se siguió un protocolo adaptado de Iriarte y col. (2012). Las plantas de tomate se crecieron bajo invernadero (28 °C y 23% de humedad relativa promedio), en almacigueras con sustrato compuesto de tierra de hojas (Anasac®) en combinación con perlita y vermiculita autoclavada según las instrucciones recomendadas por el fabricante, hasta alcanzar el desarrollo de hojas secundarias. Posteriormente, se les removieron los cotiledones (cuando estaban presentes) y se traspasaron a medio hidropónico (agua de llave autoclavada), protegido de los rayos solares, donde se aclimataron por 48 horas. Transcurrido este tiempo, al medio hidropónico se le inoculó un volumen de fagos para alcanzar el orden de  $10^8$  UFP/mL. Los ensayos se realizaron en triplicado y por separado con los fagos  $\Phi 1$ ,  $\Phi 6$ ,  $\Phi 7$ ,  $\Phi 8$ ,  $\Phi 12$  y  $\Phi 18$ , y se tomaron muestras a 24 y 48 horas posterior a la adición de los fagos. En cada uno se tomó muestra de medio hidropónico y de tejido vegetal para determinar el peso fresco en gramos (g pf) de tallo inferior y superior (1 cm de longitud) y de las primeras hojas primarias y secundarias. Luego, cada muestra de tejido se molió con pistilo en microtubo de 2 mL y se mezcló con 1 mL de tampón SM (macerado), se agitó en vórtex por 1 min y se centrifugaron las muestras a 7.000 g por 10 min. El sobrenadante sirvió como muestra correspondiente a la detección directa y se le determinó la concentración de partículas de fago infecciosas por el método de “plaqueo de microgota” y luego se compararon las morfologías de las placas de lisis para comprobar que era el mismo fago.

Considerando la posibilidad que el título de la muestra purificada mediante detección directa sea menor al límite de detección del método de “plaqueo de microgotas” (100

UFP/mL, que equivalen a 100 UFP/g pf), se determinó adicionalmente la presencia o ausencia de los bacteriófagos recuperados desde los distintos tejidos vegetales mediante “ensayo de microgota”. Para esto, se empleó un protocolo adaptado de Kolozsváriné Nagy y col. (2015) denominado detección por enriquecimiento. Este consistió en agregar 500  $\mu$ L de macerado de tejido vegetal con fago a 500  $\mu$ L de cultivo de bacteria hospedera ( $DO_{600}$  0,3) y se incubó a 28 °C con agitación constante de 200 rpm toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 10.000 g por 10 min y luego se aplicó 10  $\mu$ L de sobrenadante sobre césped de bacteria hospedera inmaduro en doble agar. Se incubó a 28 °C por toda la noche y al día siguiente se examinó el césped en busca de zonas de aclaramiento.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Aislamiento de bacteriófagos y morfología de las placas de lisis

La presencia de bacteriófagos contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) solo se detectó en muestras de agua provenientes desde las plantas de tratamiento de agua La Farfana y El Trebal (comunas de Maipú y Padre Hurtado, respectivamente, Región Metropolitana de Santiago) y de una acequia ubicada en Teno (Región del Maule) obtenidas el año 2018. Dentro de las cepas de *Pst* ensayadas, las cepas 42Ch, AI\_1, AII\_2 y NII\_2 permitieron el aislamiento de 10 fagos, provenientes de una placa de lisis única (clones). Los fagos fueron nombrados siguiendo las pautas de Adriaenssens & Rodney Brister (2017) y, paralelamente, recibieron un alias para facilitar la nominación en el presente estudio (Tabla 2).

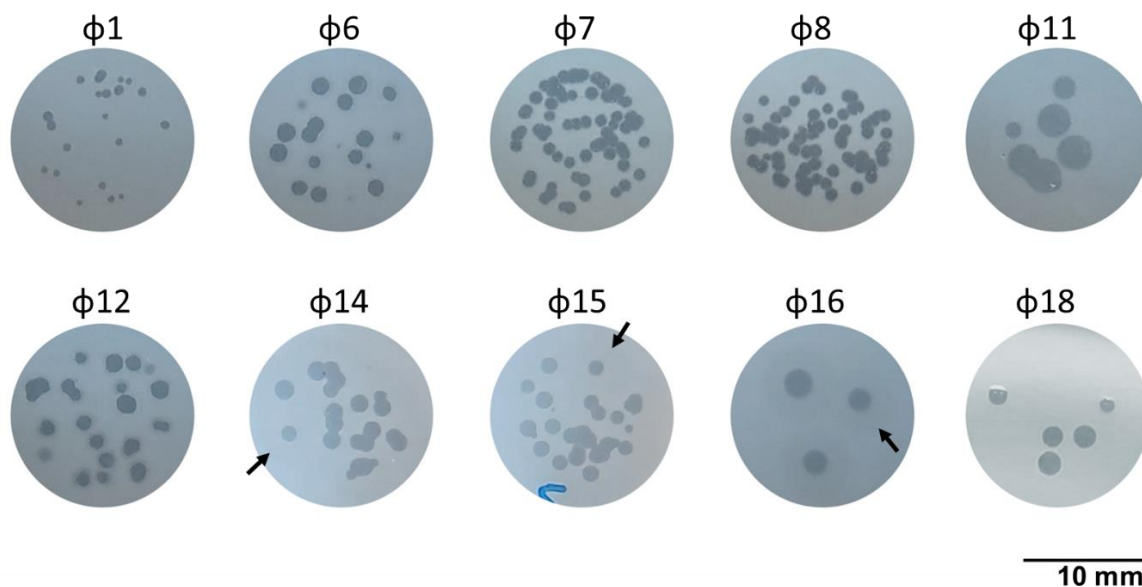
En cuanto a la morfología de las placas, los diez bacteriófagos aislados produjeron placas de lisis transparentes sobre césped bacteriano de la respectiva cepa hospedera luego de, al menos, 8 horas. El diámetro de las placas de lisis observadas se encontró en el rango de los 0,3 y 2,9 mm y, en particular, los fagos  $\Phi$ 14,  $\Phi$ 15 y  $\Phi$ 16 produjeron placas de lisis rodeadas con un halo translúcido que continuó expandiéndose hasta 10, 12 y 6 veces el diámetro, respectivamente, luego de 72 horas desde la aparición de las placas (Figura 4 y Tabla 2).



**Tabla 2.** Nombre, procedencia, cepa hospedera y diámetro de las placas de lisis de los diez bacteriófagos aislados en este estudio.

BACTERIÓFAGO NOMBRE <sup>a</sup>	ALIAS	SITIO DE AISLAMIENTO	FUENTE	CEPA HOSPEDERA	DIÁMETRO PLACA DE LISIS (mm)
Pseudomonas phage Tg6c17	φ1	Padre Hurtado	Agua servida	AII_2	0,4 – 0,8
Pseudomonas phage Tg6c18	φ6	Padre Hurtado	Agua servida	AI_1	0,9 – 1,5
Pseudomonas phage Tg11c30	φ7	Padre Hurtado	Agua servida	NII_2	0,7 – 0,9
Pseudomonas phage Tg10c30	φ8	Padre Hurtado	Agua servida	NII_2	0,8 – 1,0
Pseudomonas phage Tg13c43	φ11	Padre Hurtado	Agua servida	42Ch	1,3 – 2,9
Pseudomonas phage Fg13c38	φ12	Maipú	Agua servida	AI_1	0,7 – 1,6
Pseudomonas phage Tg10c31	φ14	Padre Hurtado	Agua servida	AII_2	0,7 – 2,8
Pseudomonas phage Ag11c31	φ15	Teno	Agua de acequia	AII_2	1,1 – 2,4
Pseudomonas phage Tg9c31	φ16	Padre Hurtado	Agua servida	AII_2	0,3 – 2,3
Pseudomonas phage Tg13c38	φ18	Padre Hurtado	Agua servida	AI_1	1,2 – 2,0

<sup>a</sup>Según las pautas de Adriaenssens & Rodney Brister (2017).



**Figura 4.** Placas de lisis de los bacteriófagos aislados, formadas en doble agar por el método de plaqueo de microgotas. La flecha negra indica la extensión del halo de una placa de lisis.

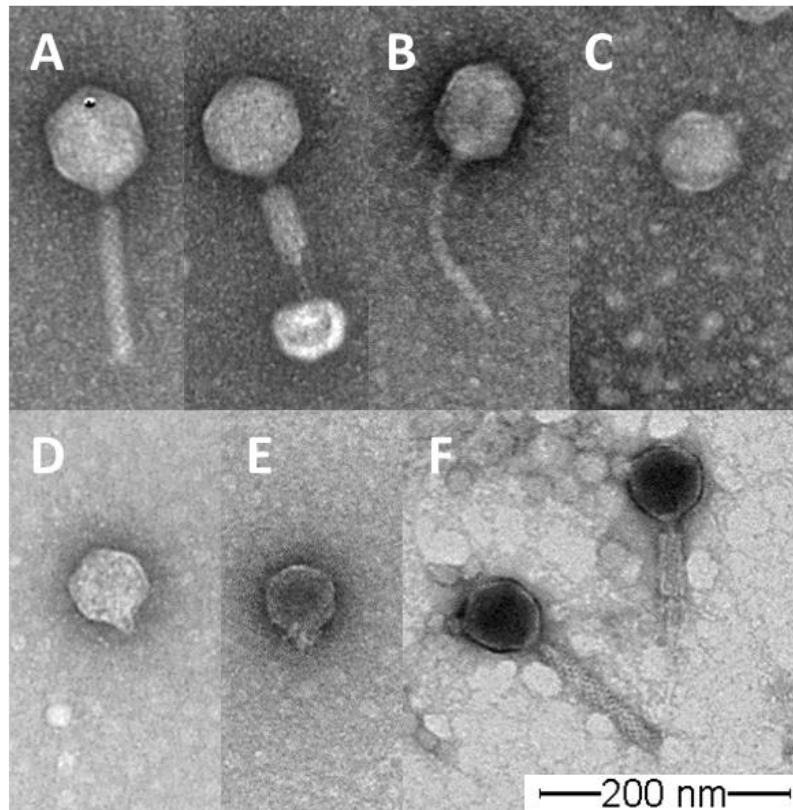
## **4.2. Caracterización morfológica de los bacteriófagos**

### **4.2.1. Presencia de membrana lipídica**

Para determinar la presencia de membrana lipídica en los bacteriófagos aislados, estos fueron tratados con cloroformo. Sin embargo, la exposición a este solvente orgánico mantuvo el título de cada *stock* en el mismo orden de magnitud, indicando que los fagos carecen de membrana.

