



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

**“Evaluación de endolisinas con capacidad bactericida
contra bacterias fitopatógenas de importancia
económica”**

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímica

Belén Andrea Díaz Castillo

Director:

Dr. Gastón Higuera Guajardo
Instituto de Nutrición y Tecnología de
los Alimentos (INTA), Universidad de
Chile.

Codirector:

Dra. Melissa Alegría Arcos
Núcleo de Investigación en Data
Science, Facultad de Ingeniería y
Negocios, Universidad de las
Américas.

Profesor

Dr. Carlos Santiviago Cid
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular, Facultad de
Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Universidad de Chile.

Patrocinante:

Santiago – Chile

2024

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a quienes contribuyeron de manera significativa al desarrollo y éxito de mi memoria de título. Iniciando por mi profesor tutor, Gastón Higuera, quien desde el inicio tuvo grandes esperanzas en mí, aunque me cuesta confiar en mis conocimientos y sé que me falta camino para convertirme en una excelente científica.

Como también, agradezco a toda mi familia, Lorena, Mauricio, Noelia y Mia, incluyendo a mis primos, tíos y abuela, que siempre me dieron el empujón que necesitaba para realizar mis sueños, siempre apoyando en los momentos en que creía que nunca terminaría la memoria.

También agradezco a todos los académicos que estuvieron enseñándome y fortaleciendo mis conocimientos desde el inicio de la carrera, iniciando con la profesora Jenny Fiedler, que me acepto en su laboratorio en mi segundo año, aun cuando desconocía y no entendía la razón de estudiar bioquímica, aportándome diversos conocimientos sobre la neurociencia. Sin olvidar a todos los investigadores del laboratorio, haciéndome uno de ellos, enseñándome siempre y ayudándome a encaminar mi futuro en la bioquímica. También agradezco a mis tutores de mis prácticas, la profesora Cecilia Toro y el profesor Juan Carlos Salazar, quienes se dedicaron de un principio a enseñarme la maravillosa área de la microbiología y los patógenos humanos, me hubiera gustado seguir realizando experimentos, pero el tiempo lo hizo difícil, a pesar de eso, les doy mis gracias por aceptarme en su laboratorio y enseñarme con paciencia y profesionalismo.

Mis queridas amigas del alma, que nos conocemos desde el primer día de la carrera y que nunca más nos separamos, sé que a cada una le espera un futuro brillante, porque se de lo que son capaces.

Esperando que en un futuro se colaborarán más, agradezco a los profesores Nicola Fiore y Alan Zamorano, que durante unos meses me ayudaron a realizar mi memoria de título, aunque los resultados no salieron como se esperaban, fueron unos meses donde aprendí un área completamente diferente y que nunca espere conocer, la sanidad vegetal. En esos meses conocí gente amable y dedicada, cada uno con su virtud, pero que cada día me daba felicidad su presencia, cada uno me enseñó y me entregaron todos sus conocimientos, por eso gracias a la Cami, la Javi, la Kelly, la Coni, el Seba, la Domi, la Carli, la Liz y todos. Gracias.

No puedo olvidar mencionar, a la profesora Carolina Ilabaca, con sus bromas que me hacían el día y sobre todo con su ayuda incondicional cuando tenía problemas técnicos.

Por eso, a todos los nombrados les agradezco de todo corazón, estar presentes en mi vida y espero que en el futuro siga conociendo a gente con ustedes.

Índice de contenidos

Índice de Figuras.....	V
Índice de Tablas	VI
Índice de Anexos.....	VI
Abreviaturas	VII
Resumen.....	IX
Abstract	XI
1. Introducción.....	1
1.1. Importancia económica de la exportación del cerezo y el nogal en Chile.....	1
1.2. Infecciones bacterianas en la industria frutícola.	2
1.3. Estrategias tradicionales para el control de infecciones bacterianas en plantas	5
1.4. Bacteriófagos para el biocontrol de infecciones bacterianas: Una nueva alternativa de manejo.....	6
1.5. Endolisinas de fagos como un bactericida en bacterias patógenas	8
2. Hipótesis	11
3. Objetivos	11
3.1. Objetivo General.....	11
3.2. Objetivos Específicos	11
4. Materiales y Métodos	12
4.1. Materiales.....	12
4.1.1. Reactivos	12
4.2. Metodología	14
4.2.1. Obtención y análisis genómico de bacteriófagos.....	14
4.2.2. Extracción de ácidos nucleicos de bacteriófagos.....	14
4.2.3. Anotación de genomas de fagos e identificación y caracterización de genes de las endolisinas.....	15

4.2.4. Clonamiento y transformación de genes que codifican endolisinas.....	15
4.2.5. Expresión de los genes de las endolisinas seleccionadas en el vector pET14b.....	18
4.2.6. Ensayo de actividad antimicrobiana de la endolisina.....	19
5. Resultados	20
5.1. Análisis comparativo de los genomas de bacteriófagos.....	20
5.2. Identificación y selección de secuencias de genes que codifican endolisinas presentes en genomas de bacteriófagos.	24
5.3. Producción de extractos de proteínas enriquecidos con las endolisinas seleccionadas.....	28
5.4. Evaluación de la actividad bactericida de las endolisinas contra las cepas <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> y <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	31
6. Discusión.	35
7. Conclusiones.....	39
8. Bibliografía.....	40
9. Anexos	48

Índice de Figuras

Figura 1: Evolución de los valores exportados en cerezas y nueces entre los años 2020 y primer semestre del 2023.	2
Figura 2: Signología del cáncer bacteriano producido por <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> en cerezos.....	4
Figura 3: Signología de la peste negra producida por <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> en nogales.....	5
Figura 4: Bacteriófagos.....	8
Figura 5: Estructura y clasificación de familias de endolisinas.	9
Figura 6: Alineamiento de genomas de los bacteriófagos de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> y <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	23
Figura 7: Modelo estructural tridimensional de las endolisinas seleccionadas.	28
Figura 8: Amplificación de secuencias de los genes que codifican las endolisinas seleccionadas por PCR.	29

Figura 9: Verificación de las inserciones del gen de las endolisinas en los plásmidos.	30
Figura 10: Evaluación de la actividad bactericida de los extractos enriquecidos con endolisinas derivadas del bacteriófago de Pss.....	32
Figura 11: Evaluación de la actividad bactericida de los extractos enriquecidos con endolisinas derivadas del bacteriófago de Xaj.	34

Índice de Tablas

Tabla 1: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en la memoria.....	13
Tabla 2: Partidores para la amplificación de las endolisinas glucosidasa y amidasas.	15
Tabla 3: Programa gradiente y reactivos necesarios para la realización de PCR.....	16
Tabla 4: Datos genómicos de los siete bacteriófagos secuenciados de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	21
Tabla 5: Datos genómicos de los siete bacteriófagos secuenciados de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	22
Tabla 6: Resumen de la cantidad de genes hipotéticos que codifican diferentes familias de endolisinas presentes en los bacteriófagos de Xaj y Pss.	24
Tabla 7: Identificación y Caracterización de las endolisinas codificadas en los genomas de los bacteriófagos de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> y <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	26

Índice de Anexos

Anexo 1: Extracción de ADN genómico de los bacteriófagos con el método de fenol – cloroformo.....	48
Anexo 2: Microscopía electrónica de transmisión de los distintos bacteriófagos de Xaj y Pss.	50
Anexo 3: Digestión de plásmido pGEM-Xaj/Pss con enzimas de restricción <i>Xho</i> I y <i>Nco</i> I. 51	
Anexo 4: Digestión de plásmido pET14b con enzimas de restricción <i>Xho</i> I y <i>Nco</i> I.	51
Anexo 5: Evaluación bactericida de los extractos de endolisinas contra las bacterias Pss y Xaj.	52

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
Abi	<i>Abortive infection system</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido Ribonucleico
Cam	Cloranfenicol
CRISPR-Cas	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas</i>
dNTPs	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
g	Gravedad
HGT	<i>Horizontal gene transfer</i>
IPTG	<i>Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside</i>
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobases
LB	Medio Luria Bertani
M	Concentración molar
mg	Miligramos
mM	Concentración milimolar
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
ng	Nanogramos
OD ₆₀₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PFU	<i>Plaque-Forming Unit</i>
Pss	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Pv	Patovar
S	Segundos
Sie	<i>Superinfection</i> exclusion
Str	Estreptomicina
TBE	Tris-Borato-EDTA

T3SS	Sistema de secreción de tipo III
U	Unidades enzimáticas
UFC	Unidades formadoras de colonias
USD	<i>United States Dollars</i>
Xaj	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>
X-gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside</i>

Resumen

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (Pss) es responsable de la enfermedad conocida como "cáncer bacteriano" en cerezos. Esta bacteria patógena puede causar diversos signos en los árboles, como manchas necróticas en hojas, tallos y frutas, lo que resulta en una disminución en la calidad y rendimiento del cultivo. Por otro lado, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj) es el agente etiológico de la peste negra del nogal, una enfermedad presente en todos los nucedales a nivel mundial, que también con las condiciones adecuadas del desarrollo de la enfermedad puede provocar mermas productivas significativas.

Estas enfermedades tienen tratamientos clásicos con agroquímicos a base de cobre y últimamente antibióticos, su uso prolongado ha generado una creciente selección de cepas resistentes. Actualmente, los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de nuevas estrategias de biocontrol que sean eficientes y amigables con el medio ambiente, como es el caso de los bacteriófagos (fagos). Estos han demostrado ser una opción para el control de Xaj y Pss debido a sus capacidades para infectar y lisar a sus hospederos. Sin embargo, tienen limitaciones como que se debe contar con una exhaustiva caracterización de las cepas hospederas, dado su especificidad de infección.

Por otra parte, los avances en técnicas moleculares han permitido conocer y caracterizar en detalle la biología de los fagos. Esto ha permitido identificar proteínas de alto interés biotecnológico como son las endolisinas.

Las endolisinas son enzimas que están presentes en los genomas de los fagos y desempeñan un papel crucial en la lisis bacteriana al finalizar el ciclo replicativo. Su función es hidrolizar la pared celular de las bacterias infectadas de modo de liberar la nueva progenie viral al medio. Esta actividad tiene interesantes aplicaciones biotecnológicas como antibacteriano. Diversos estudios han demostrado su eficacia en áreas como medicina humana y veterinaria; sin embargo, a la fecha no se han reportado su uso para el control de Pss y Xaj.

En esta memoria, se identificaron tres familias de endolisinas en bacteriófagos que infectan cepas de Xaj y Pss. De estas, 12 se clasificaron como glucosidasas, 4 como amidasas y 1 como endopeptidasa. Se evaluó la actividad antimicrobiana de dos enzimas contra las bacterias fitopatógenas Pss y Xaj, para ello se seleccionaron dos endolisinas:

una de la familia de las glucosidasas y otra de las amidadasas, provenientes de los fagos Xaj_4,1 y Pss_63, respectivamente.

Los resultados indicaron que las endolisinas disminuyeron significativamente la viabilidad de las bacterias fitopatógenas en pruebas in vitro. En el caso de las amidadasas lograron reducir la viabilidad de Pss en hasta un 99,9 % y Xaj en hasta un 95%. De manera similar, las glucosidasas redujeron la viabilidad de Pss en un 99,9 % y Xaj en hasta un 95%. Esto sugiere que poseen un gran potencial como agentes de biocontrol.

Abstract

“Evaluation of endolysins with bactericidal capacity against economically important phytopathogenic bacteria”

Pseudomonas syringae pv. syringae (Pss) is responsible for the disease known as "bacterial canker" in cherry trees. This pathogenic bacterium can cause various symptoms in the trees, such as necrotic spots on leaves, stems, and fruits, resulting in a decrease in the quality and yield of the crop. On the other hand, *Xanthomonas arboricola pv. juglandis* (Xaj) is the causal agent of walnut blight, a disease present in walnut orchards worldwide, which, under suitable conditions for disease development, can lead to significant production losses.

These diseases have been traditionally treated with copper-based agrochemicals and, more recently, antibiotics. However, prolonged use of these treatments has led to an increasing selection of resistant strains. Currently, efforts have focused on developing new biocontrol strategies that are efficient and environmentally friendly, such as the use of bacteriophages (phages). Phages have shown promise in controlling Xaj and Pss due to their ability to infect and lyse their hosts. However, they have limitations, such as the need for thorough characterization of host strains due to their specificity of infection.

Moreover, advancements in molecular techniques have allowed for a detailed understanding and characterization of phage biology. This has enabled the identification of proteins of high biotechnological interest, such as endolysins.

Endolysins are enzymes present in the genomes of phages and play a crucial role in bacterial lysis at the end of the phage replication cycle. Their function is to hydrolyze the cell wall of infected bacteria, thereby releasing the new viral progeny into the environment. This activity has interesting biotechnological applications as antibacterial agents. Various studies have demonstrated their efficacy in fields such as human and veterinary medicine; however, to date, their use for controlling Pss and Xaj has not been reported.

In this study, three families of endolysins were identified in bacteriophages that infect strains of Xaj and Pss. Among these, 12 were classified as glycosidases, 4 as amidases, and 1 as an endopeptidase. The antimicrobial activity of two enzymes against the phytopathogenic bacteria Pss and Xaj was evaluated. Two endolysins were selected: one from the glycosidase family and the other from the amidase family, derived from the phages Xaj_4,1 and Pss_63, respectively.

The results indicated that the endolysins significantly reduced the viability of the phytopathogenic bacteria in in vitro tests. Amidases reduced the viability of Pss by up to 99.9% and Xaj by up to 95%. Similarly, glycosidases reduced the viability of Pss by 99.9% and Xaj by up to 95%. This suggests that they have great potential as biocontrol agents.

1. Introducción

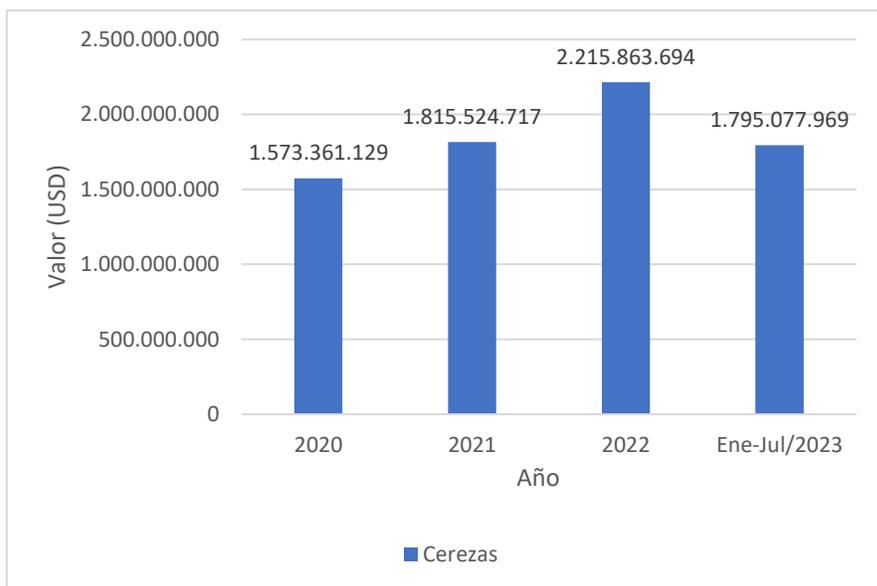
1.1. Importancia económica de la exportación del cerezo y el nogal en Chile

Desde las últimas décadas, Chile ha experimentado un importante desarrollo económico que lo ha posicionado como uno de los mayores exportadores de materia prima en el hemisferio sur (López, 2012; Subrei-ProChile, 2021), esto es gracias a los 29 acuerdos comerciales firmados con más de cincuenta países, siendo esto apoyado por las favorables condiciones geográficas y climatológicas presentes en Chile como también la fiabilidad y cumplimiento de la sanidad vegetal dada por las normas internacionales (Pefaur, 2020). Durante 2021, se reportaron 58 productos de exportación, entre los cuales, las frutas frescas y secas se destacaron al estar posicionadas entre los primeros puestos de exportaciones mundiales (Pefaur, 2020; Subrei-ProChile, 2021). La cantidad de frutos exportados superaron los 2.200 millones de toneladas, por un valor de USD 5.414 millones, entre los meses de enero a julio del 2023 (Pefaur, 2023).

Para el primer semestre del 2023 las exportaciones de frutas frescas y frutas secas fueron significativas para el país. En la categoría de frutas frescas, se registraron ganancias totales aproximadas de 4.000 millones USD. Destacando dentro de este rubro, la cereza emergió como la principal especie exportada, generando ingresos por 393 millones USD (**Figura 1.A**), con China como el destino principal de estos envíos (Pefaur, 2023). Por otro lado, en el segmento de frutas secas, las ganancias totales alcanzaron los 394 millones USD. La nuez se posicionó como la especie líder en exportaciones, contribuyendo con 215 millones USD a este valor (**Figura 1.B**). Países como India y Turquía fueron los destinos destacados para estas exportaciones de frutas secas (Pefaur, 2023).

En resumen, esta industria ha crecido vertiginosamente en la última década, sin embargo, se presentan constantes desafíos a superar para mantener su nivel competitivo mundialmente, entre ellos el estado fitosanitario de las plantas. Debido a que un brote producto de algún microorganismo fitopatógeno, puede generar cuantiosas pérdidas productivas.

A.



B.

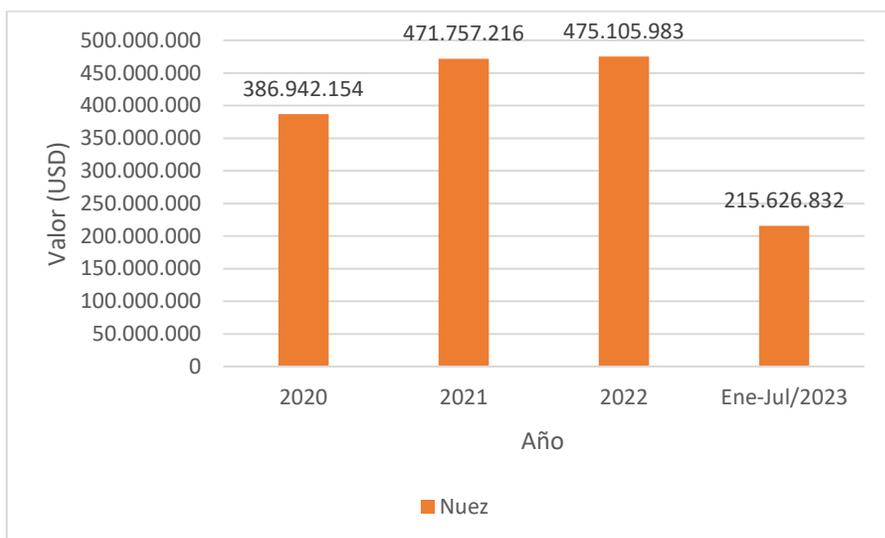


FIGURA 1: EVOLUCIÓN DE LOS VALORES EXPORTADOS EN CEREZAS Y NUECES ENTRE LOS AÑOS 2020 Y PRIMER SEMESTRE DEL 2023.

A. Valor de la exportación (en USD) de las cerezas (Imagen modificada de Pefaur, 2023). **B.** Valor de la exportación (en USD) de las nueces (Imagen modificada de Pefaur, 2023).

1.2. Infecciones bacterianas en la industria frutícola.

A pesar de la existencia en Chile de organismos estatales y privados encargados del mejoramiento y protección de las diversas especies vegetales para la exportación, existen diferentes causas para las pérdidas de productividad en estos cultivos. Éstas

pueden ser de naturaleza biológica como microorganismos fitopatógenos, animales y malezas. Estudios han estimado que a nivel mundial estos organismos han generado pérdidas de entre el 20% al 40% de la productividad agrícola (Savary et al., 2012).

Para el caso del cerezo (*Prunus avium* L.) es afectado por diversos microorganismos fitopatógenos tales como: hongos, pseudohongos, virus, fitoplasmas, nematodos y bacterias (Lemus, 2020). A su vez, la principal enfermedad bacteriana es el cáncer bacteriano debido a pérdidas de producción.

El cáncer bacterial se desarrolla preferentemente en áreas de climas fríos o templados, con abundantes precipitaciones y alta humedad (Torres et al., 2006; Xin et al., 2018). Habitualmente afecta árboles jóvenes, y se ha reportado que en casos extremos podría provocar la muerte de sobre el 50% de la plantación (Torres et al., 2006). En el caso de árboles adultos, se desencadenan respuestas de defensa que incluyen la secreción de gomas oscuras (**Figura 2.A**), con un distintivo olor a fermentado. Estas secreciones suelen manifestarse alrededor de zonas de necrosis o canchales en la madera (**Figura 2.B**) (Correa et al., 2022; Lemus, 2020). Sin embargo, el avance de la infección genera una merma en la calidad del fruto (nivel de calidad menor al de exportación), y con el tiempo muerte de la rama. En casos extremos puede provocar la muerte del árbol completo.

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (Pss) es la bacteria patógena responsable de esta enfermedad. Pss emplea múltiples mecanismos para entrar en las plantas de cerezos, principalmente a través de aberturas naturales como estomas y heridas (podas, daño mecánico, etc) (Lemus, 2020). Pss es una bacteria Gram negativa que se caracteriza por su forma de bastón y su movilidad, proporcionada por flagelos polares. Además, presenta una gran adaptabilidad gracias a su capacidad de generar biopelículas, permitiendo su supervivencia en diversas condiciones ambientales (Lemus, 2020). Por otro lado, Pss produce toxinas como la siringomicina y la siringopeptina, las cuales alteran las membranas de las células vegetales y facilitan la colonización (Katagiri et al., 2002), esto es ayudado por el sistema de secreción de tipo III (T3SS), que es crucial para facilitar su entrada en la planta (Buriani et al., 2018).

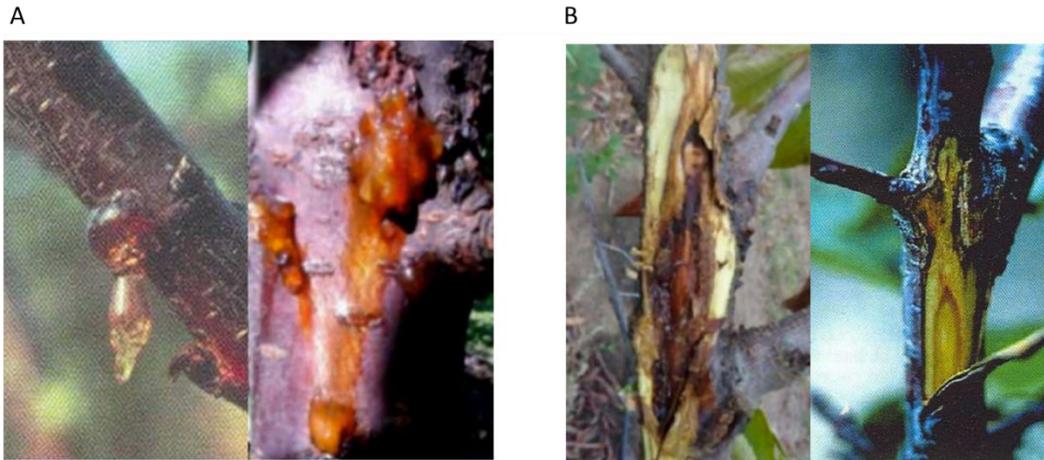


FIGURA 2: SIGNOLOGÍA DEL CÁNCER BACTERIANO PRODUCIDO POR *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE* EN CEREZOS.

A. Exudado de goma rodeando la infección (Imagen modificada de Lemus, 2020 y Torres et al., 2006).
B. Cancro presente en el tronco del cerezo (Imagen modificada de Lemus, 2020 y Torres et al., 2006).

Por otro lado, cuando se estudia el caso del nogal (*Juglans regia* L.), éste también es infectado por diversos microorganismos fitopatógenos tales como hongos, nematodos, virus y bacterias (Osman, 2022). Sin embargo, la peste negra es la enfermedad bacteriana más relevante debido a las pérdidas de producción asociadas a ella (Kim et al., 2021).

En temporadas de precipitaciones en combinación con temperaturas superiores a los 18°C se generan las condiciones adecuadas para una rápida proliferación de la enfermedad (Higuera et al., 2015), produciendo en casos extremos pérdidas sobre el 50% de la producción en Chile (Pinilla y Álvarez, 1997). La infección puede ingresar al nogal por aberturas naturales (estomas y lenticelas) y heridas (Osman, 2022). Además, en nueces maduras la infección puede decolorar la cáscara y la pulpa de las nueces, llegando en algunos casos a la caída prematura de la nuez (**Figura 3**) (Lamichhane, 2014; Osman, 2022).

El patógeno responsable de producir esta enfermedad es *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj), una bacteria Gram negativa que se caracteriza por su forma de bastón y su movilidad proporcionada por un flagelo. Esta bacteria es altamente adaptable, lo que le permite sobrevivir en diversas condiciones ambientales (Kim et al., 2021). Además, Xaj posee el sistema de secreción de tipo III (T3SS), necesario para manipular procesos celulares de la planta con el objetivo de favorecer su supervivencia y rápida proliferación (Kałużna et al., 2021). Por otro lado, se ha encontrado una diversidad genética en esta

bacteria, obteniendo diversas cepas que presentan diferencias en su patogenicidad y resistencia, lo que genera dificultades en su epidemiología y, por lo tanto, en su control (Cuesta-Morrondo et al., 2022; Cesbron et al., 2015).

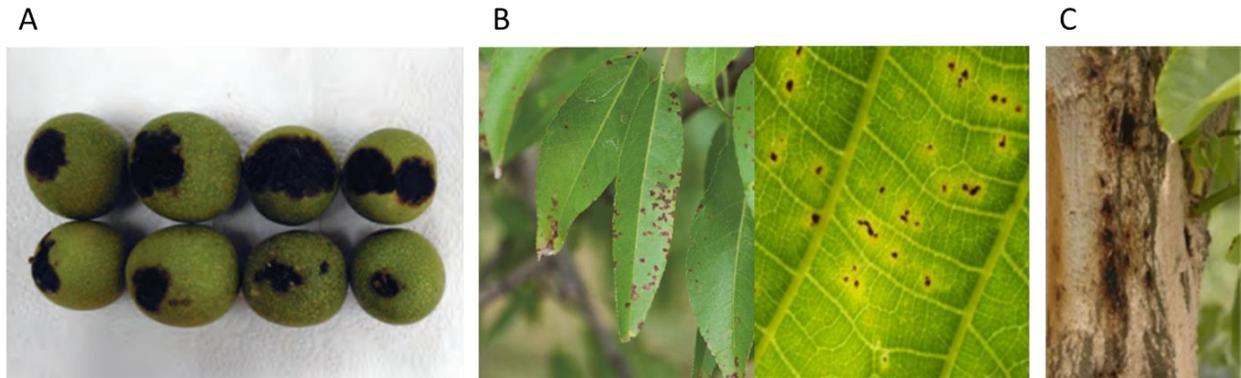


FIGURA 3: SIGNOLOGÍA DE LA PESTE NEGRA PRODUCIDA POR *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *JUGLANDIS* EN NOGALES.

A. Signología en frutos inmaduros de peste negra, zonas ennegrecidas producto de la muerte y pudrición del tejido (Imagen modificada de Osman, 2022). **B.** Manchas necróticas con halos cloróticos en hojas (Imagen modificada de Kim et al., 2021 y Lamichhane, 2014). **C.** Cancros en tallo (Imagen modificada de Kim et al., 2021).