### **4.2.2. Morfología de los bacteriófagos por microscopía electrónica de transmisión**

Se examinó la morfología de las partículas virales mediante microscopía electrónica de transmisión y se determinó tentativamente el orden y familia a la que pertenecen los bacteriófagos aislados poniendo énfasis en el tamaño, forma de la cabeza y la presencia de cola. Según las dimensiones, la presencia y la forma de la cabeza y de la cola, los fagos observados pertenecen al orden *Caudovirales* (Fauquet y col., 2005). Los fagos  $\Phi 1$  y  $\Phi 16$ , con colas largas y contráctiles, presentan morfología típica de la familia *Myoviridae* (Figura 5 A y F), los fagos  $\Phi 7$  y  $\Phi 8$ , con colas largas no contráctiles, presentan morfología típica de la familia *Siphoviridae* (Figura 5 B) y los fagos  $\Phi 11$ ,  $\Phi 12$ ,  $\Phi 15$  y  $\Phi 18$ , con colas cortas, de la familia *Podoviridae* (Figura 5 C-E). A diferencia de las cabezas de los fagos *Podoviridae*, las cabezas de los fagos *Siphoviridae* y *Myoviridae* fueron ligeramente alargadas. No se obtuvo imágenes de los fagos  $\Phi 6$  y  $\Phi 14$ . El detalle de la clasificación, el diámetro de la cabeza y la longitud de la cola se encuentra en la Tabla 3.



**Figura 5. Microfotografía por transmisión electrónica de seis bacteriófagos representativos. (A)  $\Phi$ 1, con cola extendida (izquierda) y contraída (derecha), (B)  $\Phi$ 7, (C)  $\Phi$ 11, (D)  $\Phi$ 12, (E)  $\Phi$ 15, (F)  $\Phi$ 16, con cola extendida (izquierda) y contraída (derecha). Los bacteriófagos  $\Phi$ 1 y  $\Phi$ 16 con morfología típica de la familia *Myoviridae*,  $\Phi$ 7 de la familia *Siphoviridae*,  $\Phi$ 11,  $\Phi$ 12 y  $\Phi$ 15 de la familia *Podoviridae*.**

**Tabla 3.** Clasificación y dimensiones de los viriones de ocho bacteriófagos examinados por microscopía electrónica de transmisión.

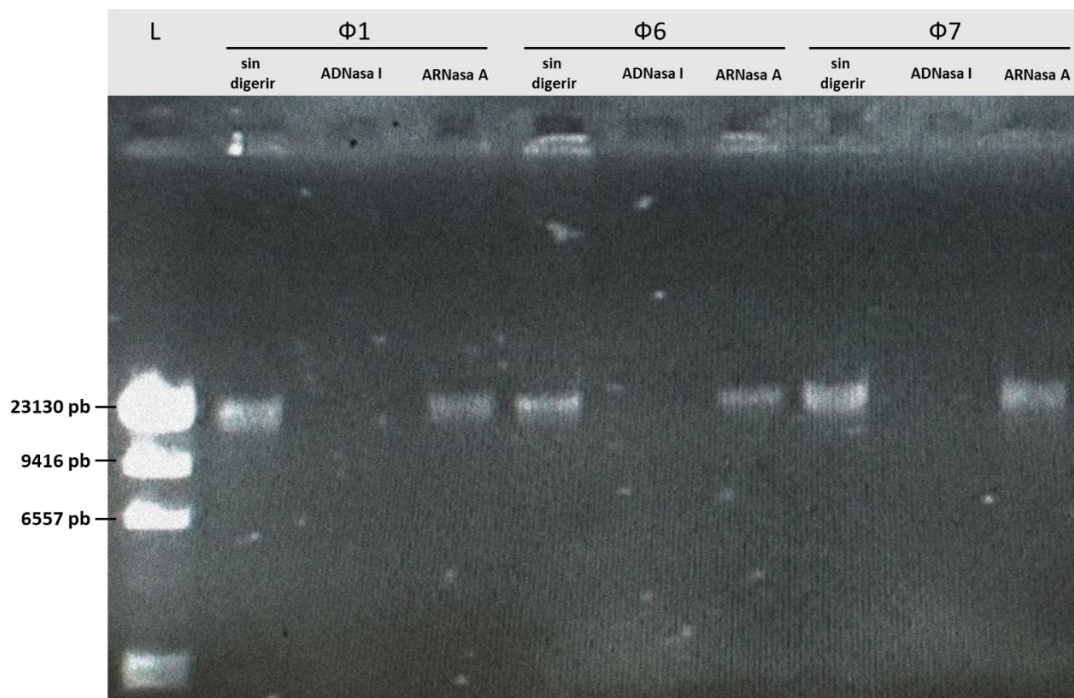
BACTERIÓFAGO	CLASIFICACIÓN TENTATIVA	DIMENSIONES CABEZA <sup>a</sup> (nm)	LONGITUD COLA <sup>a</sup> (nm)
$\Phi$ 1	<i>Myoviridae</i>	77 x 87	137
$\Phi$ 7	<i>Siphoviridae</i>	64 x 81	153
$\Phi$ 8	<i>Siphoviridae</i>	66 x 79	138
$\Phi$ 11	<i>Podoviridae</i>	64 x 63	11
$\Phi$ 12	<i>Podoviridae</i>	60 x 61	12
$\Phi$ 15	<i>Podoviridae</i>	57 x 54	12
$\Phi$ 16	<i>Myoviridae</i>	58 x 66	126
$\Phi$ 18	<i>Podoviridae</i>	64 x 65	12

<sup>a</sup>Valor promedio.

### 4.3. Caracterización molecular de los bacteriófagos

#### 4.3.1. Tipo de ácido nucleico y tamaño del genoma

La naturaleza de los ácidos nucleicos contenidos en las cápsides de los bacteriófagos se determinó por su susceptibilidad a nucleasas. Los ácidos nucleicos de todos los fagos fueron susceptibles a ADNasa I, pero no susceptibles a ARNasa A, como se representa en la Figura 6. En consecuencia, el genoma de los diez fagos aislados se compone de ADN.



**Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de los genomas de tres bacteriófagos tratados con nucleasas para determinar la naturaleza de los ácidos nucleicos.** Los genomas de los bacteriófagos Φ1, Φ6 y Φ7 se trataron con las enzimas ADNasa I y ARNasa A. La ausencia de banda en los carriles ADNasa I indica la susceptibilidad de los genomas a esta enzima. Como control de integridad del genoma, se utilizaron los genomas sin digerir. "L" corresponde al marcador de peso molecular lambda *Hind*III.

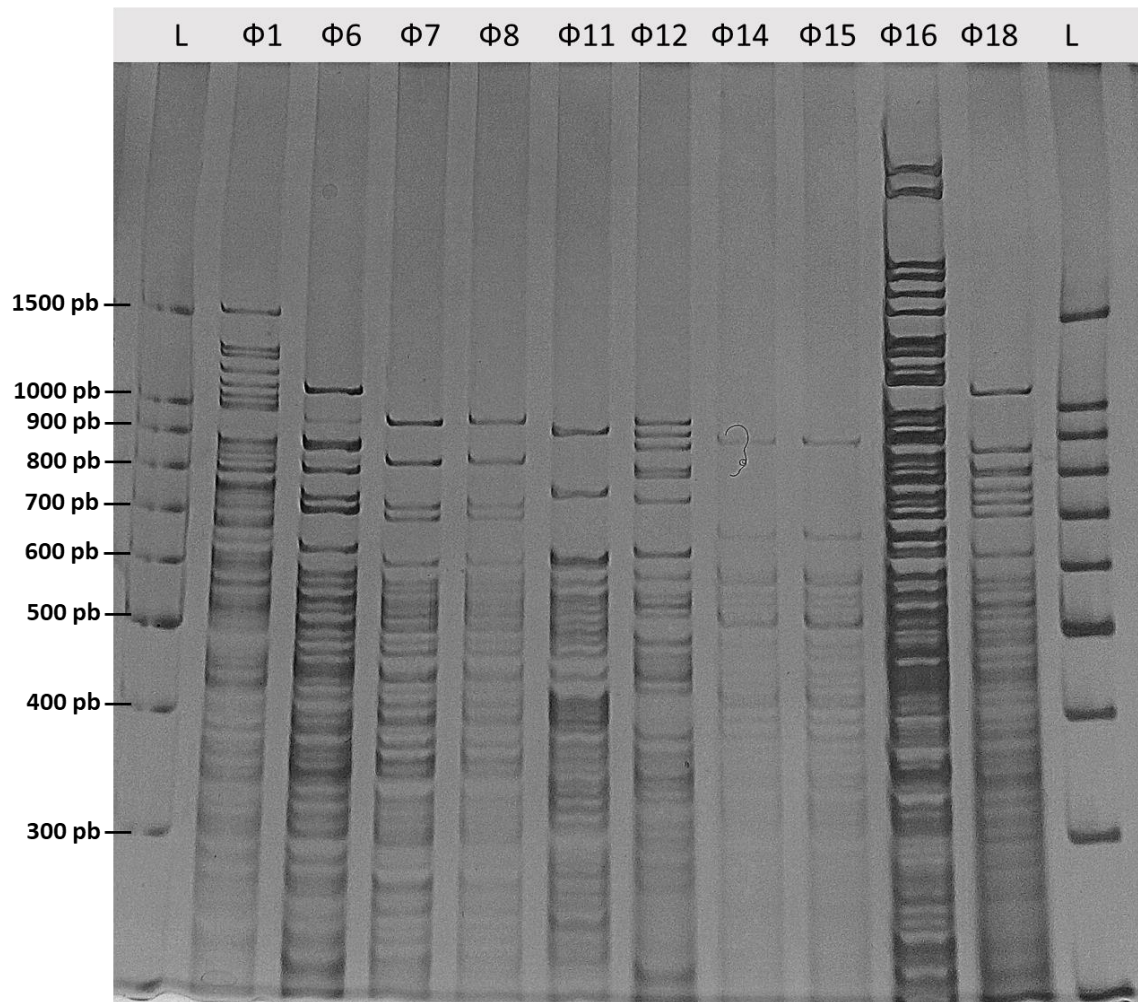
Además, se estimó el tamaño del genoma de cada fago de acuerdo con la movilidad relativa respecto al marcador de peso molecular por electroforesis en gel de agarosa y análisis computacional. El tamaño estimado de los genomas se encuentra en el rango entre 18 a 27 kb (Tabla 4).

**Tabla 4.** Tamaño estimado del genoma de cada bacteriófago según la movilidad relativa respecto al marcador de peso molecular en gel de agarosa.