1.3. Estrategias tradicionales para el control de infecciones bacterianas en plantas

Para enfrentar estas enfermedades bacterianas, se han recomendado medidas basadas en la prevención de la infección, como la generación de medios desfavorables para los patógenos, para que se disminuya el inóculo y se restringe el establecimiento de estos organismos (Osman, 2022). La primera es un manejo cultural (buenas prácticas), como por ejemplo proteger las heridas, las cuales pueden ser generadas por podas, inducción de yemas florales, caídas de hojas, así como eliminación de material vegetal infectado (Lemus, 2020; Osman, 2022; Torres et al., 2006), o recomendaciones como la eliminación de los cancros de forma que la infección no se propague e infecte a la fruta (Lamichhane, 2014; Lemus, 2020). Otra alternativa de prevención es la utilización de biocontroladores, como es el caso de bacterias como *Bacillus subtilis*, que es capaz de competir por espacio y nutrientes desplazando al patógeno sin producir daño en el cultivo (Lemus, 2020; Osman, 2022).

Por otro lado, durante décadas, los productos químicos han sido el método clásico de control para eliminar fitopatógenos en la agricultura, principalmente mediante aspersiones de compuestos bactericidas (Lemus et al., 2019). Entre estos, los más

importantes han sido aquellos a base de cobre como los óxidos cuprosos y el sulfato de cobre, entre otros. Sin embargo, en tiempos recientes ha aumentado considerablemente el uso de agroquímicos basados en antibióticos, como el sulfato de estreptomina y la gentamicina. (Lamichhane et al., 2018; Pinilla y Alvarez, 2003).

La utilización de estos agroquímicos a lo largo de las últimas décadas ha generado la reducción en la eficacia de los tratamientos, disminuyendo el control de estas enfermedades (Beltrán et al., 2021; Lamichhane, 2014; Lamichhane et al., 2018). Este hecho se explica por la selección de cepas bacterianas resistentes a cobre (Aprile et al., 2021; Beltrán et al., 2021; Fu et al., 2021; Higuera et al., 2015), a antibióticos (Han et al., 2004) o a ambos tipos de compuesto (Sundin y Bender, 1993; Vanneste et al., 2005).

Existen dos mecanismos moleculares importantes para que las bacterias sean resistentes. El primero de ellos es la obtención de resistencia gracias a mutaciones adaptativas que sean selectivamente favorables para las bacterias (Martinez y Baquero, 2000). El segundo mecanismo es gracias la transferencia horizontal de genes (o HGT), en donde la bacteria es capaz de obtener e incorporar un ADN externo que contiene genes que codifican resistencia a estos tratamientos (Martinez, 2014; Thomas y Nielsen, 2005). Estos mecanismos proporcionan a las bacterias diversas estrategias para resistir a los antibióticos, como la capacidad de destruir, inactivar o modificar los compuestos antibióticos (Munita y Arias, 2016). Además, también les confieren mecanismos de resistencia al cobre, frecuentemente asociados con los genes Cop, los cuales pueden estar involucrados en sistemas de eflujo, oxidasas multicobre y transportadores del tipo ABC (Ladomersky y Petris, 2015).

1.4. Bacteriófagos para el biocontrol de infecciones bacterianas: Una nueva alternativa de manejo.

La pérdida de eficacia de los tratamientos actuales ha impulsado nuevas investigaciones buscando alternativas para controlar estos microorganismos fitopatógenos. Diversos estudios han reportado una amplia variedad de organismos y compuestos biológicos que demuestran capacidad antimicrobiana (Browne et al., 2020; Golkar et al., 2014; Yang et al., 2023), destacándose entre ellos los bacteriófagos (**Figura 4.A.**)

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan exclusivamente bacterias, por lo que han sido definidos como parásitos intracelulares obligados (Joerger, 2003; Mills et al., 2017). Estos organismos son clasificados mediante análisis genómicos (Adriaenssens y

Rodney Brister, 2017), determinando así diferentes órdenes taxonómicos, siendo el orden *Caudovirales* el más relevante por su gran cantidad de miembros estudiados (Ackermann, 2009; Orlova y Orlova, 2012). Se pueden identificar por poseer cabezas poliédricas unidas a una cola helicoidal, como también por albergar ADN de doble hebra (Ackermann, 2009; Mills et al., 2017). A su vez, este orden se puede dividir clásicamente en tres familias: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae* (Mills et al., 2017).

El ciclo replicativo del fago (**Figura 4.B**) inicia con la unión complementaria del fago a receptores específicos presentes en la superficie de la bacteria (Drulis-Kawa et al., 2012; Lin et al., 2017), facilitando así la inyección del material genómico viral en la bacteria hospedera. Luego pueden suceder dos escenarios: por una parte, algunos fagos poseen un ciclo lisogénico (fagos temperados), donde el genoma del bacteriófago puede integrarse en el cromosoma bacteriano generando un profago, siendo capaces de mantenerse al interior de la bacteria hospedera sin lisarla (Drulis-Kawa et al., 2012; Mills et al., 2017); sin embargo, éstos no son considerados adecuados para el desarrollo de biocontroladores de patógenos, debido a eventos de transducción (Harada et al., 2018).

Por otro lado, también existen bacteriófagos virulentos, los cuales poseen un ciclo lítico que se caracteriza por el secuestro de la maquinaria metabólica de la bacteria, de tal manera que se produzcan nuevas partículas virales, para finalmente lisar a la bacteria hospedera liberando la nueva progenie al ambiente (Harada et al., 2018; Lin et al., 2017). Debido a su destacada capacidad de lisis, estos agentes son reconocidos como candidatos ideales para diversas estrategias de control de bacterias patógenas (fagoterapia). Su aplicabilidad se extiende a sectores tan diversos como en medicina humana, veterinaria hasta la industria agraria (Harada et al., 2018; Vikram et al., 2021).

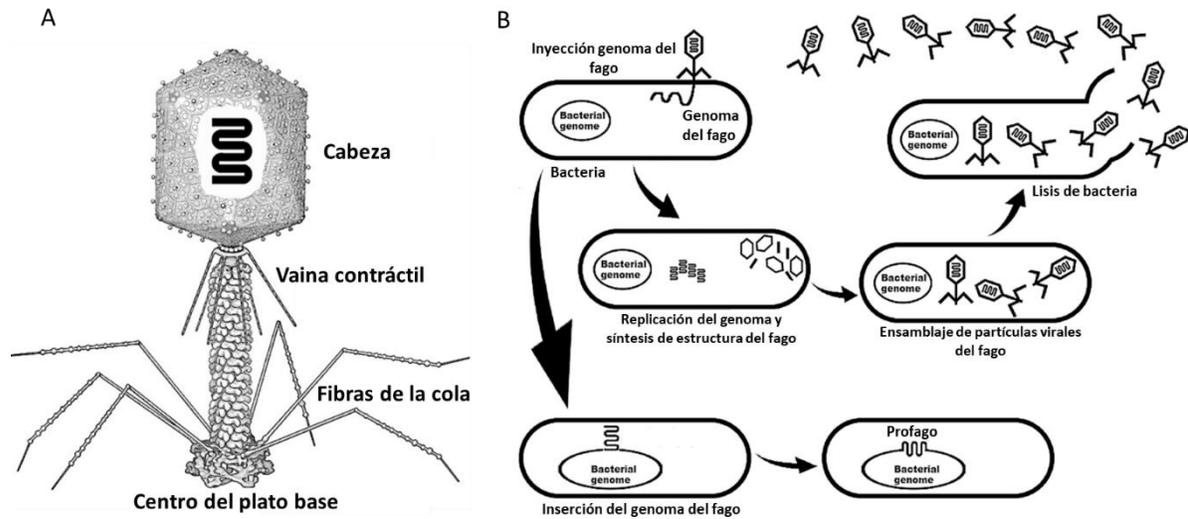


FIGURA 4: BACTERIÓFAGOS.

A. Representación típica de los bacteriófagos (Imagen modificada de Harada et al., 2018). **B.** Mecanismos de acción del ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos durante la infección (Imagen modificada de Harada et al., 2018).

A pesar de esto, los bacteriófagos han mostrado diversas desventajas. La más relevante es la resistencia que han generado las bacterias hacia los bacteriófagos, la cual se ha adquirido por diferentes mecanismos (Drulis-Kawa et al., 2012), entre los principales están: (i) prevenir la adsorción, donde se eliminan o modifican los receptores de unión de la superficie bacteriana (Olszak et al., 2017), (ii) impedir el ingreso del ADN del bacteriófago, gracias a diversas proteínas presentes en la membrana plasmática que pertenecen al sistema de exclusión de sobreinfección (o Sie) (Isaev et al., 2021; Olszak et al., 2017), (iii) degradar el ADN del fago gracias a sistemas CRISPR-Cas (Lopatina et al., 2020) y (iv) bloquear todos los mecanismos necesarios para el ensamblaje de las partículas virales, debido al sistema de infección abortiva (o Abi), donde se suspende el metabolismo de la bacteria o se conduce a la muerte celular (Lopatina et al., 2020; Olszak et al., 2017).

1.5. Endolisinas de fagos como un bactericida en bacterias patógenas

Gracias a los avances en las investigaciones e incremento en el conocimiento sobre la biología de los fagos, se han desarrollado líneas de investigación de proteínas provenientes de bacteriófagos que servirían como antibacterianos, las endolisinas.

Las endolisinas son proteínas responsables de destruir la envoltura de la bacteria durante la última etapa del ciclo de replicación de los fagos, la lisis (Drulis-Kawa et al., 2012). Este mecanismo se basa en la hidrólisis del peptidoglicano presente en la pared

celular bacteriana, esta estructura protege el protoplasto de daños mecánicos y de la lisis osmótica. La ausencia de esta pared resulta en la liberación del contenido interno de la bacteria (Liu et al., 2023).

Por otro lado, estas proteínas pueden tener diferentes dominios (**Figura 5.A.**). Por ejemplo, algunos están constituido solo por un dominio de características catalíticas (Pennone et al., 2019), otros poseen dos dominios, encontrándose el dominio catalítico y el dominio de unión a la pared celular (Briers et al., 2007) y, por último, otros péptidos pueden poseer hasta tres dominios (Fujiki et al., 2018). Se ha observado que estas proteínas muestran notables éxitos en su actividad antimicrobiana (Gondil y Chhibber, 2021; Rahman et al., 2021).

Las endolisinas se clasifican dependiendo del tipo de sustrato (Drulis-Kawa et al., 2012), clasificándose en tres grupos (**Figura 5.B.**): (i) glucosidasa, que hidrolizan los enlaces glicosídicos β -1,4 de las cadenas de ácidos N- acetilmurámico y N- acetilglucosamina, (ii) amidasas, las cuales tienen de sustrato los enlaces amidas presente entre un residuo perteneciente a la cadena de ácidos N-acetilmurámico con un péptido determinado y (iii) endopeptidasas, que hidrolizan el enlace peptídico presente entre dos aminoácidos particulares (Abdelrahman et al., 2021; Rahman et al., 2021).

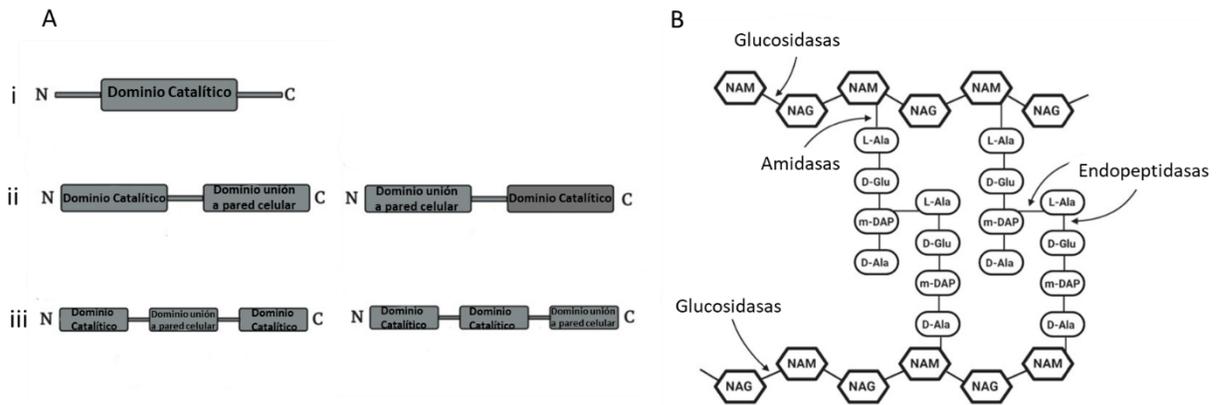


FIGURA 5: ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE FAMILIAS DE ENDOLISINAS.

A. Estructura de las endolisinas según el tipo de dominios presentes (Imagen modificada de Abdelrahman et al., 2021). **B.** Clasificación de endolisinas dependiendo del enlace químico capaz de escindir (Imagen modificada de Abdelrahman et al., 2021).

Entonces, gracias a su capacidad de degradar el peptidoglicano, las endolisinas se consideran excelentes agentes terapéuticos. Es así como se han desarrollado diversas

investigaciones en diferentes áreas de la salud humana (Fernandes et al., 2012; Kim et al., 2020a; Lu et al., 2021; Yan et al., 2019) y animal (Deng et al., 2023; Fan et al., 2016; Hoopes et al., 2009; Junjappa et al., 2013), dirigido al control de infección bacterianas, inclusive para cepas resistentes a antibióticos. No obstante, son escasas las investigaciones en el área de la agricultura, por lo que obtener estas endolisinas permitiría desarrollar un nuevo biocontrol de bacterias fitopatógenas que afectan a cultivos de importancia económica.