BACTERIÓFAGO	TAMAÑO ESTIMADO DEL GENOMA (kb)
φ1	21
φ 6	24
φ 7	22
φ 8	24
φ 11	19
φ 12	18
φ 14	17
φ 15	18
φ 16	27
φ 18	23

#### 4.3.2. Análisis de patrones de restricción de genomas

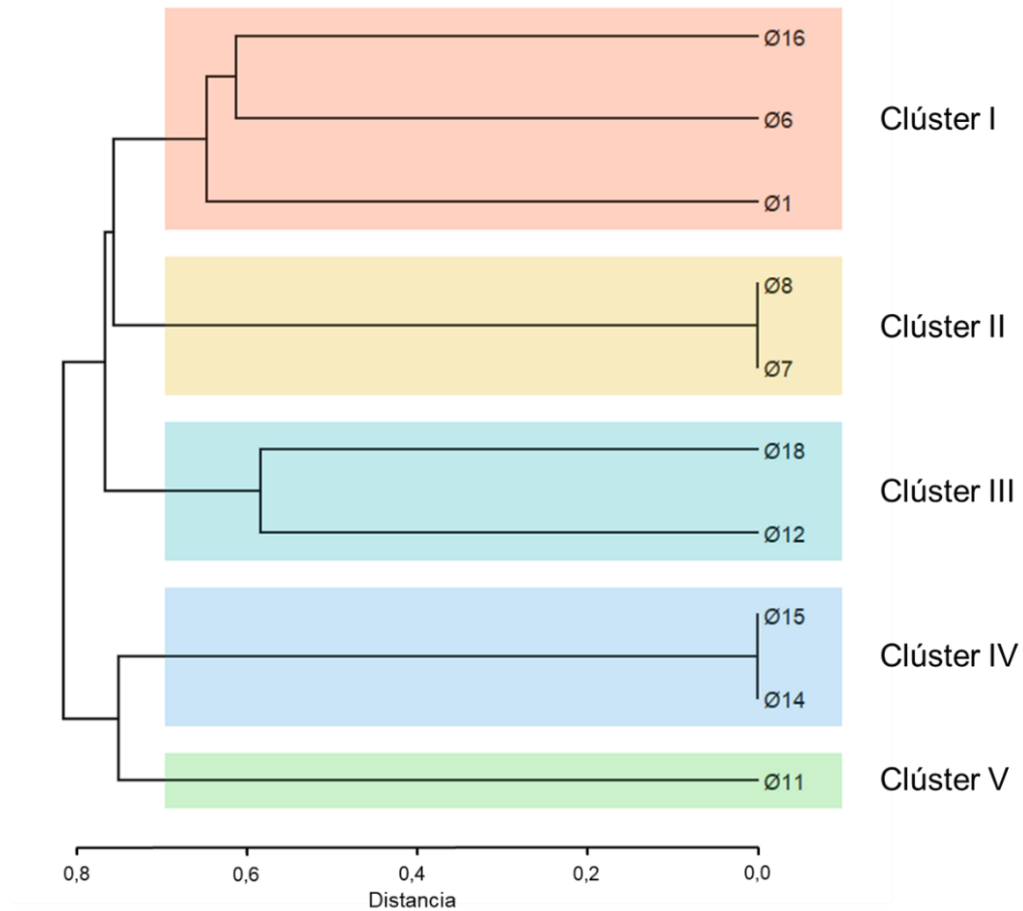
El análisis directo del genoma con enzima de restricción (DGREA) proporciona una huella genética con los fragmentos de ADN, permitiendo analizar la similitud entre cada bacteriófago. Se obtuvo el patrón de restricción del genoma de cada bacteriófago por digestión enzimática con la endonucleasa de restricción *TaqI*. Como se aprecia en la Figura 7, todos los genomas fueron susceptibles a la enzima, indicando así que todos los fagos poseen un genoma de ADN doble hebra o bicatenario (ADNbc), característico del orden *Caudovirales*. De esta forma, se corroboran los resultados obtenidos por microscopía electrónica de transmisión. Mediante este método se reveló que solo los pares de bacteriófagos φ7-φ8 y φ14-φ15 fueron indistinguibles entre ellos.



**Figura 7. Patrones de restricción de los genomas de los bacteriófagos.** Análisis directo del genoma con enzima de restricción (DGREA) obtenido con la endonucleasa de restricción *TaqI*. El gel muestra el patrón observado para cada fago. “L” corresponde al marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder.

Posteriormente, para facilitar el análisis la diversidad genética entre los bacteriófagos, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico en base a la presencia o ausencia de 26 fragmentos con tamaño entre 1500 y 500 pb. El dendrograma resultante permitió agrupar a los fagos en cinco diferentes clústeres, básicamente de acuerdo con la morfología de los viriones, designados I, II, III, IV y V (Figura 8 y Anexo I). El clúster I se compone de dos bacteriófagos de la familia *Myoviridae*, sugiriendo que el fago Φ6 podría

pertener a la misma. El clúster II alberga bacteriófagos de la familia *Siphoviridae* y los clústeres III, IV y V contienen bacteriófagos de la familia *Podoviridae*. Dado que el patrón de restricción del genoma del fago  $\Phi 14$  es indistinguible al del fago  $\Phi 15$ , los resultados sugieren que pertenece a la familia *Podoviridae*.



**Figura 8. Dendrograma de similitud de los bacteriófagos.** Obtenido por DGREA y la aplicación de análisis de agrupamiento jerárquico, se realizó con el coeficiente de asociación de Jaccard y algoritmo UPGMA. Según el método del codo se identificaron cinco clústeres de fagos (I - V). CCC = 0,94.

#### 4.4. Potencial de biocontrol de los bacteriófagos

##### 4.4.1. Rango de hospedero en cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

El rango de hospedero de un bacteriófago se define por los géneros, especies y cepas bacterianas que un fago en particular puede infectar y, en el contexto del desarrollo de una estrategia de biocontrol, es una característica biológica determinante. Mediante el ensayo de microgota, se determinó el perfil de lisis de cada fago sobre las 77 cepas de *Pst*. El análisis de los perfiles de lisis indicó que 44 cepas (57%) fueron lisadas por uno o más de los diez fagos. Aunque hubo cepas susceptibles a la lisis por solo un fago, la máxima se dio en la cepa LO3.4, susceptible a siete fagos. Además, los fagos  $\Phi$ 11 y  $\Phi$ 6 revelaron el rango de hospedero más amplio, capaces de lisar hasta 25 y 22 cepas, respectivamente. Al contrario, el fago  $\Phi$ 7 presentó el rango de hospedero más estrecho, capaz de lisar solo 6 cepas. En conjunto, los diez fagos produjeron zonas de aclaramiento transparentes en 31 cepas y zonas de aclaramiento turbias en 13 cepas de las 44 susceptibles (Tabla 5).

**Tabla 5.** Rango de hospedero de los bacteriófagos contra 77 cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) aisladas desde cultivos de tomate en Chile.

CEPA DE <i>Pst</i>	RANGO DE HOSPEDERO <sup>a</sup>									
	$\Phi$ 1	$\Phi$ 6	$\Phi$ 7	$\Phi$ 8	$\Phi$ 11	$\Phi$ 12	$\Phi$ 14	$\Phi$ 15	$\Phi$ 16	$\Phi$ 18
14M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17LP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1FC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27Ch	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
29Ch	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
40M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42Ch	-	+	-	-	++	+	-	-	-	+
43Ch	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A2_4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2_5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2_6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA1_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AI_1	-	++	-	-	++	++	-	-	-	++
AII_1	+	-	-	++	-	-	++	++	++	-
AII_2	++	-	-	++	-	-	++	++	++	-



**Tabla 5.** (continuación)

CEPA DE <i>Pst</i>	RANGO DE HOSPEDERO <sup>a</sup>									
	φ1	φ 6	φ 7	φ 8	φ 11	φ 12	φ 14	φ 15	φ 16	φ 18
AZheinz24	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
AZheinz25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AZheinz26	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
FL13	+	-	-	-	-	-	++	++	++	-
FL16	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++
FL17	+	-	-	++	-	-	++	++	++	-
FL2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
FL3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FL4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FL5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FL8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HO medano 27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HO medano 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HO4.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HO6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HO6.2	-	++	-	-	++	++	-	-	-	++
HO6.5	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
HO6.6	-	++	-	-	+	++	-	-	-	++
HO7.10	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-
HO7.13	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-
HO7.14	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-
HO7.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HO7.17	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
HO7.18	-	++	-	-	-	+	-	-	-	++
HO7.9	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-
JV 8r	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
JV 9r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JV I	-	+	-	-	++	-	-	++	-	++
JV II 2	-	++	-	-	++	-	-	-	-	++
JV III 2	-	+	-	-	++	-	-	++	-	++
JV IV 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JV IV 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JV V 1	++	-	-	-	-	-	+	+	+	-
JV V 2	-	+	-	-	++	-	-	++	-	++
JV VI 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L1_1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
L1_9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
L3_12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LI_1	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++
LI_2	-	++	++	++	-	++	-	-	-	++
LI_3	++	-	-	++	-	-	++	++	++	-
LO2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LO3.4	-	++	++	++	++	++	-	++	-	++
LO4.1	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-
LO4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LO5.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N1_12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N10_3	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
N2_2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N4_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N4_11	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
N4_8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 5.** (continuación)

CEPA DE <i>Pst</i>	RANGO DE HOSPEDERO <sup>a</sup>									
	φ1	φ 6	φ 7	φ 8	φ 11	φ 12	φ 14	φ 15	φ 16	φ 18
N9_7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N9_9	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
NII_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NII_2	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-
NIV_3	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-
T1_9	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
T11	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-
TJ 4_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TJ 5_5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VCMAgpz2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>++, lisis bacteriana (zona de aclaramiento transparente); +, lisis bacteriana parcial (zona de aclaramiento turbia); -, ausencia de lisis (no hay formación de zona de aclaramiento).

Para facilitar el análisis, los fagos se agruparon en un mapa de calor de acuerdo con su rango de hospedero, donde además se visualiza la concentración mínima inhibitoria de cobre, estreptomycinina y la región de aislamiento de cada cepa de *Pst*. Considerando la capacidad de lisar y no lisar, se identificaron tres clústeres principales, denominados 1, 2 y 3 (Figura 9 y Anexo II). El clúster 1 agrupa a los fagos con el rango de hospedero más amplio, capaz de lisar 31 cepas, provenientes de cuatro regiones. El clúster 2, compuesto exclusivamente por la familia *Siphoviridae*, exhibe un rango de hospedero ligeramente más estrecho que el clúster 3, capaces de lisar 10 y 15 cepas respectivamente, pero ninguna aislada en la Región del Ñuble. El clúster 3 se compone de fagos *Myoviridae* y *Podoviridae* y sólo el fago Φ15 fue capaz de lisar una cepa aislada de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins. En general, los fagos demostraron la capacidad de lisar cepas provenientes de distintas regiones, tolerantes y muy tolerantes, ya sea, a uno o a ambos pesticidas. En detalle, de las 44 cepas susceptibles a los fagos, 18 son tolerantes a cobre, 4 a estreptomycinina, 5 son tolerantes a ambos pesticidas y 8 son tolerantes a cobre y además muy tolerantes a estreptomycinina. Cabe destacar que existe un clúster de bacterias que no fue susceptible a ninguno de

los fagos ensayados (clúster NS) y que se compone de cepas provenientes de las cinco regiones. De hecho, la única cepa proveniente de la Región Metropolitana de Santiago no fue lisada por ninguno de los fagos ensayados. Por último, vale la pena mencionar la similitud entre los pares de fagos  $\Phi 7$ - $\Phi 8$  y  $\Phi 14$ - $\Phi 15$  que, además de compartir el patrón de digestión de genomas, ambos se agrupan en los mismos clústeres del rango de hospedero. Las pequeñas diferencias entre los perfiles de lisis permiten inferir que no son idénticos.