2. Hipótesis

Teniendo en consideración los antecedentes mencionados, se plantea en este trabajo de investigación la siguiente hipótesis:

Las endolisinas provenientes de bacteriófagos que infectan bacterias fitopatógenas, presentan un efecto bactericida frente a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Evaluar el efecto bactericida de endolisinas con distintas actividades hidrolasas, proveniente de bacteriófagos que infectan bacterias fitopatógenas contra, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

3.2. Objetivos Específicos

Objetivo específico N°1: Identificar secuencias de endolisinas proveniente de bacteriófagos que infectan *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Objetivo específico N°2: Caracterizar genómicamente y seleccionar secuencias de endolisinas con distintas actividades hidrolasas, provenientes de bacteriófagos que infectan *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Objetivo específico N°3: Evaluar el efecto bactericida *in vitro* de endolisinas frente *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

4. Materiales y Métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Reactivos

- **Calbiochem:** Sulfato de estreptomicina.
- **Duchefa Biochemie:** Ampicilina sódica.
- **EMSURE®:** Cloroformo para análisis, Etanol absoluto, Cloruro de Potasio, Fosfato monopotásico, Tris.
- **Gibco™:** Peptona Bacto™, Extracto de levadura Bacto™, NaCl.
- **InvitroGen:** dNTP Set (100 mM), *Platinum™ SuperFi™ II DNA Polymerase*, *5X SuperFi™ II Buffer*, *Proteinase K Solution (20 mg/mL) RNA grade*, *Platinum™ Taq DNA Polymerase (5U/uL)*, *10X PCR Buffer*, Cloruro de magnesio (50 mM).
- **New England Biolabs, Inc:** 10X rCutSmart Buffer, 1X NEBuffer r1.1, *NcoI* (10.000 U/mL), *XhoI* (20.000 U/mL).
- **MaestroGen, Inc:** 1Kb Plus *DNA Ladder*, 100bp Plus *DNA Ladder*.
- **Lonza:** SeaKem® LE Agarosa.
- **Oxoid™:** *Agar Bacteriological*
- **Promega:** λ DNA/*HindIII* Markers, *2X Rapid Ligation Buffer*, T4 *DNA Ligase* (100 U), *RQ1 RNase-Free DNase* (1000 U), *Stop Solution*, *RQ1 DNase 10X Reaction Buffer*
- **Sigma-Aldrich:** Dodecilsulfato sódico, *X-Gal Solution*, IPTG, Fosfato de sodio dibásico heptahidratado, Cloruro de magnesio anhidro, Agua libre de nucleasas.
- **Thermo Scientific™:** *GeneRuler Low Range DNA Ladder*.
- **Winkler:** Acetato de Sodio 3M pH 5,2, Fenol Saturado Básico, Acrilamida, Bis-acrilamida, EDTA, Cloruro de potasio, Sulfato de magnesio, Fosfato sódico.

4.1.2. Cepas bacterianas y plásmidos

TABLA 1: CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN LA MEMORIA.

Cepa Bacteriana	Genotipo	Origen
<i>E. coli</i> One Shot™ TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galk rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Lab. Dr. Nicola Fiore
<i>E. coli</i> T7 Express <i>lysY/lq</i>	MiniF <i>lysY lacI^q</i> (CamR) / <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1</i> [lon] <i>ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--TetS) endA1</i> Δ(<i>mcrC-mrr</i>) 114::IS10	Lab. Dr. Carlos Blondel
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> P57	Cepa silvestre	Lab. Dr. Gastón Higuera
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 4.1	Cepa silvestre	Lab. Dr. Gastón Higuera
Plásmidos	Características	Origen
pGEM-T easy	Vector de clonamiento, AmpR	Lab. Dr. Nicola Fiore
pET21d(+)	Vector de expresión de proteínas, KanR	Lab. Dr. Carlos Blondel

4.2. Metodología

4.2.1. Obtención y análisis genómico de bacteriófagos.

Los 16 bacteriófagos contra *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, usados en esta Memoria han sido previamente aislados y caracterizados en el Laboratorio B-Visa, entre los años 2015 y 2019 (**Tabla 4 y 5**) (**Anexo 2**). Éstos provienen de muestras ambientales, tales como aguas de canales de regadíos y servidas. Los bacteriófagos son conservados en refrigeración a -80°C. Para reactivarlos se cultivó la bacteria hospedera correspondiente en medio LB, la que fue infectada con el bacteriófago. Este cultivo fue incubado con agitación durante 24 horas a 28°C. Luego, el cultivo se centrifugó durante 15 minutos por 7.000xg y el sobrenadante se filtró. Se determinó el título de cada fago a través de diluciones seriadas en buffer SM (Gelatina 0,01% m/v, MgSO₄*H₂O 8 mM, NaCl 100 mM, Tris 50 mM pH 7,5). La cuantificación se realizó por la prueba de microgota en doble agar descrito con anterioridad por Gaviria et al., (2012). La propagación de cada fago se repitió hasta la obtención de títulos mayores a 1*10⁹ PFU/mL.

4.2.2. Extracción de ácidos nucleicos de bacteriófagos.

Los ácidos nucleicos de los fagos fueron extraídos y purificados mediante el método de fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2006). La primera parte fue la concentración de fagos realizado a través de ultra centrifugación a 45.000xg durante 1 hora a 4°C. Luego, el pellet se resuspendió en buffer SM y se añadió ARNasas (10 mg/mL) y ADNasas (1 U/uL) con su respectivo buffer y se incubó a 37°C durante 1 hora y media. Después, para la ruptura de la cápside proteica del fago, se agregó proteinasa K (20 mg/mL) y SDS 10% p/v y se incubó por una hora a 65°C. Para la extracción de ADN del fago fenol cloroformo se añadió dos volúmenes de fenol saturado básico y dos volúmenes de cloroformo, se mezcló durante 30 s, luego se centrifugó durante 15 minutos a 10.000xg y se recuperó sólo la fase acuosa. Finalmente, se precipitaron los ácidos nucleicos agregando 1/10 volumen de acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol 100%, esto nuevamente se centrifugó a 15.000xg durante 10 minutos a 4°C y el pellet fue lavado con etanol frío al 70%, el ácido nucleico se resuspendió en agua libre de nucleasas. Se determinó la integridad de los ADNs obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE con condiciones de corrida de 40 minutos a 100 Volts. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV (**Anexo 1**). La cuantificación del ADN se realizó en Nanodrop 2000 (Thermo Fisher

Scientific). Se solicitó a la empresa Macrogen la secuenciación de los genomas, utilizando la plataforma Illumina HiSeq™ 4000.

4.2.3. Anotación de genomas de fagos e identificación y caracterización de genes de las endolisinas.

Los genomas obtenidos se ensamblaron y anotaron usando los programas bioinformáticos Patric V3.33.16 (Olson et al., 2023) y Geneious V11.0.18+10 (Kearse et al., 2012), en donde se caracterizó cada genoma de los fagos.

Posteriormente, se encontraron 25 posibles genes que codifican a endolisinas en los genomas. Para verificar si estas secuencias corresponden a endolisinas se utilizó Blastp V2.15.0 (Altschul et al., 1990), usando la base de datos nr. Para la elección, se realizaron filtros basándose en los parámetros descritos por Oliveira et al., (2013), considerando para ello proteínas que presentaron un valor de identidad igual o superior al 75%, una cobertura del 80% y un valor de corte de e-value menor a 1×10^{-5} con respecto a una secuencia proteica de endolisina ya descrita en la base de datos. Para asegurar que estas proteínas corresponden a endolisina, se utilizó Interpro V97.0 (Blum et al., 2021), determinando la presencia de los dominios de lisozima (PF18896) o de los dominios de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (IPR002502).

Además, con el objetivo de realizar una primera exploración de los residuos aminoácidos de las endolisinas seleccionadas, se generaron dos modelos estructurales tridimensionales. Para esto, se emplearon Alpha Fold V2.1.2 (Jumper et al., 2021) y Swiss-Model (Waterhouse et al., 2018).

4.2.4. Clonamiento y transformación de genes que codifican endolisinas.

Se diseñaron partidores específicos para cada gen que codifica a la endolisina seleccionada mediante el programa Geneious V11.0.18+10 (Kearse et al., 2012). Además, para agregar el sitio de restricción para la enzima *Xho*I a la amplificación, a estos partidores se les añadió 13 nucleótidos (**Tabla 2**).

TABLA 2: PARTIDORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LAS ENDOLISINAS GLUCOSIDASA Y AMIDASAS.
 La zona subrayada destaca el sitio de restricción para la enzima *Xho*I.

Partidores endolisinas		
Xaj Glucosidasa	Forward	ATGAACCAGCAGCAGAACCA
	Reverse	<u>ACCTTCTCGAGTTTCACTTCACTTGGGGTTTCC</u>
Pss Amidasa	Forward	ATGGCCAAGGTTCAATTCAAGCC
	Reverse	<u>ACCTTCTCGAGTTTCAAGAGGCCGACCGTTGGG</u>

Los genes de las endolisinas seleccionadas fueron amplificadas por PCR utilizando la enzima de alta fidelidad ADN polimerasa Platinum™ SuperFi II (Invitrogen™), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (**Tabla 3.A**). El producto de la amplificación fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE y la banda fue extraída y purificada del gel con el sistema comercial “Gel/PCR DNA Fragments Extracción Kit” (Geneaid).

TABLA 3: PROGRAMA GRADIENTE Y REACTIVOS NECESARIOS PARA LA REALIZACIÓN DE PCR.

(A) Protocolos para amplificación de genes que codifican endolisinas. (B) Protocolos para verificación de colonias transformadas con vector que contiene el gen de la endolisina seleccionada.

A.

Reactivo	1X	Programa gradiente para primers > 30 nt	
Agua libre de nucleasas	13,6 μ L	1 ciclo	98°C por 30 s
5X SuperFi II Buffer	4 μ L	35 ciclos	98°C por 10 s
dNTPs (10mM)	0,4 μ L		72°C por 15s
Primer Forward (25 pmol/ μ L)	0,3 μ L		72°C por 5 min
Primer Reverse (25 pmol/ μ L)	0,3 μ L	1 ciclo	4°C por ∞
Platinum SuperFit II DNA Polymerase	0,4 μ L		
Muestra de ADN	1 μ L		
Volumen final	20 μ L		

B.

Reactivo	1X	Programa gradiente	
Agua libre de nucleasas	21,3 μ L	1 ciclo	94°C por 7 min
10X PCR Buffer	3 μ L	30 ciclos	94°C por 45 s
dNTPs (10mM)	1 μ L		50°C por 45s
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μ L		72°C por 45 s
Primer Forward (25 pmol/ μ L)	1 μ L	1 ciclo	4°C por ∞
Primer Reverse (25 pmol/ μ L)	2 μ L		
Platinum Taq DNA Polymerase	0,2 μ L		
Muestra de ADN	1 μ L		
Volumen final	30 μ L		

Para lograr la ligación del amplicón del gen de la endolisina en el plásmido pGEM-T (©Promega), al amplicón obtenido fue necesario adicionar un nucleótido de adenosina, esto

se realizó agregando agua libre de nucleasas, buffer 10X PCR, 1mM dATPs, 5 U/μL Taq ADN polimerasa (Invitrogen™), 50 mM MgCl₂ y el amplicón purificado. Posteriormente, se incubó a 72°C durante 20 minutos, y se almacenaron las reacciones a 4°C hasta su uso.

Para ligar el vector con el amplicón del gen de la endolisina, se mezcló el buffer de ligación 2X (©Promega), 50 ng/μL pGEM-T easy (©Promega), 3 U/μL ligasa T4 ADN (©Promega), del producto de PCR y se completa el volumen con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante una hora a 25°C. Además, se utilizó un control negativo de la inserción del amplicón, el plásmido pGEM-Teasy circularizado.

El vector pGEM con el gen de las endolisinas fue transformado por un choque térmico en *E. coli* One Shot™ TOP10 (Invitrogen™), para esto se agregó la reacción de ligación y se homogenizó suavemente para incubar en hielo durante 20 minutos. Luego de esto, las bacterias se sometieron a 42°C durante 1,5 minutos, seguido inmediatamente por un enfriamiento en hielo durante los siguientes 2 minutos. Al tubo se le agregó medio LB y se dejó incubando a 37°C durante 1,5 horas con agitación a 1000 xg. Después el cultivo es centrifugado a 10.000xg durante 2 minutos a 25°C, eliminando parte del sobrenadante y se resuspendió el pellet en el volumen restante. Finalmente, la suspensión bacteriana se sembró en placas LB suplementadas con ampicilina (100 μg/mL), estreptomicina (30 μg/mL), X-gal (20 μg/mL) e IPTG (100 μg/mL). Se incubó durante toda la noche a 37°C. Se incluyeron como controles negativos el vector pGEM sin el gen de la endolisina y sin la presencia de bacterias.

La transformación exitosa de las colonias con el plásmido provocó la formación de colonias blancas, que en agua libre de nucleasas se depositaron y homogeneizaron. Para comprobar la transformación de las bacterias, se realizó un PCR de colonias con las condiciones descritas en la **Tabla 3.B**, utilizando los partidores T7 y SP6. El amplicón es visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE, corrido a 135 Volt durante 35 minutos y observado en un transiluminador UV. El amplicón del tamaño esperado fue secuenciado en MacroGen y así se confirmó el gen de la endolisina en el vector pGEM. Las colonias que generaron el producto PCR esperado fueron cultivadas en LB en medio suplementado con ampicilina (100 μg/mL) y estreptomicina (30 μg/mL), durante toda la noche a 37°C con agitación a 100xg.

El plásmido pGEM con el gen de la endolisina se extrajo del cultivo con el sistema comercial “*Exprep Plasmid SV mini*” de GeneAll®. El plásmido purificado se digirió utilizando

las enzimas de restricción XhoI y NcoI. Se añadió 1 µg del plásmido, buffer 10X rCutSmart, las enzimas de restricción y se completó con agua libre de nucleasas. La reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, la reacción fue inactivada con proteinasa K (2 mg/µL) durante 1 hora a 65°C. Para analizar la digestión, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% en buffer TBE y se tiñó en nitrato de plata. Por otro lado, para purificar el fragmento del gen de la endolisina, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE gracias al sistema comercial “Gel/PCR DNA Fragments Extracción Kit” (Geneaid). De esta misma forma, fue digerido el plásmido pET14b con las enzimas XhoI y NcoI, posteriormente se extrajo la banda desde un gel de agarosa.

4.2.5. Expresión de los genes de las endolisinas seleccionadas en el vector pET14b.

El gen de la endolisina fue insertado en el plásmido pET14b gracias a la ligación por la enzima ligasa T4 ADN, utilizando el buffer de ligación 2X (©Promega), 50 ng/µL del vector pET, 3 U/µL enzima T4 ligasa (©Promega), 0,2 pmol del inserto y se alcanzó los 50 µL con agua libre de nucleasas. La ligación se dejó incubando durante 1 hora a temperatura a 25°C. Además, se utilizó un control negativo el cual no posee el inserto del gen de la endolisina.