**Figura 9. Representación en mapa de calor del rango de hospedero de los bacteriófagos.** El análisis de agrupamiento jerárquico se realizó con el coeficiente de asociación de Jaccard y algoritmo UPGMA, utilizando los perfiles de lisis de los fagos. El eje horizontal contiene los diez fagos aislados. El eje vertical contiene las cepas de *Pst*, que se agrupan según la susceptibilidad a los fagos, y se visualiza la mínima concentración inhibitoria de cobre (CMI Cu), estreptomicina (CMI Str) y la región de aislamiento. Las celdas anaranjadas indican lisis por fago y las blancas no lisis. Según el método del codo se identificaron tres clústeres de fagos (1 - 3). El clúster NS de cepas de *Pst* no resultó susceptible a lisis por los fagos. CCC = 0,95.

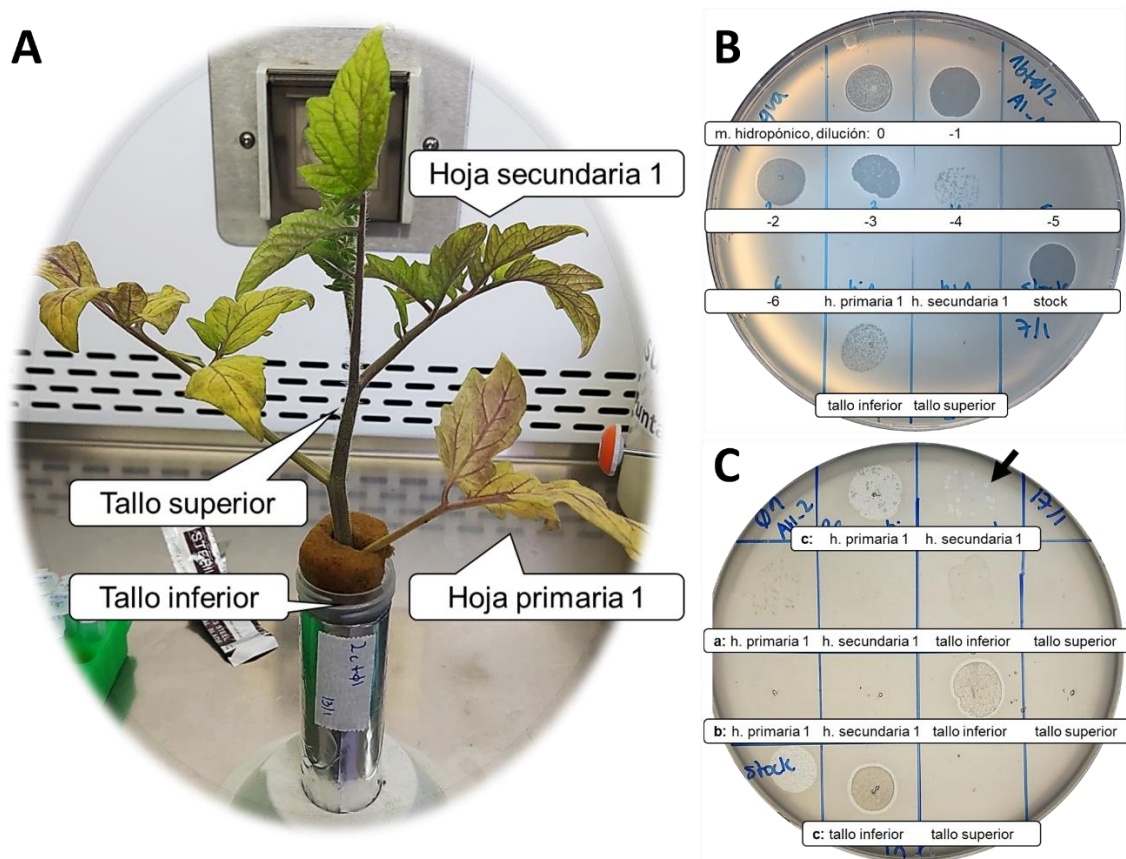
#### 4.4.2. Translocación de bacteriófagos en plantas de tomate

Con la intención de desarrollar, a futuro, un producto biocontrolador compuesto de bacteriófagos para tratar la Peca Bacteriana, se evaluó la capacidad de translocación de los fagos en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Estas se crecieron en invernadero a 28 °C y 23% de humedad relativa promedio. Cuando las plantas desarrollaron las hojas secundarias, para maximizar la captación de fagos, se traspasaron a medio hidropónico. Posteriormente, el medio se inoculó con un fago para alcanzar el orden de  $10^8$  UFP/mL y se ensayaron por 48 horas.

Para los ensayos se seleccionaron seis fagos bajo el criterio de diversidad morfológica. Dicho esto, los fagos seleccionados fueron uno de la familia *Myoviridae* ( $\Phi 1$ ), dos de la familia *Podoviridae* ( $\Phi 12$  y  $\Phi 18$ ), dos de la familia *Siphoviridae* ( $\Phi 7$  y  $\Phi 8$ ) y uno de morfología desconocida ( $\Phi 6$ ). Transcurrido el ensayo, cada fago se rastreó por toma de muestras en las distintas estructuras de la planta, correspondientes al tallo inferior y superior, y las primeras hojas primarias y secundarias, como se indica en la Figura 10 A. La detección directa permitió cuantificar la concentración de fagos infecciosos por el método de plaqueo de microgotas, mientras que la detección por enriquecimiento de fagos recuperados permitió detectar la presencia o ausencia de estos mediante ensayo de microgota.

Luego de la administración de un fago por 24 horas, la detección directa detectó la translocación de los fagos  $\Phi 12$  y  $\Phi 18$  en el tallo inferior de las plantas a un título de  $3,4 \times 10^4$  y  $5,3 \times 10^3$  UFP/g pf, respectivamente (Figura 10 B). La detección por enriquecimiento reafirmó la presencia de estos fagos y además detectó el fago  $\Phi 8$  en el tallo inferior de una planta. Luego de la administración de un fago por 48 horas, la detección directa solo detectó la translocación del fago  $\Phi 18$  al tallo inferior de una planta

con un título de  $1,1 \times 10^3$  UFP/g pf. Sin embargo, la detección por enriquecimiento además detectó el fago  $\Phi 6$  en el tallo inferior de dos plantas y al fago  $\Phi 1$  tanto en el tallo inferior (dos plantas) como en las hojas primaria 1 y secundaria 1 (una planta, Figura 10 A y C). En ningún ensayo se detectó la translocación del fago  $\Phi 7$  (Tabla 6).



**Figura 10. Detección de la translocación de bacteriófagos en plantas de tomate.** (A) Estructuras de la planta muestreada. Al ejemplar c (en la imagen) se le administró el fago  $\Phi 1$  en medio hidropónico por 48 horas (B) Detección directa analizada por el método de plaqueo de microgotas de un ejemplar ensayado con el fago  $\Phi 12$  por 24 horas. Se observan placas de lisis formadas por los fagos recuperados desde el tallo inferior y desde el medio hidropónico (dilución  $10^{-4}$ ) (C) Detección por enriquecimiento de fagos analizado por el ensayo de microgota de los ejemplares a, b y c ensayados con el fago  $\Phi 1$  en medio hidropónico por 48 horas. Se observan zonas de aclaramiento generadas por acción de los fagos recuperados desde el tallo inferior (ejemplares b y c), hoja primaria 1 y secundaria 1 (ejemplar c). La flecha señala una placa de lisis aislada.

**Tabla 6.** Recuperación de bacteriófagos desde estructuras aéreas de plantas de tomate luego de ser ensayadas por 24 y 48 horas en medio hidropónico.

TIEMPO DE ENSAYO	FAGO	TÍTULO MEDIO HIDROPÓNICO (UFP/ml)		MÉTODO DE MUESTREO <sup>c</sup>	TÍTULO EN TEJIDO VEGETAL (UFP/ g pf) <sup>a</sup>											
		PRE ENSAYO	POST ENSAYO <sup>b</sup>		TALLO INFERIOR			HOJA PRIMARIA 1			TALLO SUPERIOR			HOJA SECUNDARIA 1		
					a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
24 hrs	φ1	3,1 x10 <sup>8</sup>	7,0 x10 <sup>7</sup>	Directo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				Enriquecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	φ6	2,0 x10 <sup>8</sup>	2,6 x10 <sup>8</sup>	Directo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				Enriquecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	φ7	1,1 x10 <sup>8</sup>	3,5 x10 <sup>7</sup>	Directo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				Enriquecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	φ8	1,0 x10 <sup>8</sup>	2,2 x10 <sup>7</sup>	Directo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				Enriquecimiento	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	φ12	3,2 x10 <sup>8</sup>	2,0 x10 <sup>8</sup>	Directo	-	3,4 x10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				Enriquecimiento	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	φ18	7,0 x10 <sup>8</sup>	2,0 x10 <sup>8</sup>	Directo	-	-	5,3 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				Enriquecimiento	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 hrs	φ1	3,1 x10 <sup>8</sup>	7,0 x10 <sup>7</sup>	Directo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				Enriquecimiento	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	φ6	2,0 x10 <sup>8</sup>	2,1 x10 <sup>8</sup>	Directo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				Enriquecimiento	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	φ7	1,1 x10 <sup>8</sup>	1,0 x10 <sup>7</sup>	Directo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				Enriquecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	φ8	1,0 x10 <sup>8</sup>	6,3 x10 <sup>7</sup>	Directo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				Enriquecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	φ12	3,2 x10 <sup>8</sup>	8,7 x10 <sup>7</sup>	Directo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				Enriquecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	φ18	7,0 x10 <sup>8</sup>	7,0 x10 <sup>8</sup>	Directo	-	-	1,1 x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	
				Enriquecimiento	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>a-c, ejemplar de planta de tomate muestreada; +, presencia de fago (<100 UFP/g pf, formación de zona de aclaramiento); -, ausencia de fago (no hay formación de zona de aclaramiento).

<sup>b</sup>Valor promedio entre las tres plantas ensayadas.

<sup>c</sup>La detección directa permitió cuantificar la concentración de fagos por el método de plaqueo de microgotas, mientras que la detección por enriquecimiento (de los fagos recuperados) permitió detectar la presencia o ausencia mediante ensayo de microgota.



Dado que se pudo determinar y cuantificar la translocación del fago  $\Phi 18$  mediante detección directa, en un experimento independiente se estudió su persistencia en las plantas hasta 5 días. Como resultado, solo se detectó la translocación hacia el tallo inferior, manteniéndose a un título de magnitud  $10^3$  UFP/g pf durante los cinco días de ensayo (Tabla 7).

**Tabla 7.** Persistencia del fago  $\Phi 18$  en plantas de tomate ensayadas por hasta 5 días en medio hidropónico.

FAGO	TIEMPO DE ENSAYO	TÍTULO MEDIO HIDROPÓNICO (UFP/mL)		TÍTULO EN TEJIDO VEGETAL (UFP/ g pf)			
				TALLO INFERIOR	HOJA PRIMARIA 1	TALLO SUPERIOR	HOJA SECUNDARIA 1
		PRE ENSAYO	POST ENSAYO				
$\Phi 18$	1 DÍA		$2,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^3$	-	-	-
	2 DÍAS	$8,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$1,6 \times 10^3$	-	-	-
	5 DÍAS		$3,7 \times 10^7$	$4,0 \times 10^3$	-	-	-

## 5. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

La bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) es el agente causal de la Peca Bacteriana en tomates. Actualmente, la presencia de cepas tolerantes a pesticidas convencionales convierte a esta bacteria en una amenaza emergente para la industria de este cultivo. Puesto que los métodos de control actuales son insuficientes para el manejo de la enfermedad, los bacteriófagos surgen como una alternativa de control biológico promisorio.

En Chile, la investigación de métodos de control biológico basados en la aplicación de bacteriófagos contra la Peca Bacteriana es escasa. El presente estudio tuvo por objetivo caracterizar bacteriófagos como potenciales agentes de biocontrol de cepas de *Pst*, aisladas desde cultivos de tomate del país.

A nivel mundial, existe un reducido número de publicaciones que reportan el aislamiento de fagos específicos para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. La primera publicación data de 1983, en la cual Cuppels reportó el aislamiento de 16 fagos desde suelo y material vegetal de plantas de tomate infectadas con *Pst* en Canadá. De estos fagos, 4 fueron caracterizados por su utilidad en la identificación de *Pst*, los que además fueron capaces de infectar cepas provenientes de Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Europa (Cuppels, 1983). Una década después, Minor y col. reportaron 20 fagos temperados para realizar análisis de transducción (Minor y col., 1996). Estos se aislaron desde cepas lisógenas de *Pst* provenientes de Australia, Canadá, Estados Unidos, Francia y Sudáfrica y, posteriormente, fueron caracterizados por Prior y col. (2007). Si bien en estas publicaciones se reportaron aislamientos y caracterizaciones de fagos, ninguna los estudió en el contexto de biocontrol de la Peca Bacteriana.

En relación al biocontrol, recién el año 2005 se registró en Estados Unidos el primer pesticida comercial que contiene bacteriófagos contra *Pst*, aunque sin más información respecto a los fagos que lo componen (*AgriPhage*<sup>TM</sup> – *Bactericide* | Sandy, UT, 2020). La última publicación que reportó el aislamiento de fagos de *Pst*, sin caracterizarlos, y con enfoque en el biocontrol en semillas fue publicada el año 2018. En esta, Cemen y col. reportaron el aislamiento de 47 fagos desde plantas de tomates infectadas con *Pst*, provenientes de campos e invernaderos de Turquía (Cemen y col., 2018). Otras publicaciones reportan el aislamiento de fagos capaces de infectar otros patovares de *P. syringae*, incluidas algunas cepas de *Pst* (Amarillas y col., 2020; James y col., 2020; Park y col., 2018; Rabiey y col., 2020; Thomas, 1983; Yu y col., 2015).

Los resultados del presente estudio aportan nueva información en cuanto al aislamiento y caracterización de fagos que infectan *Pst*. A diferencia de los estudios citados anteriormente, en este se aislaron 10 fagos que provienen principalmente de aguas servidas. Dado esto, las aguas servidas podrían ser una buena fuente para aislar nuevos fagos. Hasta donde se conoce, estos corresponderían a los primeros fagos reportados en la región sudamericana capaces de infectar *Pst*.

Los fagos produjeron placas de lisis transparentes en césped de la respectiva cepa hospedera (Tabla 2 y Figura 4). Si bien las placas de lisis transparentes representan un fenotipo conveniente, como indicio de una lisis eficiente, es prematuro calificar estos fagos como virulentos y debe corroborarse con análisis genómicos puesto que, como se ha reportado, los fagos temperados también pueden producir placas de este tipo (Prior y col., 2007; Rabiey y col., 2020; van Charante y col., 2019).

De este aislamiento, destacan las placas de lisis producidas por los fagos  $\Phi$ 14,  $\Phi$ 15 y  $\Phi$ 16 que, además de ser transparentes, están rodeadas por un halo translúcido (Figura

4). Estos halos se asociarían con la presencia de depolimerasas, enzimas codificadas por fagos y que degradan exopolisacáridos bacterianos. Las depolimerasas se encuentran en dos formas: como componentes integrales de la partícula viral o como proteínas solubles generadas durante la lisis de la célula hospedera. Sin embargo, no todos los fagos que codifican enzimas depolimerasas generan estos halos (Pires y col., 2016).

Las morfologías de las placas de lisis de los fagos aislados son similares a las que se describen en la literatura. Se ha reportado que fagos que infectan *Pst*, generan placas de lisis transparentes con y sin presencia de halo, y placas de lisis turbias carentes de halo (Cuppels, 1983; Prior y col., 2007). Sin embargo, no es posible comparar los diámetros ya que las condiciones de cultivo e incubación fueron diferentes entre los estudios.

Los diez fagos aislados pertenecen al orden *Caudovirales* y se clasificaron tentativamente en las familias *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae* por sus características de ausencia de membrana lipídica, morfologías observadas por microscopía electrónica de transmisión y tipo de ácido nucleico (Tabla 3). Los fagos  $\Phi 6$  y  $\Phi 14$  no fueron clasificados debido a que no se obtuvo microfotografía. Todos los fagos que infectan cepas de *Pst*, caracterizados en la literatura, también pertenecen al orden *Caudovirales*. Sin embargo, aunque presentan las morfologías típicas de las tres familias mencionadas, las dimensiones de la cabeza y la cola varían en diámetro y longitud. Por ejemplo, se ha descrito un fago *Myoviridae* con cabeza y cola más pequeña (James y col., 2020), fagos *Podoviridae* con cabeza y cola más grandes (Park y col., 2018; Yu y col., 2015) y fagos *Siphoviridae* con cabeza más pequeña y cola más larga (Amarillas y col., 2020; Cuppels, 1983; Prior y col., 2007).

Como se ha manifestado, estas clasificaciones se basan en la morfología y no son definitivas puesto que, recientemente, el orden *Caudovirales* se ha sometido a una revisión importante. En relación con esto, las morfologías observadas no son exclusivas de estas tres familias. Por ejemplo, la familia *Autographivirinae* solía ser una subfamilia de *Podoviridae*, por lo que actualmente ambas familias comparten la misma morfología, al igual que las familias *Ackermannviridae*, *Herelleviridae* y *Myoviridae* (*International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*, 2020). En consecuencia, solo un análisis genómico podría determinar con precisión la taxonomía de los fagos aislados (Adriaenssens & Rodney Brister, 2017).

En general, el tamaño de los genomas de los fagos que infectan *Pst* es mayor a los del presente estudio. En la literatura se reportan genomas (secuenciados) con tamaños de entre 39 y 57 kb (Amarillas y col., 2020; Park y col., 2018; Rabiey y col., 2020), mientras que los genomas de los fagos de esta investigación se estimaron entre 18 y 27 kb (Tabla 4). Esta diferencia, que ubica los tamaños de los genomas fuera del rango reportado, podría atribuirse a la metodología empleada y se espera que sea precisada mediante secuenciación.

El análisis de agrupamiento de los patrones de restricción de genomas estableció cinco clústeres diferentes, que se asocian a la morfología de las familias de los fagos; clúster I: *Myoviridae*, clúster II: *Siphoviridae*, clústeres III, IV y V: *Podoviridae* (Figura 8). De los diez fagos, solo los pares  $\Phi 7$ - $\Phi 8$  y  $\Phi 14$ - $\Phi 15$  resultaron indistinguibles mediante esta técnica. A pesar de que no se obtuvo una microfotografía de los fagos  $\Phi 6$  y  $\Phi 14$ , el análisis de patrones de restricción de genomas sugiere que la morfología del fago  $\Phi 6$  es del tipo *Myoviridae* y la del fago  $\Phi 14$  tipo *Podoviridae*, por su similitud con el fago  $\Phi 15$ .

En cuanto a las propiedades útiles para el biocontrol de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* con estos fagos, el rango de hospedero fue menor al de otros fagos reportados en la literatura. Cabe destacar que en este estudio se ensayó una cantidad mayor de cepas de *Pst*, comparado a lo reportado en la literatura, sumado a cepas tolerantes a cobre y/o estreptomicina. En el presente estudio, 57% de un total de 77 cepas ensayadas resultaron susceptibles, entre las que se encontraban tolerantes y muy tolerantes, ya sea, a uno o a ambos pesticidas (Figura 9). Específicamente, el porcentaje mínimo del total de cepas que fueron lisadas por cada fago fue 8% (fago  $\Phi 7$ ) y el máximo 33% (fago  $\Phi 11$ ). En contraste, 12 de los 16 fagos aislados por Cuppels lisaron cada uno más del 80% de las 55 cepas de *Pst* ensayadas, equivalente a 44 cepas aproximadamente (el total de las cepas lisadas en conjunto por los fagos de este estudio) (Cuppels, 1983). Esta diferencia podría explicarse por la diversidad genética de las cepas ensayadas, sin embargo, las cepas de Cuppels no fueron caracterizadas.

Respecto al análisis de rango de hospedero, cabe destacar que no se observó algún tipo de correlación entre procedencia del fago y el perfil de lisis de acuerdo a la procedencia de las cepas. De hecho, los fagos fueron capaces de lisar cepas con distinto origen.

En relación con lo anterior, los resultados plantean que, si se consideran estos fagos para una estrategia de biocontrol, debería emplearse un cóctel formulado con los fagos que presentaron el rango de hospedero más amplio de cada clúster. Esto, con el objetivo de controlar la mayor cantidad de cepas de *Pst*, evitando la selección de mutantes resistentes a fagos tras la aplicación. La aplicación de un cóctel de fagos podría ser efectiva en distintas regiones de Chile, especialmente donde haya cepas tolerantes tanto a pesticidas en base a cobre como a estreptomicina (Figura 9). Por ejemplo, un cóctel apropiado debiera componerse como mínimo por los fagos  $\Phi 8$ ,  $\Phi 11$  y  $\Phi 15$ , el cual sería

capaz de lisar 37 de las 44 cepas de *Pst* susceptibles, y adicionalmente se requeriría de los fagos  $\Phi 6$  y  $\Phi 16$  para lisar al total de las cepas susceptibles.

Aunque existe un clúster de cepas de *Pst* no susceptibles, esto podría resolverse mediante el aislamiento de nuevos fagos o, incluso, la generación de fagos mutantes con un rango de hospedero ampliado capaces de infectar estas cepas (Jackson, 1989). Conforme a la subrepresentación de la Región Metropolitana de Santiago, la única cepa proveniente de esta región no fue lisada por ninguno de los fagos ensayados.

Como se señaló anteriormente, en la literatura se han descrito fagos que infectan cepas de *Pst* con distinto origen geográfico, distintos patovares de *P. syringae* y también determinadas cepas de especies fitopatógenas del mismo género. Ninguno de los fagos reportados demostró infectar especies de otros géneros bacterianos (Amarillas y col., 2020; Cuppels, 1983; James y col., 2020; Park y col., 2018; Rabiey y col., 2020; Thomas, 1983; Yu y col., 2015). En base a esto, existe la posibilidad de que el rango de hospedero de los fagos caracterizados en el presente estudio sea más amplio a nivel de género, lo que aumentaría su potencial biotecnológico si se demuestra.