El vector pET14b, que contiene el gen de la endolisina, se transformó mediante choque térmico en la cepa de *E. coli* T7 Express lysY/Iq (NEB). La bacteria transformada se mezcló suavemente con el plásmido ligado y se homogeneizó. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos sobre hielo. Luego, la reacción se incubó a 42°C durante 30 segundos e inmediatamente después se incubó durante 2 minutos en hielo. Después, al tubo se le agregó medio LB para incubar a 37°C durante 1 hora en agitación de 200xg. Después, el cultivo se centrifugó a 10.000xg durante 2 minutos a 25°C, se eliminó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendió en el volumen restante. La suspensión se sembró en placas de LB con medio suplementadas con ampicilina (100 µg/mL) para ser incubadas durante 48 horas a 25°C.

Las colonias crecidas en la placa con ampicilina fueron chequeadas con un PCR anidado para determinar la presencia del inserto, cuyo protocolo se indica en la **Tabla 3.B**, utilizando los partidores T7 promotor y T7 terminador. El amplicón se somete a un segundo PCR, siguiendo el protocolo detallado en la **Tabla 3.B**, utilizando los partidores correspondientes a los genes de las endolisinas. El amplicón obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE y corrido a 135 Volt durante 35 min

observado en transiluminador UV. Las colonias que mostraron el tamaño esperado del inserto fueron cultivadas en LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), siendo incubado a 37°C durante toda la noche con agitación a 200xg.

La transcripción del gen de las endolisinas se llevó a cabo mediante el uso de IPTG. El inóculo se obtuvo a partir de una colonia, la cual se resuspendió en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL). La colonia aislada se incubó a 37°C con agitación a 200xg durante toda la noche, incluyendo su respectivo control negativo sin bacteria. A partir de este cultivo, se realizó un inóculo al 1% en LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), y se incubó con agitación a 200xg hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5. Este medio fue suplementado con 100 mM de IPTG, y se incubó durante dos horas a 37°C. Luego, para cosechar las bacterias, este cultivo se incubó en hielo durante 30 minutos y luego se centrifugó a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5 y 200 mM NaCl), al cual se le agregó 1 mL de cloroformo al 0,1%.

Finalmente, el sobrenadante se centrifugó a 10.000xg durante 30 minutos a 4°C, se recuperó y se filtró utilizando un filtro con poros de 0,2 µm de diámetro, obteniendo así el extracto de proteínas totales enriquecido con la endolisina seleccionada.

4.2.6. Ensayo de actividad antimicrobiana de la endolisina.

Las bacterias de interés, Xaj 4,1 y Pss P57, se cultivaron en LB a 28°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,4. Posteriormente, para la desestabilización de la membrana externa de estas bacterias, fue necesario un tratamiento previo con EDTA, por lo que estas bacterias se centrifugaron a 10.000xg durante 10 minutos, y el pellet resultante se resuspendió en PBS pH 7,4 con 50 mM de EDTA. Además, se incluyó como control las bacterias fitopatógenas sin este tratamiento previo con EDTA.

Estas bacterias fueron incubadas durante 2 horas a 28°C (Jiang et al., 2021) bajo diferentes circunstancias; el tratamiento con el extracto de proteínas totales enriquecido con la endolisina, la utilización del extracto de proteínas totales que no se indujo el gen de la endolisina y, finalmente, en ausencia del tratamiento con este extracto de endolisinas. Este ensayo fue realizado en triplicado. Luego de la incubación, se contabilizó la viabilidad de las bacterias fitopatógenas en las distintas condiciones.

5. Resultados

5.1. Análisis comparativo de los genomas de bacteriófagos.

Se aislaron un total de 16 bacteriófagos que infectan a distintos aislados de Xaj y Pss. Estos fagos fueron caracterizados a nivel genómico y los resultados son presentados en las **Tablas 4** para los fagos de Xaj y **Tabla 5** para los fagos de Pss. Para el caso de los bacteriófagos de Xaj sus rangos de tamaños de genomas y porcentajes de GC son de entre 44 Kb a 146 Kb y 45,69% a 60%, respectivamente (**Tabla 4**). Los fagos de Pss sus rangos de tamaños de genomas y porcentajes de GC son de entre 37 Kb a 201 Kb y 47,82% a 58,41%, respectivamente (**Tabla 5**). Los bacteriófagos fueron nombrados según las normas planteadas por Adriaenssens y Rodney Brister, (2017).

Por otro lado, los bacteriófagos de Xaj pertenecen en un 85,7% a la familia *Podoviridae* y en un 14,3% a la familia *Siphoviridae*. Para los bacteriófagos de Pss, pertenecen en un 66,7% a la familia *Siphoviridae*, el 22,2% a la familia *Podoviridae* y en un 11,1% a la familia *Myoviridae*.

TABLA 4: DATOS GENOMÉTRICOS DE LOS SIETE BACTERIÓFAGOS SECUENCIADOS DE *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *JUGLANDIS*.

1. Nombre asignado de acuerdo con los criterios descritos por Adriaenssens y Rodney Brister, (2017).

Bacteriófago ¹	Alias	Caracterización morfológica	Tamaño del Genoma (pb)	Contigs	ORFs	Contenido G+C%	Cantidad de posibles genes de endolisinas
<i>Xanthomonas</i> phage vB_XajP-M310-91a	Φ Xaj M310-91a	<i>Podoviridae</i>	75489	1	124	52,76	1
<i>Xanthomonas</i> phage vB_XajP-M307-70a	Φ Xaj M307-70a	<i>Podoviridae</i>	146610	1	260	45,69	2
<i>Xanthomonas</i> phage vB_XajP-M4-109a	Φ Xaj M4-109a	<i>Podoviridae</i>	44443	1	56	59,98	1
<i>Xanthomonas</i> phage vB_XajS-M2-2	Φ Xaj M2-2	<i>Siphoviridae</i>	50914	1	65	59,93	2
<i>Xanthomonas</i> phage vB_XajP-36	Φ Xaj 36	<i>Podoviridae</i>	44443	1	55	59,99	3
<i>Xanthomonas</i> phage vB_XajP-6	Φ Xaj 6	<i>Podoviridae</i>	44443	1	56	60,00	2
<i>Xanthomonas</i> phage vB_XajP-4.1	Φ Xaj 4.1	<i>Podoviridae</i>	44443	1	56	59,98	2

TABLA 5: DATOS GENOMÉTRICOS DE LOS SIETE BACTERIÓFAGOS SECUENCIADOS DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE*.

1. Nombre asignado de acuerdo con los criterios descritos por Adriaenssens y Rodney Brister, (2017).

Bacteriófago ¹	Alias	Caracterización morfológica	Tamaño del Genoma (pb)	Contigs	ORFs	Contenido G+C%	Cantidad de posibles genes de endolisinas
<i>Pseudomonas</i> fago vB_PssP-7	Φ Pss 7	<i>Podoviridae</i>	37563	1	48	57,58	1
<i>Pseudomonas</i> fago vB_PssS-11	Φ Pss 11	<i>Siphoviridae</i>	168888	2	245	55,42	2
<i>Pseudomonas</i> fago vB_PssP-12	Φ Pss 12	<i>Podoviridae</i>	37560	1	35	57,58	1
<i>Pseudomonas</i> fago vB_PssS-22	Φ Pss 22	<i>Siphoviridae</i>	97488	1	152	58,18	1
<i>Pseudomonas</i> fago vB_PssM-25	Φ Pss 25	<i>Siphoviridae</i>	97494	1	153	58,18	1
<i>Pseudomonas</i> fago vB_PssM-43	Φ Pss 43	<i>Myoviridae</i>	84333	1	170	47,82	1
<i>Pseudomonas</i> fago vB_PssS-56a	Φ Pss 56a	<i>Siphoviridae</i>	117918	3	174	57,69	3
<i>Pseudomonas</i> fago vB_PssS-58	Φ Pss 58	<i>Siphoviridae</i>	201717	11	336	54,74	2
<i>Pseudomonas</i> fago vB_PssS-63	Φ Pss 63	<i>Siphoviridae</i>	129987	7	185	58,41	4

En la comparación de los genomas de fagos de Pss se identificaron regiones nucleotídicas conservadas, se determinó que hay 11 regiones nucleotídicas conservadas compartidas entre algunos fagos (**Figuras 6.A**). Cabe mencionar que estos no se repitieron en todos los genomas analizados.

Por otra parte, los fagos de Xaj, Xaj 4.1, Xaj 6, Xaj 36, Xaj M2-2 y Xaj M4-109a, se identificaron cinco regiones que son conservados en sus genomas, aunque con variación en la organización de las secuencias, según el análisis de Mauve. Los fagos Xaj M307-70a

y Xaj M310-91a poseen los genomas más grandes, con sobre 146 Kb y 75 Kb, respectivamente. Para estos fagos se identificaron la presencia de dos regiones que comparten entre sí, y poseen dos regiones que comparten con el resto de bacteriófagos.



FIGURA 6: ALINEAMIENTO DE GENOMAS DE LOS BACTERIÓFAGOS DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE* Y *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *JUGLANDIS*.

Generado por programa Geneious con algoritmo Mauve, el análisis muestra con líneas las regiones nucleotídicas entre cada genoma que presentan mayores similitudes. **A.** Alineamiento de genomas de los fagos de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **B.** Alineamiento de genomas de los fagos de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*.

5.2. Identificación y selección de secuencias de genes que codifican endolisinas presentes en genomas de bacteriófagos.

Posteriormente a la anotación de los genes presentes en los genomas de estos bacteriófagos, se identificaron un total de 25 genes hipotéticos de endolisinas. De los cuales 12 de estas secuencias pertenecen a la familia de las glucosidasas, 16 a la familia de las amidasas y una de ellas la familia de las endopeptidasas (**Tabla 6**).

TABLA 6: RESUMEN DE LA CANTIDAD DE GENES HIPOTÉTICOS QUE CODIFICAN DIFERENTES FAMILIAS DE ENDOLISINAS PRESENTES EN LOS BACTERIÓFAGOS DE XAJ Y PSS.

	Glucosidasa	Amidasa	Endopeptidasa	Desconocido
Cantidad de genes de endolisinas presente en fago Pss	6	4	0	2
Cantidad de genes de endolisinas presente en fago Xaj	6	0	1	6
Cantidad de genes totales	12	4	1	8

La identificación y análisis de las secuencias de genes hipotéticos que codifican endolisinas, de muestra en la **Tabla 7** estableciendo una descripción detallada en cada una de ellas.

Para el caso de genes de la familia de endolisinas con actividad glucosidasa, solo doce cumplieron los parámetros para su identificación y anotación. Estos provienen de los fagos de Xaj (Fagos: Xaj 4.1, Xaj 6, Xaj 36, Xaj M2-2, Xaj M4-109a y Xaj M307-70a) como de los fagos Pss (Fagos: Pss 11, Pss 12, Pss 22, Pss 25, Pss 43, Pss 56a, Pss 58 y Pss 63). Para los genes de la familia de endolisinas con actividad amidasas, solo cuatro cumplieron los criterios, y estas se encontraron en los genomas de los fagos Pss 7, Pss 12, Pss 56a y Pss 63.

Se seleccionaron un gen que codifica para una endolisina con actividad amidasas, presente en los genomas de los fagos Pss 7, Pss 12, Pss 56a y Pss 63 (**Tabla 7.A**), y una segunda endolisina con actividad glucosidasa, presente en los fagos Xaj 4.1, Xaj 6 y Xaj M2-2 (**Tabla 7.B**), para continuar con el estudio.

Finalmente, se identificaron seis secuencias inicialmente catalogadas como genes codificantes de endolisinas procedentes de los fagos Pss 11, Pss 22 y Pss 25, y de los fagos Xaj M307-70a y Xaj M310-91a, que no cumplieron con los parámetros definidos de identidad. Además, se identificaron otras seis secuencias inicialmente consideradas como genes codificantes de endolisinas provenientes de los bacteriófagos Xaj 36, con dos genes, Xaj M2-2, M4-109a, Xaj 4.1 y Xaj 6, que sí cumplieron con los parámetros de búsqueda establecidos en Blastp V2.15.0 (Altschul et al., 1990), pero no los de Interpro V97.0 (Blum et al., 2021), por lo que no se seleccionaron para continuar con el estudio. Cabe destacar, que el gen que codifica a la endolisina encontrada en el genoma del fago Xaj M307-70a ha mostrado pertenecer a la familia de las endopeptidasas, pero se descartó, ya que no cumplió el parámetro de búsqueda en Blastp V2.15.0 (Altschul et al., 1990).

TABLA 7: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ENDOLISINAS CODIFICADAS EN LOS GENOMAS DE LOS BACTERIOFAGOS DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE* Y *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *JUGLANDIS*.

A. Las filas destacadas en color celeste son las endolisinas codificadas en los bacteriófagos de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* que fueron seleccionadas para su posterior expresión. **B.** Las filas destacadas en color rojo son las endolisinas codificadas de los bacteriófagos de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* que fueron seleccionadas para su posterior expresión.

A.