La gran similitud entre los pares de fagos  $\Phi 7$ - $\Phi 8$  y  $\Phi 14$ - $\Phi 15$  respecto a la morfología de placas de lisis, viriones y a nivel molecular permite inferir que cada par se encuentra muy emparentado genéticamente y, de hecho, podrían pertenecer a la misma especie ya que solo difieren sutilmente en el perfil de lisis. Sorprenden los fagos  $\Phi 14$  y  $\Phi 15$  ya que se aislaron a una distancia de 150 km aproximadamente (entre Padre Hurtado y Teno), un indicio de que la especie podría estar presente en más localidades.

Sobre la técnica empleada para determinar el rango de hospedero de un fago, el ensayo microgota presenta sus limitaciones pues permite ensayar la capacidad bactericida pero

no revela cuan productiva es la infección. Si bien las zonas de aclaramiento que se observan con esta técnica pueden producirse por placas de lisis confluentes, también es posible que los propios fagos puedan dar lugar a una lisis externa o, incluso, la gota de *stock* de fago que se aplica sobre césped bacteriano podría contener residuos de bacteriocinas que maten las bacterias, formando zonas de aclaramiento sin que se produzcan nuevos fagos (Abedon, 2018). Así, los resultados obtenidos por ensayo de microgota deben considerarse como un paso preliminar en la determinación del rango de hospedero de los fagos y para determinar cuán productiva puede ser la infección de una cepa se requieren ensayos de eficiencia de plaqueo que, de acuerdo con Khan Mirzaei & Nilsson (2015), se espera que tengan un impacto en el proceso de selección de los fagos más aptos para una estrategia de biocontrol.

Como en otras publicaciones (Castillo y col., 2014; Moreno Switt y col., 2013; Rivera y col., 2018), para la realización del análisis de agrupamiento del rango de hospedero solo se consideró la capacidad de lisis de los fagos, sin distinguir si la zona de aclaramiento era transparente o turbia. El motivo subyacente es la complejidad para codificar o representar satisfactoriamente con números estos datos (atributo cualitativo multiestado) para, posteriormente, someterlos a un análisis de agrupamiento.

Acerca de la translocación de bacteriófagos, este es un fenómeno poco descrito y escasamente caracterizado en la literatura. Desde la reciente incorporación de los fagos en estrategias de biocontrol, los estudios en esta materia surgen en búsqueda de una solución para aumentar su persistencia en el ambiente nocivo de la filósfera. En el presente estudio se evaluó la capacidad de translocación de los fagos en plantas jóvenes de tomate, la cual se demostró en 5 de 6 fagos ensayados y la persistencia de uno de ellos hasta 5 días (Tablas 6 y 7).



Las plantas se mantuvieron en invernadero y, aunque se estudió la translocación en medio hidropónico para maximizar la captación de fagos, estas se manejaron simulando las condiciones de un cultivo en campo abierto, a diferencia de las metodologías aplicadas en experimentos de otros estudios (Iriarte y col., 2012; Ward & Mahler, 1982). Adicionalmente, ya que el método de plaqueo de microgotas no permite detectar la presencia de fagos a un título menor de 100 UFP/mL (lo que equivale a 100 UFP/g pf), se implementó la detección por enriquecimiento para ampliar el límite impuesto por la técnica antes mencionada (Kolozsváriné Nagy y col., 2015). Los resultados de los ensayos de 24 y 48 horas con un fago en medio hidropónico coinciden, en parte, con los presentados por Iriarte y col. (2012) en un estudio de características similares. En aquel, se crecieron plantas de tomates por 4 semanas en medio hidropónico y luego se ensayaron con suspensiones de  $10^8$  UFP/mL aprox. de: (i) un cóctel comercial de fagos, (ii) el fago  $\Phi$ MI2 y (iii) el fago  $\Phi$ RS5 (ninguno específico para el género *Pseudomonas*), en experimentos separados y realizados en duplicado. Brevemente, luego de 24 horas, tanto las plantas ensayadas con el fago  $\Phi$ MI2 como el fago  $\Phi$ RS5 (sin dañar las raíces) permitieron la translocación al tallo inferior y superior a un título de  $10^3$  UFP/g pf aprox. que decayó ligeramente hasta las 72 horas y abruptamente transcurrido este tiempo. Además, el fago  $\Phi$ RS5 alcanzó la hoja primaria 1 luego de 24 horas y llegó a un título máximo de 10 UFP/g pf aprox. a las 48 horas (posteriormente no se detectó), mientras que el fago  $\Phi$ MI2 alcanzó las hojas primaria 1 y secundaria 1 a las 72 horas a un título de 300 y 30 UFP/g pf aprox. respectivamente (posteriormente no se detectó). Si se compara con los resultados obtenidos en este trabajo, aquí se detectó a las 24 horas la translocación de tres fagos solo al tallo inferior de las plantas, pero a un título similar o superior en el caso de los fagos  $\Phi$ 18 ( $5,3 \times 10^3$  UFP/g pf) y  $\Phi$ 12 ( $3,4 \times 10^4$  UFP/g pf) y menor en el caso del fago  $\Phi$ 8 ( $<100$  UFP/g pf), estos dos últimos no se detectaron a las

48 horas. Solo el fago  $\Phi 1$  reveló un nivel de translocación comparable con los fagos del estudio de referencia puesto que a las 48 horas se detectó no solo en el tallo inferior (como los fagos  $\Phi 6$  y  $\Phi 18$ ), sino también en las hojas primaria 1 y secundaria 1 con un título inferior a 100 UFP/g pf (Tabla 6). Si bien este fago no se detectó en el tallo superior, su presencia en la hoja superior 1 (que se ubica por encima) hace suponer que igualmente se encontraba presente en la estructura, pero a un título tan bajo que no pudo ser detectado. En cuanto a la persistencia de los fagos, el fago  $\Phi 18$  se mantuvo a un título de magnitud  $10^3$  UFP/g pf por 5 días en el tallo inferior de la planta, superior a lo reportado por los fagos  $\Phi MI2$  (10 UFP/g pf aprox.) y  $\Phi RS5$  (no fue detectado) (Tabla 7).

Como ya se examinó, los resultados de la evaluación de la translocación son comparables con los de Iriarte y col. (2012) pero, pese a que el número de plantas ensayadas con cada fago fue mayor, el resultado de cada fago fue dispar y a continuación se discutirán los factores que pudieron repercutir en el experimento. En primer lugar, no todos los fagos se detectaron luego de 24 horas, de hecho, no se detectó la translocación del fago  $\Phi 7$ , que presenta características muy similares a las del fago  $\Phi 8$ . De acuerdo con Iriarte y col. (2012), las plantas de tomate cuyas raíces fueron dañadas para maximizar la captación de fagos en realidad demostraron una capacidad reducida para captar fagos en comparación a las plantas con raíces sin dañar. En la metodología de este trabajo no se dañaron intencionalmente las raíces de las plantas y el eventual daño que pudieron recibir al ser lavadas para traspasarlas a medio hidropónico se espera que haya sido atenuado durante el periodo de aclimatación, por lo que el posible efecto del daño de las raíces pudo ser bajo. Por otra parte, los fagos (y las raíces) presentes en el medio hidropónico se protegieron de la luz solar y su inactivación, previa a la translocación, se cuantificó menor a un orden de magnitud, lo

que resulta despreciable (Tablas 6 y 7). Los estudios de Iriarte y col. (2012) y Ward & Mahler (1982) sugieren que la diferencia en la captación de un fago u otro radica en las propiedades de los viriones, además, la translocación puede estar influenciada por la edad, la salud, el tamaño, especie de planta y posiblemente el tipo de suelo en el que esté creciendo. En virtud de los resultados obtenidos, no se puede establecer una relación entre la morfología de los fagos y la capacidad de translocación, sin embargo, es un tema que debería investigarse a futuro al igual que el mecanismo por el cual ocurre la translocación. Puesto que se ha demostrado que los fagos se mueven desde las raíces (donde pueden mantenerse en alta concentración) hacia la porción aérea de la planta (tallo y hojas), Iriarte y col. (2012) especulan que estos se movilizan a través del xilema, siendo arrastrados por el agua. Bajo este planteamiento, los fagos seguirían la ruta suelo-planta-atmósfera a causa de la transpiración de la planta. Durante la transpiración, el agua presente en el suelo es extraída por las raíces, luego asciende por los conductos del xilema y se distribuye a las hojas donde se pierde a la atmósfera en forma de vapor de agua a través de los estomas (Raven y col., 2013). En esta ruta, según Ward & Mahler (1982), el interior de la planta actuaría como un tamiz molecular, impidiendo que parte de los fagos se muevan desde una estructura o “barrera” a otra.

Otro factor que pudo afectar la capacidad de translocación, fueron las condiciones ambientales del invernadero en el que se encontraban las plantas, que se caracterizaron por temperaturas cálidas y baja humedad relativa (28 °C y 23% de humedad relativa promedio). Según Schwarz y col. (2014), cuando la humedad relativa es menor al 30% y se combina temperaturas elevadas, la morfología y la fisiología de las plantas de tomate cambian y la fotosíntesis puede disminuir debido al cierre de los estomas. En consecuencia, si los estomas se cierran, la transpiración disminuye y cesa la corriente

de agua que movería a los fagos en la ruta suelo-planta-atmósfera, afectándose la translocación.

Por último, es importante mencionar que las condiciones ambientales del invernadero favorecieron la infestación de la mosquita blanca de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum*) (Schwarz y col., 2014), lo cual ocurrió mientras las plantas se encontraban en crecimiento y que perduró durante los experimentos. La infestación de esta plaga afectó la salud de las plantas de tomate, las cuales adquirieron un aspecto clorótico más o menos generalizado y que era evidente mientras las plantas fueron ensayadas con fagos. Se considera que este fue el factor principal que afectó la translocación de los fagos puesto que la mosca blanca es un insecto que se alimenta de floema de la planta, provocando la activación de respuestas de defensa. Posiblemente, los distintos metabolitos producidos por respuestas de defensa bloquearon el movimiento o provocaron la inactivación de los fagos que lograron translocar al interior de la planta, como lo sugiere Iriarte y col. (2012). De ser cierto, entonces la aplicación de fagos al suelo circundante de una planta enferma no sería una estrategia efectiva para controlar la bacteria fitopatógena en los cultivos debido a la interrupción de la translocación.

El presente estudio es el primero en caracterizar bacteriófagos con el potencial de biocontrolar cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* aisladas en Chile, algunas además tolerantes a cobre y/o estreptomycin. Hasta donde se conoce, este estudio también es el primero en demostrar que fagos que infectan este patovar pueden translocar en plantas de tomate a través de las raíces hacia tejidos superiores.

Con el objetivo a largo plazo de desarrollar un producto en base a fagos para biocontrol de la Peca Bacteriana, los resultados obtenidos son prometedores, sin embargo, existe una serie de desafíos para su implementación en la agricultura. En primer lugar, para

una caracterización más acabada de los fagos aislados se requiere de la secuenciación de genomas (Casey y col., 2017). Este recurso puede aportar gran información respecto a la naturaleza de estos fagos, permitiría conocer si codifican genes asociados a la lisogenia, de toxinas o virulencia bacteriana o de enzimas depolimerasas.