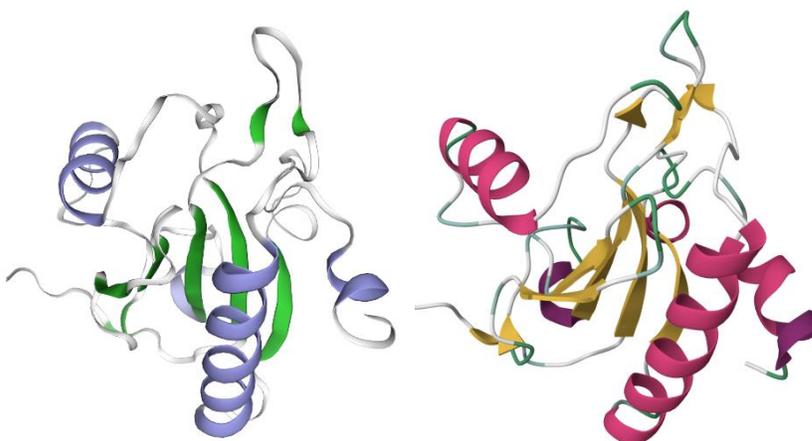
Fago	Función encontrada por Blastp	Identidad aminoacídica	Cobertura	E-value	Función encontrada por Interpro	Familia	Dominios	Número EC	Tamaño endolisina
Xaj 4.1	Glucosidasa	100% (Endolisina tipo T4)	100%	5E ⁻¹²⁴	Glucosidasa	Familia de Glucosidasa 24	Dominio de unión al peptidoglicano y dominio de lisozima	EC 3.2.1.17	185
Xaj 4.1	Transglicosilasa a lítica	96% (Transglicosilasa SLT)	100%	0	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	1636
Xaj 6	Transglicosilasa a lítica	96% (Transglicosilasa SLT)	100%	0	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	1636
Xaj 6	Glucosidasa	100% (Endolisina tipo T4)	100%	5E ⁻¹²⁴	Glucosidasa	Familia de Glucosidasa 24	Dominio de unión al peptidoglicano y dominio de lisozima	EC 3.2.1.17	185
Xaj 36	Transglicosilasa a lítica	96% (Transglicosilasa SLT)	100%	3E ⁻⁸⁸	Glucosidasa	Desconocido	Transglicosilasa SLT dominio 1	EC 3.2.1.17	149
Xaj 36	Glucosidasa	100% (Transglicosilasa SLT)	100%	5E ⁻¹²⁴	Desconocido	Desconocido	Péptido señal	Desconocido	185
Xaj 36	Transglicosilasa a lítica	96% (Transglicosilasa SLT)	100%	0	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	1512
Xaj M2-2	Transglicosilasa a lítica	96% (Transglicosilasa SLT)	100%	0	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	1636
Xaj M2-2	Glucosidasa	100% (Endolisina tipo T4)	100%	5E ⁻¹²⁴	Glucosidasa	Familia de Glucosidasa 24	Dominio de unión al peptidoglicano y dominio de lisozima	EC 3.2.1.17	185
Xaj M4-109a	Transglicosilasa a lítica	96% (Transglicosilasa SLT)	100%	0	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	1636
Xaj M307-70a	Glucosidasas	59% (Quitinasa)	78%	4E ⁻¹⁰⁰	Glucosidasa	Familia de Glucosidasa 19	Dominio de quitinasa	EC 3.2.1.14	233
Xaj M307-70a	Hidrolasa de la pared celular	59% (Hidrolasa SleB)	91%	9E ⁻⁶⁶	Glucosidasa	Desconocido	Dominio 1 de SleB	Desconocido	184
Xaj M310-91a	Endolisina	63% (Endopeptidasa)	99%	9E ⁻⁵³	Endopeptidasa	Familia de peptidasas L-Ala-D-Glu	Dominio de endopeptidasas	EC 3.4.16.	127

B.

Fago	Función encontrada por Blastp	Identidad aminoacídica	Cobertura	E-value	Función encontrada por Interpro	Familia	Dominios	Número EC	Tamaño endolisina
Pss 7	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	100% (Endolisina tipo T7)	100%	8E ⁻¹⁰⁶	Amidasa	Familia Endolisina tipo T7	Dominio de reconocimiento del peptidoglicano y dominio de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	EC 3.5.1.28	147
Pss 11	Glucosidasa	55% (Hidrolasa TtsA)	94%	8E ⁻⁵⁸	Glucosidas a	Familia de Glucosidas a 108	Dominio 108 de la familia de glucósidos hidrolasa similar a TtsA	Desconocido	191
Pss 12	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	100% (Endolisina tipo T7)	100%	8E ⁻¹⁰⁶	Amidasa	Familia Endolisina tipo T7	Dominio de reconocimiento del peptidoglicano y dominio de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	EC 3.5.1.28	147
Pss 22	Transglucosilasa lítica	57% (Transglucosilas a SLT)	89%	1E ⁻⁶⁴	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	200
Pss 25	Transglucosilasa lítica	57% (Transglucosilas a SLT)	89%	1E ⁻⁶⁴	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	200
Pss 43	Lisozima	82% (Tipo de lisozima)	99%	7E ⁻¹⁰⁷	Glucosidas a	Desconocido	Dominio de Glucosidasa	EC 3.2.1.17	185
Pss 56a	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	100% (Endolisina tipo T7)	100%	1E ⁻¹⁰⁹	Amidasa	Familia Endolisina tipo T7	Dominio de reconocimiento del peptidoglicano y dominio de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	EC 3.5.1.28	153
Pss 56a	Lisozima	96% (Tipo de lisozima)	100%	0	Glucosidas a	Desconocido	Dominio de Glucosidasa y Dominio similar a la unión de peptidoglicano	EC 3.2.1.17	281
Pss 58	Lisozima	82% (Tipo de lisozima)	99%	7E ⁻¹⁰⁷	Glucosidas a	Desconocido	Dominio de Glucosidasa	EC 3.2.1.17	185
Pss 58	Lisozima	96% (Tipo de lisozima)	100%	0	Glucosidas a	Desconocido	Dominio de Glucosidasa y Dominio similar a la unión de peptidoglicano	EC 3.2.1.17	281
Pss 63	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	100% (Endolisina tipo T7)	100%	8E ⁻¹⁰⁶	Amidasa	Familia Endolisina tipo T7	Dominio de reconocimiento del peptidoglicano y dominio de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	EC 3.5.1.28	147
Pss 63	Glucosidasa	100% (Endolisina tipo T4)	100%	5E ⁻¹²⁴	Glucosidas a	Familia de Glucosidas a 24	Dominio de unión al peptidoglicano y dominio de lisozima	EC 3.2.1.17	185

Posteriormente, se realizó un modelo estructural tridimensional de las endolisinas seleccionadas, de modo de visualizar las estructuras hipotéticas de estas. Es así que la endolisina perteneciente a la familia de la amidasa, se observaron dos estructuras secundarias que comprenden a siete hojas beta y cinco hélices alfa, identificando tan solo un único dominio catalítico (**Figura 7.A**). De manera similar, las endolisinas de la familia de las glucosidasas presentaron dos estructuras secundarias, que fueron siete hélices alfas y cuatro hojas beta, y con tan solo un único dominio catalítico (**Figura 7.B**).

A.



B.

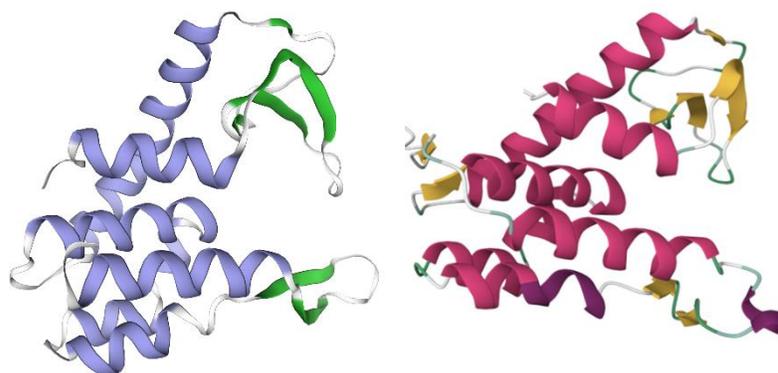


FIGURA 7: MODELO ESTRUCTURAL TRIDIMENSIONAL DE LAS ENDOLISINAS SELECCIONADAS.

Para la generación de las estructuras proteicas fue necesario la utilización del programa AlphaFold (figuras de la derecha con colores rojos y amarillos) y Swiss-Model (figuras de la izquierda con colores violeta y verdes). **A.** Endolisina con potencial actividad amidasa proveniente del bacteriófago Pss 63. **B.** Endolisina con potencial actividad glucosidasa proveniente del bacteriófago de Xaj 4.1.

5.3. Producción de extractos de proteínas enriquecidos con las endolisinas seleccionadas.

Con el fin de obtener un gran número de copias de los genes de las endolisinas seleccionadas, estos se amplificaron a través de partidores diseñados específicamente para estas secuencias, que están presentes en los genomas de los fagos en estudio (**Anexo 1**). Los tamaños de los amplicones fueron de 581 pb y 454 pb, para el gen de la glucosidasa y amidasa, respectivamente (**Figura 8**).

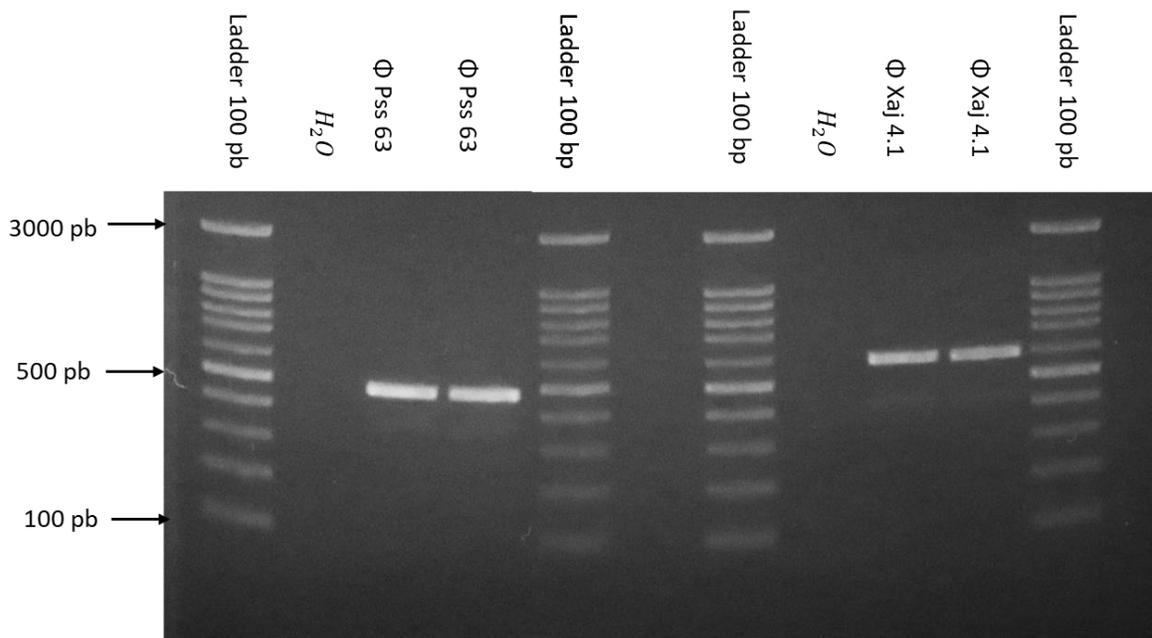


FIGURA 8: AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS ENDOLISINAS SELECCIONADAS POR PCR.

Para el caso de la endolisina amidasa del fago Pss 63, se determinó un tamaño de amplicón de 454 pb. En el caso de la endolisina glucosidasas del fago Xaj 4.1, se determinó un tamaño de amplicón de 581 pb. Los carriles 1, 5, 6 y 10: *Ladder* 100 bp; carriles 2 y 7: control negativo de amplificación.

A cada uno de los genes que codifican las endolisinas seleccionadas se le añadió un sitio de restricción (*Nco*I) al momento de ser clonadas en el vector pGEM, y posteriormente se transformaron bacterias *Escherichia coli* One Shot Top10, de modo de obtener suficientes copias del gen de la endolisina para las siguientes etapas. Se almacenaron las colonias C15-pGEM-Xaj, que posee el gen de la glucosidasa y C14-pGEM-Pss, que posee el gen de la amidasa (**Figuras 9.A y 9.B**).

Para lograr la expresión de los genes de ambas endolisinas se hizo un subclonamiento empleando el vector de expresión pET14b. Se transformó las *Escherichia coli* T7 Express lysY/lq^q e indujo con IPTG para iniciar la transcripción y, así, producir un enriquecimiento de las proteínas de las endolisinas. La correcta inserción del gen de las endolisinas en este vector también fue verificada y se muestra en la **Figura 9.C**.

Se obtuvieron cinco colonias transformadas que expresan el gen que codifica la endolisina perteneciente a la familia de la amidasa (**Figura 9.C**), al realizar la inducción se obtuvieron los extractos de proteínas enriquecidos con la endolisina y se nombraron como: P1, P2, P3, P4 y P5. Para el caso de glucosidasa se obtuvo cuatro colonias (**Figura 9.C**),

al inducir se obtuvieron los extractos de proteínas enriquecidos con la endolisina, que se nombraron como: X1, X2, X3 y X4.

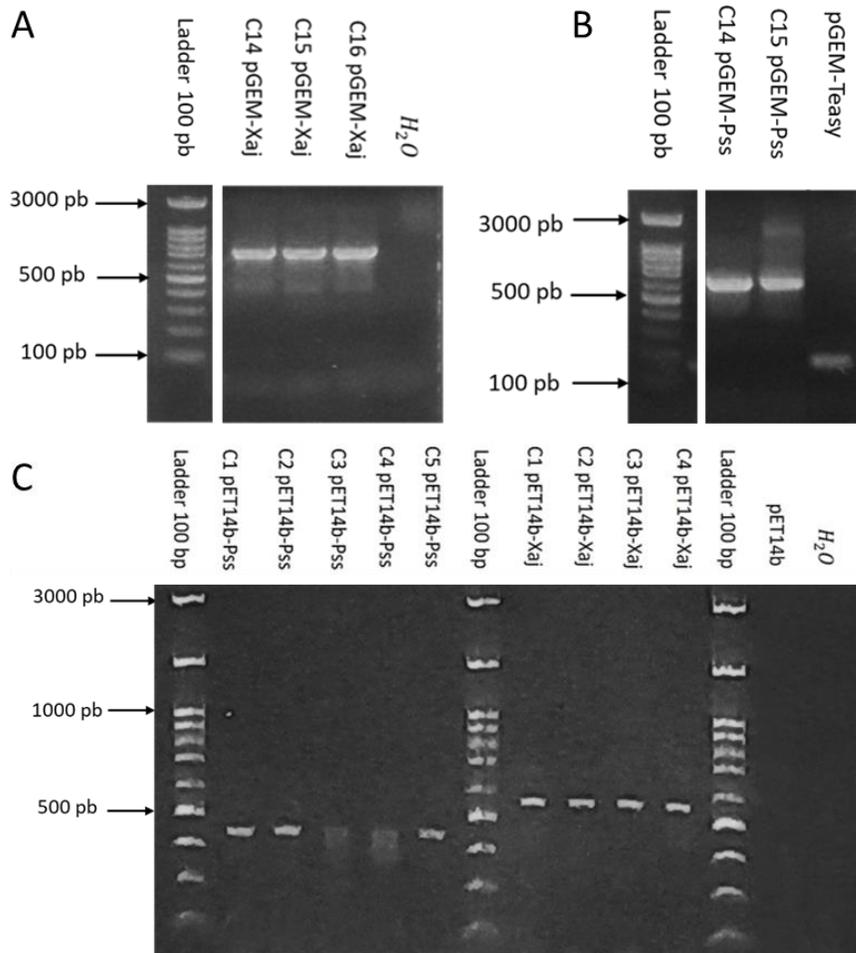


FIGURA 9: VERIFICACIÓN DE LAS INSERCIONES DEL GEN DE LAS ENDOLISINAS EN LOS PLÁSMIDOS.

A. PCR para confirmar inserción del gen de la endolisina en pGEM obteniendo un amplificado desde Xaj de 697 pb. Carril 1: *Ladder* 100 bp; Carriles 2, 3 y 4: Identificación de las colonias con el inserto; Carril 5: Control negativo de amplificación. **B.** PCR para confirmar inserción del gen de la endolisina en pGEM obteniendo un amplicón de 583 pb Carril 1: *Ladder* 100 bp; Carriles 2 y 3: Identificación de las colonias con el inserto; Carril 4: Control negativo de la ligación. **C.** PCR anidado para confirmar inserto del gen de la endolisina en pET14b, teniendo en que la segunda amplificación los tamaños de los genes de las endolisinas deben ser en Xaj de 581 pb y en Pss de 454 pb. Carriles 1, 7 y 12: *Ladder* 100 bp; Carriles 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 11: Identificación de las colonias con el inserto; Carril 13: Control negativo de la ligación; Carril 14: Control negativo de amplificación.

5.4. Evaluación de la actividad bactericida de las endolisinas contra las cepas *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

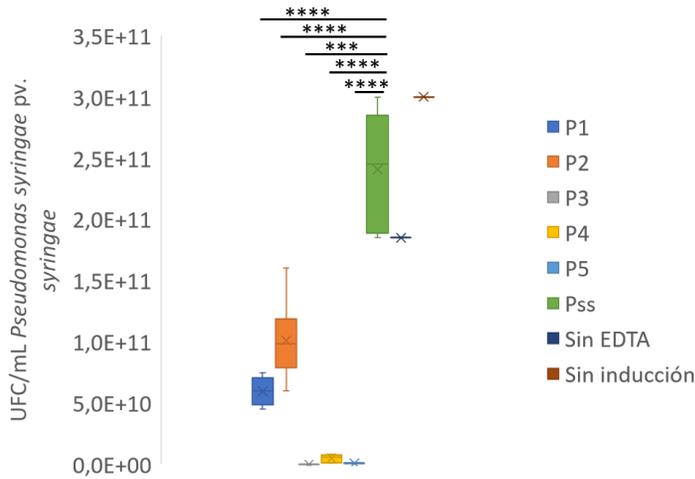
Las endolisinas fueron evaluadas contra las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Para ello se utilizaron extractos de proteínas totales enriquecidas en cada una de las endolisinas. En esta etapa se usó una solución de EDTA como coadyuvante, de modo de facilitar la interacción de estas proteínas con el peptidoglicano bacteriano.

Los resultados de la evaluación de la actividad bactericida de los extractos con la endolisina amidasa contra la bacteria Pss (**Figura 10.A**), indicaron que para P1, P2, P3, P4 y P5 hubo disminuciones de 75,16%, 57,99%, 99,96%, 97,85% y 99,55%, respectivamente comparado con el grupo no tratado. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Los grupos controles “sin inducción” y “sin EDTA”, no mostraron diferencias con el grupo no tratado.

Los resultados de la evaluación de la actividad bactericida de los extractos con la endolisina amidasa contra la bacteria Xaj (**Figura 10.B**), indicaron que para P1, P2, P3, P4 y P5 hubo disminuciones del 95,26%, 91,47%, 51,78%, 28,80% y 83,20%, respectivamente comparado con el grupo no tratado. A excepción del extracto P4, todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Los grupos controles “sin inducción” y “sin EDTA”, no mostraron diferencias con el grupo no tratado.

Por lo que, los extractos que expresan la endolisina amidasa mostraron una reducción en la viabilidad de Pss y Xaj.

A.



B.

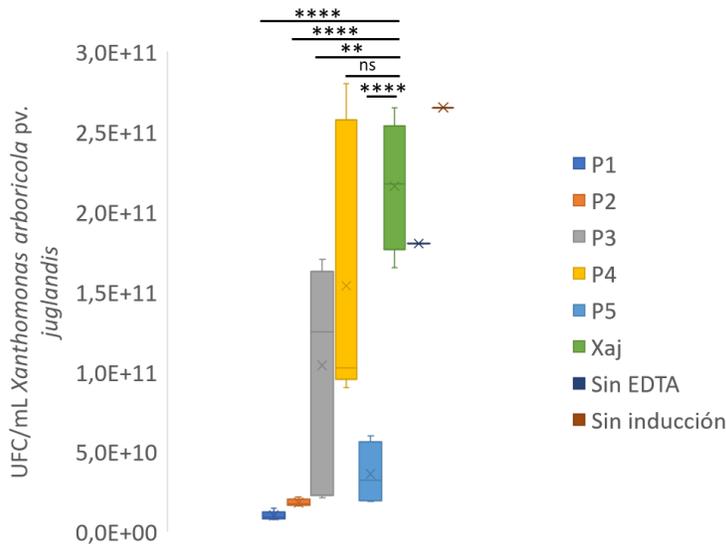


FIGURA 10: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS EXTRACTOS ENRIQUECIDOS CON ENDOLISINAS DERIVADAS DEL BACTERIÓFAGO DE PSS.

Se utiliza la prueba estadística *t* de Student unpaired de dos colas, considerando que los datos han sido sometidos a un análisis de normalidad. ns → sin diferencias significativas, **** → $P < 0,0001$, *** → $P < 0,001$, ** → $P < 0,01$; $n = 3$. Adicionalmente, se incluyen dos controles negativos: el tratamiento con el extracto de endolisinas sin pretratamiento con EDTA y el extracto de proteínas totales sin inducción de endolisinas, $n = 1$. **A.** Las endolisinas presentes en el bacteriófago Pss fueron utilizadas contra la bacteria Pss para determinar la variación de la viabilidad de la bacteria fitopatógena a diferencia del control sin tratamiento. **B.** Las endolisinas presentes en el bacteriófago Pss fueron utilizadas contra la bacteria Xaj para determinar la variación de la viabilidad de la bacteria fitopatógena a diferencia del control sin tratamiento.

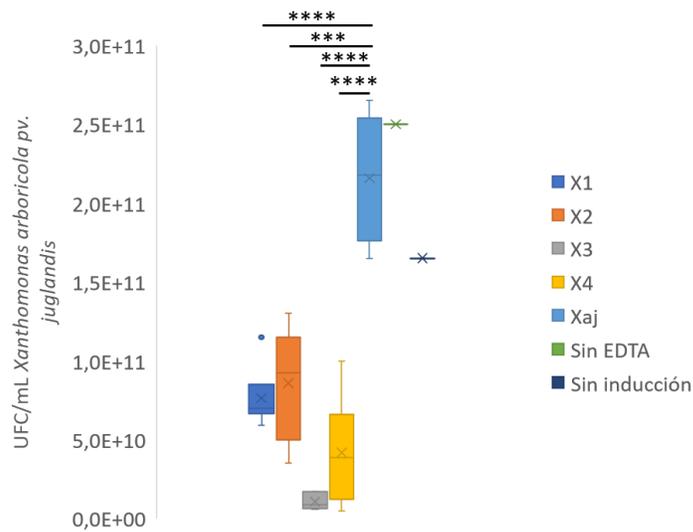
Extractos de proteínas totales enriquecido con endolisinas P1 (Colonia 1 transformada con pET14b-Pss), P2 (Colonia 2 transformada con pET14b-Pss), P3 (Colonia 3 transformada con pET14b-Pss), P4 (Colonia 4 transformada con pET14b-Pss) y P5 (Colonia 5 transformada con pET14b-Pss).

Los resultados de la evaluación de la actividad bactericida de los extractos con la endolisina glucosidasa contra la bacteria Pss (**Figura 11.A**), indicaron que para X1, X2, X3 y X4 hubo disminuciones del 99,94%, 99,64%, 99,94% y 99,96%, respectivamente comparado con el grupo no tratado. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Los grupos controles “sin inducción” y “sin EDTA”, no mostraron diferencias con el grupo no tratado.

Los resultados de la evaluación de la actividad bactericida de los extractos con la endolisina glucosidasa contra la bacteria Xaj (**Figura 11.B**), indicaron que para X1, X2, X3 y X4 hubo disminuciones del 64,63%, 60,23%, 95,06% y 80,58%, respectivamente comparado con el grupo no tratado. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Los grupos controles “sin inducción” y “sin EDTA”, no mostraron diferencias con el grupo no tratado.

Por lo que, los extractos que expresan la endolisina glucosidasa mostraron una reducción en la viabilidad de Pss y Xaj.

A.



B.

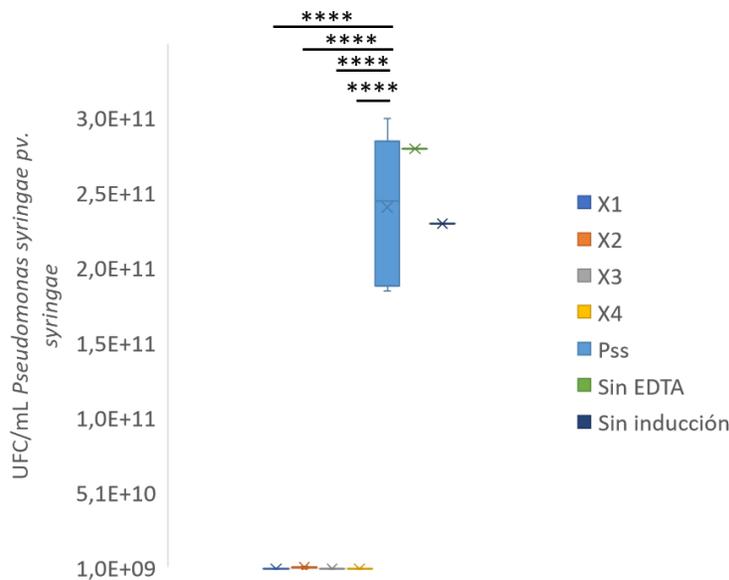


FIGURA 11: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS EXTRACTOS ENRIQUECIDOS CON ENDOLISINAS DERIVADAS DEL BACTERIOFAGO DE XAJ.

Se utiliza la prueba estadística *t* de Student unpaired de dos colas, considerando que los datos han sido sometidos a un análisis de normalidad. **** $\rightarrow P < 0,0001$, *** $\rightarrow P < 0,001$; $n = 3$. Adicionalmente, se incluyen dos controles negativos: el tratamiento con el extracto de endolisinas sin pretratamiento con EDTA y el extracto de proteínas totales sin inducción de endolisinas, $n = 1$.

A. Las endolisinas presentes en el bacteriófago Xaj fueron utilizadas contra la bacteria Xaj para determinar la variación de la viabilidad de la bacteria fitopatógena a diferencia del control sin tratamiento. **B.** Las endolisinas presentes en el bacteriófago Xaj fueron utilizadas contra la bacteria Pss para determinar la variación de la viabilidad de la bacteria fitopatógena a diferencia del control sin tratamiento.

Extractos de proteínas totales enriquecido con endolisinas X1 (Colonia 1 transformada con pET14b-Xaj), X2 (Colonia 2 transformada con pET14b-Xaj), X3 (Colonia 3 transformada con pET14b-Xaj) y X4 (Colonia 4 transformada con pET14b-Xaj).

6. Discusión.

Bacterias como *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, son responsables de enfermedades como la peste negra en el nogal y el cáncer bacteriano en cerezos, respectivamente, las cuales generan disminuciones en el rendimiento de la producción (Pinilla y Alvarez, 2003; Torres et al., 2006). Actualmente las estrategias tradicionales para tratar estos fitopatógenos son la utilización de compuestos a base de cobre y últimamente antibióticos. Su uso continuo y excesivo ha seleccionado poblaciones bacterianas resistentes, lo que se traduce en la pérdida de eficacia en el control de estos fitopatógenos (Lamichhane et al, 2018; Sundin y Bender, 1993), lo que subraya la necesidad imperiosa en desarrollar productos antibacterianos alternativos, y que sean amistosos con el medio ambiente.

Diversas investigaciones han demostrado la eficacia de péptidos y proteínas con actividad bactericida, para combatir infecciones bacterianas en distintas áreas (Browne et al., 2020; Joerger, 2003). El origen de estas moléculas puede ser de diferentes microorganismos (Yang et al., 2023; Mills et al., 2017; Browne et al, 2020), tales como bacteriocinas, péptidos y endolisinas.

Las endolisinas son enzimas hidrolasas, producidas por bacteriófagos que desempeñan un papel crucial en la lisis de las células bacterianas al degradar el peptidoglicanos, lo que facilita la liberación de la progenie del fago (Drulis-Kawa et al., 2012), Estas enzimas son particularmente prometedoras como agentes terapéuticos alternativos en la lucha contra las bacterias resistentes a los antibióticos y cobre debido a su alta especificidad, acción rápida y bajo riesgo de desarrollo de resistencia (Fischetti, 2008; Drulis-Kawa et al., 2012).