A pesar del potencial que tienen los fagos, poco se conoce de las propiedades de las partículas virales. Debido a la alta susceptibilidad de los fagos a los factores ambientales, es fundamental investigar parámetros como la estabilidad en el tiempo, la susceptibilidad al cambio de pH, temperatura y concentración iónica o la tolerancia a otros pesticidas y, especialmente, a la radiación UV. Conocer tales propiedades es particularmente útil para el desarrollo de formulaciones compatibles que permitan extender la persistencia de los fagos en el entorno o también para integrarlos a otros pesticidas.

Si bien en este estudio se demostró la capacidad de translocación, no se profundizó acerca del tiempo de persistencia al interior de la planta y se desconoce si la cantidad de fagos presentes es suficiente como para controlar la Peca Bacteriana. De la misma forma, se desconoce como el tipo suelo puede afectar la eficiencia de la translocación.

Otro desafío importante es la resistencia bacteriana a los fagos. Como se mencionó anteriormente, aunque el desarrollo de resistencia puede evitarse mediante el uso de un cóctel, en estudios posteriores será necesario evaluar el desarrollo potencial de mutantes resistentes utilizando ya sea suspensiones únicas como cócteles de fagos.

Finalmente, se requieren estudios para evaluar la efectividad de los fagos para controlar la infección por *Pst*. Al comienzo, los experimentos *in vitro* y *ex vivo* permiten cuantificar la virulencia y el desempeño de los fagos en tejido vegetal infectado, respectivamente (Pinheiro y col., 2020; Storms y col., 2020). Posteriormente, antes implementar la

estrategia en condiciones reales de producción de tomates, corresponden experimentos *in vivo* en invernadero o campo abierto con plantas infectadas (Rabiey y col., 2020). Dependiendo del éxito de los resultados, otras vías de administración pueden considerarse, como la pulverización foliar o el tratamiento de semillas, también adaptando el momento y la frecuencia de aplicación. El cóctel de fagos podría integrarse en programas fitosanitarios junto con otras estrategias, como parte de un manejo integrado de plagas.

## 6. CONCLUSIONES

- Los diez bacteriófagos aislados en Chile y caracterizados en este estudio son capaces de infectar *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Estos pertenecen al orden *Caudovirales* y se clasificaron tentativamente en las familias *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*.
- El patrón de digestión de genomas reveló que los fagos son genéticamente diversos y se dividieron en cinco clústeres donde cada uno comparte la misma morfología.
- Los fagos presentan distintos rangos de hospedero. Los de amplio rango de hospedero lisan entre 12 y 25 cepas, mientras que los de rango de hospedero estrecho lisan entre 6 y 9 cepas.
- Los fagos lisan cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* presentes en Chile y tolerantes a pesticidas.
- Fagos con distinta morfología son capaces translocar desde las raíces hacia tejidos superiores en plantas de tomate en condiciones hidropónicas. Entre ellos, dos fagos *Podoviridae* y uno *Siphoviridae* translocaron al tallo luego de 24 horas. Un fago *Myoviridae* además alcanzó las hojas luego de 48 horas.
- El fago  $\Phi 18$ , con morfología *Podoviridae*, es capaz de permanecer activo al menos 5 días al interior del tejido vegetal.
- Los resultados obtenidos dan cumplimiento al objetivo general y a los objetivos específicos del estudio.

## 7. REFERENCIAS

- Abedon, S. T. (2018). Detection of Bacteriophages: Phage Plaques. En *Bacteriophages*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8\\_16-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_16-1)
- Adriaenssens, E. M., & Rodney Brister, J. (2017). How to name and classify your phage: An informal guide. *Viruses*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/v9040070>
- AgriPhage™ – Bactericide | Sandy, UT. (2020). <https://www.agriphage.com/>
- Amarillas, L., Estrada-Acosta, M., León-Chan, R. G., López-Orona, C., & Lightbourn, L. (2020). Complete genome sequence of Phobos: a novel bacteriophage with unusual genomic features that infects *Pseudomonas syringae*. *Archives of Virology*, 165(6), 1485–1488. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04618-2>
- Bacterial speck of tomato.* (2020). <http://blogs.cornell.edu/livegpath/gallery/tomato/bacterial-speck-of-tomato/>
- 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>
- Bull, C. T., de Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E., & Takikawa, Y. (2010). Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. *Journal of Plant Pathology*, 92(3), 551–592. <https://doi.org/10.4454/jpp.v92i3.302>
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034>
- Casey, A., Coffey, A., & McAuliffe, O. (2017). Genetics and Genomics of Bacteriophages. En *Bacteriophages* (pp. 1–26). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8\\_5-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_5-1)
- Castillo, D., Christiansen, R. H., Espejo, R., & Middelboe, M. (2014). Diversity and Geographical Distribution of *Flavobacterium psychrophilum* Isolates and Their Phages: Patterns of Susceptibility to Phage Infection and Phage Host Range. *Microbial Ecology*, 67(4), 748–757. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0375-8>
- Cemen, A., Saygili, H., Horuz, S., & Aysan, Y. (2018). POTENTIAL OF BACTERIOPHAGES TO CONTROL BACTERIAL SPECK OF TOMATO (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). *Fresenius Environmental Bulletin*, 27, 9366–9373.
- Cuppels, D. A. (1983). Isolation and Characterization of Phages Useful for Identifying *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Phytopathology*, 73(10), 1376. <https://doi.org/10.1094/phyto-73-1376>
- 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>

- Dy, R. L., Rigano, L. A., & Fineran, P. C. (2018). Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture. *Biochemical Society Transactions*, 46(6), 1605–1613. <https://doi.org/10.1042/BST20180178>
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387–400. <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>
- Espejo, R. T., & Escanilla, D. (1993). Detection of HIV1 DNA by a simple procedure of polymerase chain reaction, using “primer-dimer” formation as an internal control of amplification. *Research in Virology*, 144(3), 243–246. [https://doi.org/10.1016/S0923-2516\(06\)80035-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2516(06)80035-X)
- FAOSTAT. (2020). <http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. (2005). *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press. <https://books.google.cl/books?id=9Wy7Jgy5RWYC>
- Frampton, R. A., Pitman, A. R., & Fineran, P. C. (2012). Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *International Journal of Microbiology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/326452>
- Fuenzalida, L., Hernández, C., Toro, J., Rioseco, M. L., Romero, J., & Espejo, R. T. (2006). *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. *Environmental Microbiology*, 8(4), 675–683. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00946.x>
- GelAnalyzer. (2020). <http://www.gelanalyzer.com/>
- Goode, M. J. (1980). Prevention-the Key to Controlling Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato. *Plant Disease*, 64(9), 831–834. <https://doi.org/10.1094/pd-64-831>
- 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>
- Hampton, H. G., Watson, B. N. J., & Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, 577(7790), 327–336. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>
- Higuera, G., Bastías, R., Tsertsivadze, 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>
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2020). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., & Jones, J. B. (2007). Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Applied and*

- Iriarte, Fanny B., Obradović, A., Wernsing, M. H., Jackson, L. E., Balogh, B., Hong, J. A., Momol, M. T., Jones, J. B., & Vallad, G. E. (2012). Soil-based systemic delivery and phyllosphere in vivo propagation of bacteriophages. *Bacteriophage*, 2(4), 215–224. <https://doi.org/10.4161/bact.23530>
- Jackson, L. (1989). *Bacteriophage prevention and control of harmful plant bacteria* (Patent No. US4828999).
- James, S. L., Rabiey, M., Neuman, B. W., Percival, G., & Jackson, R. W. (2020). Isolation, Characterisation and Experimental Evolution of Phage that Infect the Horse Chestnut Tree Pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. *Current Microbiology*, 77(8), 1438–1447. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01952-1>
- Jikia, D., Chkhaidze, N., Imedashvili, E., Mgaloblishvili, I., Tsitlanadze, G., Katsarava, R., Glenn Morris, J., & Sulakvelidze, A. (2005). The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. *Clinical and Experimental Dermatology*, 30(1), 23–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2004.01600.x>
- Jones, J. B., Vallad, G. E., Iriarte, F. B., Obradović, A., Wernsing, M. H., Jackson, L. E., Balogh, B., Hong, J. C., & Momol, M. T. (2012). Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage*, 2(4), 208–214. <https://doi.org/10.4161/bact.23857>
- Kering, K. K., Kibii, B. J., & Wei, H. (2019). Biocontrol of phyto-bacteria with bacteriophage cocktails. *Pest Management Science*, 75(7), 1775–1781. <https://doi.org/10.1002/ps.5324>
- Khan Mirzaei, M., & Nilsson, A. S. (2015). Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118557>
- 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.
- Kolozsváriné Nagy, J., Schwarczinger, I., Künstler, A., Pogány, M., & Király, L. (2015). Penetration and translocation of *Erwinia amylovora*-specific bacteriophages in apple - a possibility of enhanced control of fire blight. *European Journal of Plant Pathology*, 142(4), 815–827. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0654-3>
- Kutter, E. (2009). Phage Host Range and Efficiency of Plating. En M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (pp. 141–149). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_14)
- Latorre, B., & Lolas, M. (1988). Identificación del tizón y peca bacteriana del tomate. *Ciencia e Investigación Agraria*, 15(3), 151–157. <https://doi.org/10.7764/rcia.v15i3.768>

- Louws, F. J., Wilson, M., Campbell, H. L., Cuppels, D. A., Jones, J. B., Shoemaker, P. B., Sahin, F., & Miller, S. A. (2001). Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, 85(5), 481–488. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.5.481>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of Bacteriophages Using the Small Drop Plaque Assay System. En M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (pp. 81–85). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_9)
- Minor, S., Nordeen, R., & Paschall, C. (1996). Partial Characterization of Bacteriophages of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal of the Arkansas Academy of Science*, 50(1). <https://scholarworks.uark.edu/jaas/vol50/iss1/28>
- Moreno Switt, A. I., den Bakker, H. C., Vongkamjan, K., Hoelzer, K., Warnick, L. D., Cummings, K. J., & Wiedmann, M. (2013). *Salmonella* bacteriophage diversity reflects host diversity on dairy farms. *Food Microbiology*, 36(2), 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.014>
- Muñoz, M. (2020). ODEPA. Boletín de Hortalizas, Abril 2020. <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-hortalizas-abril-2020>
- Nakajima, M., Goto, M., & Hibi, T. (2002). Similarity between Copper Resistance Genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. *Journal of General Plant Pathology*, 68(1), 68–74. <https://doi.org/10.1007/pl00013056>
- Palacio, F., Apodaca, M., & Crisci, J. (2020). *Análisis multivariado para datos biológicos: Teoría y su aplicación utilizando R*. Fundación de Historia Natural Félix de Azara.
- Park, J., Lim, J. A., Yu, J. G., & Oh, C. S. (2018). Genomic features and lytic activity of the bacteriophage PPPL-1 effective against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, a cause of bacterial canker in kiwifruit. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(9), 1542–1546. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.06055>
- Pernezny, K., Kúdela, V., Kokošková, B., & Hládká, I. (1995). Bacterial diseases of tomato in the Czech and Slovak Republics and lack of streptomycin resistance among copper-tolerant bacterial strains. *Crop Protection*, 14(4), 267–270. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(94\)00010-6](https://doi.org/10.1016/0261-2194(94)00010-6)
- Pernezny, K., & Zhang, S. (2017). *Bacterial Speck of Tomato*. <https://edis.ifas.ufl.edu/vh010>
- Pinheiro, L. A. M., Pereira, C., Barreal, M. E., Gallego, P. P., Balcão, V. M., & Almeida, A. (2020). Use of phage  $\phi 6$  to inactivate *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants: in vitro and ex vivo experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(3), 1319–1330. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10301-7>

- Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D. R., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(5), 2141–2151. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7247-0>
- Preston, G. M. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular Plant Pathology*, *1*(5), 263–275. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x>
- Prior, S., Andrews, A., & Nordeen, R. (2007). Characterization of Bacteriophages of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal of the Arkansas Academy of Science*, *61*(1), 84–89.
- R Project. (2020). <https://www.r-project.org/>
- Rabiey, M., Roy, S. R., Holtappels, D., Franceschetti, L., Quilty, B. J., Creeth, R., Sundin, G. W., Wagemans, J., Lavigne, R., & Jackson, R. W. (2020). Phage biocontrol to combat *Pseudomonas syringae* pathogens causing disease in cherry. *Microbial Biotechnology*, *0*(0). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13585>
- Rahimi-Midani, A., & Choi, T.-J. (2020). Transport of Phage in Melon Plants and Inhibition of Progression of Bacterial Fruit Blotch. *Viruses*, *12*(4), 477. <https://doi.org/10.3390/v12040477>
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2013). *Raven Biology of Plants* (8th ed.). W.H. Freeman Publishers.
- Rivera, D., Toledo, V., Pillo, F. D. I., Dueñas, F., Tardone, R., Hamilton-West, C., Vongkamjan, K., Wiedmann, M., & Moreno Switt, A. I. (2018). Backyard Farms Represent a Source of Wide Host Range *Salmonella* Phages That Lysed the Most Common *Salmonella* Serovars. *Journal of Food Protection*, *81*(2), 272–278. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-075>
- Sahin, F. (2001). Severe outbreak of bacterial speck, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, on field-grown tomatoes in the eastern Anatolia region of Turkey. *Plant Pathology*, *50*(6), 799.
- Sambrook, J. F., & Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set). En *Cold Springs Harbour Press* (3rd ed., Vol. 1).
- Sanguinetti, M. A. (2005). *Nueva variante de Pseudomonas syringae* pv. *tomato* afectando plantas de tomate en invernaderos en la quinta región (tesis de pregrado). Universidad Católica de Valparaíso.
- Schneider, C. L. (2017). Bacteriophage-Mediated Horizontal Gene Transfer: Transduction. En D. Harper, S. Abedon, B. Burrowes, & M. McConville (Eds.), *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy* (pp. 1–42). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8\\_4-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_4-1)
- Schwarz, D., Thompson, A. J., & Kläring, H. P. (2014). Guidelines to use tomato in experiments with a controlled environment. *Frontiers in Plant Science*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00625>

- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
- Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017). Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. 3 *Biotech*, 7(4). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0896-1>
- Stenberg, J. A. (2017). A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. *Trends in Plant Science*, 22(9), 759–769. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.010>
- Storms, Z. J., Teel, M. R., Mercurio, K., & Sauvageau, D. (2020). The Virulence Index: A Metric for Quantitative Analysis of Phage Virulence. *Phage*, 1(1), 27–36. <https://doi.org/10.1089/phage.2019.0001>
- Summers, W. C. (2001). Bacteriophage therapy. *Annual Review of Microbiology*, 55, 437–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.437>
- 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., Demezas, D. H., & Bender, C. L. (1994). Genetic and plasmid diversity within natural populations of *Pseudomonas syringae* with various exposures to copper and streptomycin bactericides. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4421–4431. <https://doi.org/10.1128/aem.60.12.4421-4431.1994>
- Sundin, George W., & Wang, N. (2018). Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 161–180. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045946>
- Suttle, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature*, 437(7057), 356–361. <https://doi.org/10.1038/nature04160>
- Svircev, A., Roach, D., & Castle, A. (2018). Framing the future with bacteriophages in agriculture. *Viruses*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/v10050218>
- Thomas, M. D. (1983). Bacteriophages from Sewage Specific for Fluorescent Phytopathogenic Pseudomonads. *Phytopathology*, 73(3), 403. <https://doi.org/10.1094/phyto-73-403>
- van Charante, F., Holtappels, D., Blasdel, B., & Burrowes, B. (2019). Isolation of Bacteriophages. En *Bacteriophages* (pp. 1–32). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8\\_14-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_14-1)
- Van Twest, R., & Kropinski, A. M. (2009). Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. En M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (pp. 15–21). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_2)
- Vanneste, J. L., Voyle, M. D., Yu, J., Cornish, D. A., Boyd, R. J., & McLaren, G. F. (2008).

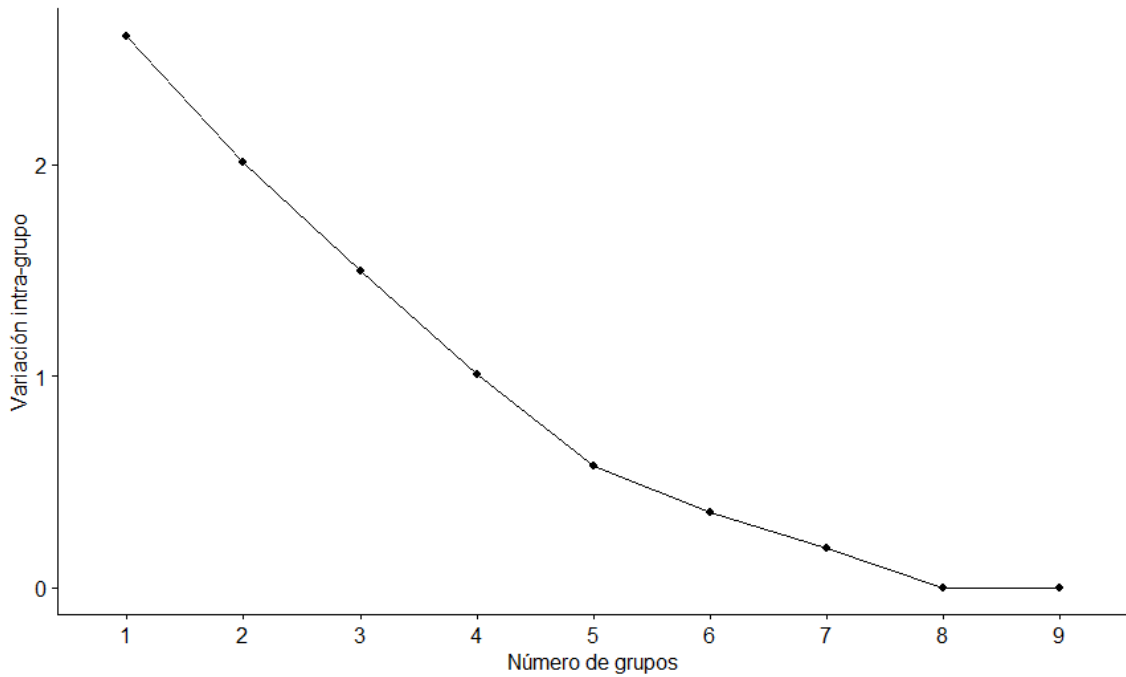
Copper and Streptomycin Resistance in *Pseudomonas* Strains Isolated from Pipfruit and Stone Fruit Orchards in New Zealand. En *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics* (pp. 81–90). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6901-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6901-7_9)

Ward, R. L., & Mahler, R. J. (1982). Uptake of bacteriophage f2 through plant roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(5), 1098–1103. <https://doi.org/10.1128/aem.43.5.1098-1103.1982>

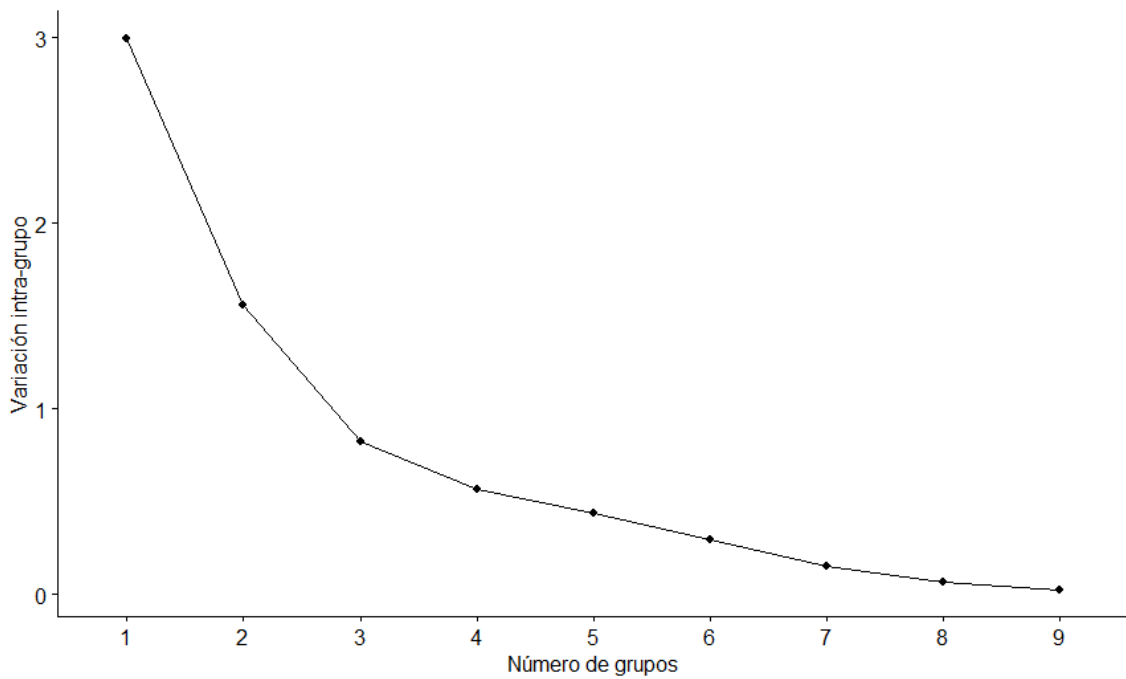
Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>

Yu, J. G., Lim, J. A., Song, Y. R., Heu, S., Kim, G. H., Koh, Y. J., & Oh, C. S. (2015). Isolation and characterization of bacteriophages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker disease in kiwifruit. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 385–393. <https://doi.org/10.4014/jmb.1509.09012>

## 8. ANEXOS



**Anexo I. Determinación del número óptimo de clústeres por el método del codo para el análisis de agrupamiento jerárquico de los patrones de restricción de genomas de los bacteriófagos.** La disminución abrupta en la variación intra-grupo decae en la transición de 5 a 6 grupos, indicando que 5 es el número óptimo de clústeres.



**Anexo II. Determinación del número óptimo de clústeres por el método del codo para el análisis de agrupamiento jerárquico del rango de hospedero de los bacteriófagos.** La disminución abrupta en la variación intra-grupo decae en la transición de 3 a 4 grupos, indicando que 3 es el número óptimo de clústeres.