Los estudios en endolisinas se han centrado fuertemente en medicina humana y veterinaria; demostrando que las endolisinas estudiadas han presentado una gran efectividad frente bacterias patógenas humanas multirresistentes como *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (Fernandes et al., 2012; Lu et al., 2021), *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, así como ser eficientes agentes terapéuticos para el tratamiento de infecciones bacterianas mixtas en enfermedades como mastitis (Donovan et al., 2006; Liu et al., 2022).

- **Genomas de bacteriófagos de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.**

La comparación genómica realizada mediante el algoritmo Mauve ha demostrado ser más efectiva en el alineamiento de genomas con un tamaño inferior a 10 Kb (Darling et al., 2004). Por lo tanto, al utilizar los genomas de los bacteriófagos de Xaj y Pss, se reduce la calidad de la alineación. Esto podría justificar el bajo nivel de alineamiento observado al comparar los genomas de los bacteriófagos de Pss, donde solo se encontraron dos similitudes entre sus genomas. Por otro lado, cabe destacar que, independientemente del tamaño del genoma, no es posible establecer una relación con la cantidad de genes de endolisinas presentes. En el caso de la comparación genómica de los bacteriófagos de Xaj, se observó que, a pesar de la similitud entre estos genomas, no se observó una relación con la cantidad de genes identificados como endolisinas.

- **Endolisina codificadas en los genomas de los bacteriófagos de Xaj y Pss.**

La búsqueda de endolisinas en los bacteriófagos de Xaj y Pss se realizó utilizando diferentes programas bioinformáticos, complementando la información para determinar efectivamente la proteína requerida. De un total de 25 genes, hubo 8 que no pudieron ser asignados con una función putativa, ya que se priorizó la aprobación de todos los parámetros planteados, independientemente de si uno de ellos mostraba una función relevante. Por otra parte, también se puede plantear que, al analizar estas secuencias de proteínas con otros programas bioinformáticos, sería posible encontrarles propiedades únicas o determinar que pertenecen a familias que aún no han sido caracterizadas (Hatfull y Hendrix, 2011).

En relación con las familias de endolisinas identificadas, las glucosidasas, comúnmente conocidas como lisozimas, fueron las más representadas, con 12 genes (**Tabla 6**). Estas endolisinas han mostrado su estabilidad, lo que las hace adecuadas para diversas aplicaciones en la industria farmacéutica y de los alimentos (Wu et al., 2019). Por otro lado, se identificaron endolisinas con actividad de amidasa, con un total de cuatro genes, mientras que solo se encontró un gen de endolisinas con actividad de endopeptidasa (**Tabla 6**). Este último fue clasificado en esta familia a pesar de no cumplir con los parámetros utilizados en Blastp V2.15.0 (Altschul et al., 1990), gracias a que, al utilizar InterPro V97.0 (Blum et al., 2021), mostró una adecuada caracterización de sus dominios.

De esta manera, aunque no se utilizó en el análisis principal, presenta un potencial para una futura utilización contra las bacterias fitopatógenas.

- **Evaluación de la actividad bactericida del extracto enriquecido de glucosidasa y amidasa.**

Durante la evaluación antimicrobiana de los extractos proteicos enriquecidos con las endolisinas, se demostró su eficacia como agentes antimicrobianos frente a las bacterias *Xanthomonas arboricola pv. juglandis* y *Pseudomonas syringae pv. syringae*. Los extractos mostraron una eficiencia del 28,8% al 95,26% frente a Xaj, similar a la observada en la investigación de Wu et al. (2021), donde las endolisinas fueron utilizadas contra otra bacteria fitopatógena, *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, con una eficiencia del 19% al 74%. En el caso de los extractos contra Pss, la eficiencia fue del 57,99% al 99,9%, superando la eficiencia obtenida por Abdelrahman et al. (2023), cuya endolisina mostró una eficacia del 52,3% contra *Pseudomonas aeruginosa*. Esta eficiencia también se puede comparar con la endolisina de Ni et al. (2021), que presentó una eficiencia del 68,1% contra la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*. Cabe destacar que la actividad bactericida obtenida por estos investigadores se logró con endolisinas purificadas, mientras que las endolisinas de esta investigación mostraron una alta eficiencia a pesar de ser parte de un extracto enriquecido.

Por otro lado, la disparidad observada en la actividad bactericida entre cada extracto podría explicarse por concentraciones de proteínas totales diferentes en cada uno de los tratamientos.

Aun así, es necesario realizar estudios posteriores para lograr la optimización de esta actividad bactericida, como por ejemplo estudios de estabilidad de factores cruciales como pH, temperatura y sustratos, etc. (Grahame et al., 2015). Esta caracterización más profunda podría proporcionar una visión más completa y precisa de las capacidades de estas endolisinas.

Por otro lado, resulta fundamental investigar y estandarizar metodologías destinadas a lograr una extracción óptima de las proteínas desde la bacteria. Aunque, tal como se ha mostrado, el extracto enriquecido presentó una actividad similar a la obtenida por diversos investigadores que utilizaron endolisinas purificadas, lo que sugiere que la purificación puede no ser necesaria. En su lugar, podría ser más efectivo generar extractos producidos por otros organismos, como plantas, ya que se ha demostrado que son

plataformas eficientes para la producción a gran escala y pueden sintetizar proteínas del tamaño de las endolisinas (Burnett y Burnett, 2019; Coates et al., 2022; Kulshreshtha et al., 2022).

Finalmente, la eficacia de esta proteína para llevar a cabo su función depende de la aplicación previa de EDTA, una molécula con la capacidad de desestabilizar la membrana externa. Sin embargo, si estas proteínas se quieren utilizar a futuro como un producto biotecnológico en cultivos de cerezas y nueces, es necesaria la eliminación de esta molécula, ya que esta ha mostrado efectos fitotóxicos (Huda et al., 2021; Win y Yasuhiro, 2018) como también ha generado una disminución en el crecimiento y desarrollo de estos organismos vegetales (Bloem et al., 2016; Win y Yasuhiro, 2018). Para ello, existen estrategias para eliminar el uso de EDTA, como es el uso de secuencias catiónicas en el N- o C- terminal de la endolisinas, la cual le confiere a esta enzima la capacidad de permeabilidad a la membrana externa, facilitando su acceso al peptidoglicano (Carratalá et al., 2023).

7. Conclusiones.

- Se identificaron un total de 25 genes que codifican endolisinas, encontradas tanto en los genomas de los bacteriófagos de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.
- Las endolisinas glucosidasa y amidasa provenientes del fago Xaj 4.1 y fago Pss 63, mostraron actividades bactericidas contra las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.
- La estrategia de expresión que involucra la transformación de *E. coli* mediante el uso de los vectores de clonación, pGEM, y expresión, pET14b, demostró ser eficaz para la producción de endolisinas.

8. Bibliografía

- Abdelrahman, F., Easwaran, M., Daramola, O. I., Ragab, S., Lynch, S., Oduselu, T., Khan, F., Ayobami, A., Adnan, F., Torrents, E., Sanmukh, S., & El-Shibiny, A. (2021). Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics*, *10*(2), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10020124>
- Abdelrahman, F., Gangakhedkar, R., Nair, G., El-Didamony, G., Askora, A., Jain, V., & El-Shibiny, A. (2023). *Pseudomonas* Phage ZCPS1 Endolysin as a Potential Therapeutic Agent. *Viruses*, *15*(2), 520. <https://doi.org/10.3390/v15020520>
- Ackermann, H. (2009). Phage classification and characterization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *501*, 127–140. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13
- Adriaenssens, E., & Rodney Brister, J. (2017). How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide. *Viruses*, *9*(4), 70. <https://doi.org/10.3390/V9040070>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, *215*(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Aprile, F., Heredia-Ponce, Z., Cazorla, F. M., de Vicente, A., & Gutiérrez-Barranquero, J. A. (2021). A Large Tn7-like Transposon Confers Hyperresistance to Copper in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *87*(5), 1–19. https://doi.org/10.1128/AEM.02528-20/SUPPL_FILE/AEM.02528-20-S0001.PDF
- Beltrán, M. F., Osorio, V., Lemus S., G., Millas O., P., France I., A., Correa, F., & Sagredo D., B. (2021). Bacterial community associated with canker disease from sweet cherry orchards of central valley of Chile presents high resistance to copper. *CHILEAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH*, *81*(3), 378–389. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392021000300378>
- Burnett, M. y Burnett, A. (2019). Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, *2*(2), 121-132. [10.1002/ppp3.10073](https://doi.org/10.1002/ppp3.10073)
- Bloem, E., Haneklaus, S., Hänsch, R., & Schnug, E. (2016). Evaluation of soil EDTA applications on crop performance and uptake of macro- and micronutrients by agricultural crops. *Journal für Kulturpflanzen*, *68*(3), 63–71. <https://doi.org/10.5073/JFK.2016.03.02>
- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasaamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., ... Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic acids research*, *49*(D1), D344–D354. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA977>
- Briers, Y., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C. W., Hertveldt, K., & Lavigne, R. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages ϕ KZ and EL. *Molecular Microbiology*, *65*(5), 1334–1344. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2007.05870.X>
- Browne, K., Chakraborty, S., Chen, R., Willcox, M. D. P., Black, D. S., Walsh, W. R., & Kumar, N. (2020). A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides.

- Buriani, G., Donati, I., Cellini, A., Fiorentini, L., Vanneste, J.L. and Spinelli, F. (2018). Molecular signalling in *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Acta Hort.* 1218, 299-306 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1218.41>
- Carratalá, J. V., Arís, A., Garcia-Fruitós, E., & Ferrer-Miralles, N. (2023). Design strategies for positively charged endolysins: Insights into Artilysin development. *Biotechnology advances*, 69, 108250. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2023.108250>
- Cesbron, S., Briand, M., Essakhi, S., Gironde, S., Boureau, T., Manceau, C., Fischer-Le Saux, M., & Jacques, M. A. (2015). Comparative Genomics of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Xanthomonas arboricola* Unveil Molecular and Evolutionary Events Linked to Pathoadaptation. *Frontiers in plant science*, 6, 1126. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01126>
- Correa, F., Beltrán, M. F., Millas, P., Moreno, Z., Hinrichsen, P., Meza, P., & Sagredo, B. (2022). Genome Sequence Resources of *Pseudomonas syringae* Strains Isolated from Sweet Cherry Orchards in Chile. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35(10), 933–937. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-22-0092-A/ASSET/IMAGES/LARGE/MPMI-04-22-0092-AF1.JPEG>
- Coates, R., Young, M., & Scofield, S. (2022). Optimising expression and extraction of recombinant proteins in plants. *Frontiers in plant science*, 13, 1074531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1074531>
- Cuesta-Morrondo, S., Redondo, C., Palacio-Bielsa, A., Garita-Cambronero, J., & Cubero, J. (2022). Complete Genome Sequence Resources of Six Strains of the Most Virulent Pathovars of *Xanthomonas arboricola* Using Long- and Short-Read Sequencing Approaches. *Phytopathology*, 112(8), 1808–1813. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-21-0436-A>
- Darling, A., Mau, B., Blattner, F., & Perna, N. (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome research*, 14(7), 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- Deng, H., Li, M., Zhang, Q., Gao, C., Song, Z., Chen, C., Wang, Z., & Feng, X. (2023). The Broad-Spectrum Endolysin LySP2 Improves Chick Survival after *Salmonella Pullorum* Infection. *Viruses*, 15(836), 836. <https://doi.org/10.3390/V15040836>
- Donovan, D. M., Lardeo, M., & Foster-Frey, J. (2006). Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS microbiology letters*, 265(1), 133–139. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2006.00483.X>
- Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A.-S., & Lavigne, R. (2012). Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. *Current Protein & Peptide Science*, 13(8), 699–722. <https://doi.org/10.2174/138920312804871193>
- Fan, J., Zeng, Z., Mai, K., Yang, Y., Feng, J., Bai, Y., Sun, B., Xie, Q., Tong, Y., & Ma, J. (2016). Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1,

recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1. *Veterinary microbiology*, 191, 65–71. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2016.06.001>

Fernandes, S., Proença, D., Cantante, C., Silva, F. A., Leandro, C., Lourenço, S., Milheiro, C., De Lencastre, H., Cavaco-Silva, P., Pimentel, M., & São-José, C. (2012). Novel chimerical endolysins with broad antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 18(3), 333–343. <https://doi.org/10.1089/MDR.2012.0025>

Fischetti, V. (2008). Bacteriophage Lysins as Effective Antibacterials. *Current opinion in microbiology*, 11(5), 393. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2008.09.012>

Fu, B., Zhu, J., Lee, C., & Wang, L. (2021). Multilocus Sequence Analysis and Copper Ion Resistance Detection of 60 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* Isolates from China. *Plant disease*, 105(11), 3715–3719. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-21-0241-RE>

Fujiki, J., Nakamura, T., Furusawa, T., Ohno, H., Takahashi, H., Kitana, J., Usui, M., Higuchi, H., Tanji, Y., Tamura, Y., & Iwano, H. (2018). Characterization of the Lytic Capability of a LysK-Like Endolysin, Lys-phiSA012, Derived from a Polyvalent *Staphylococcus aureus* Bacteriophage. *Pharmaceuticals* 2018, Vol. 11, Page 25, 11(1), 25. <https://doi.org/10.3390/PH11010025>

Gamaliel, L. (2020). Cáncer Bacterial del Cerezo: Epidemiología de la enfermedad y estrategias de control. En *Boletín INIA* (Vol. 420). <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/6886>

Gaviria, G., González de, M. S., & Castaño, J. (2012). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para *E.coli* DH5á a partir de aguas residuales. *Revista MVZ Córdoba, ISSN-e 1909-0544, Vol. 17, Nº. 1 (enero-abril), 2012, págs. 2852-2860, 17(1), 2852–2860.* <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3894983&info=resumen&idioma=ENG>

Golkar, Z., Bagasra, O., & Gene Pace, D. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of infection in developing countries*, 8(2), 129–136. <https://doi.org/10.3855/JIDC.3573>

Gondil, V. y Chhibber, S. (2021). Bacteriophage and Endolysin Encapsulation Systems: A Promising Strategy to Improve Therapeutic Outcomes. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 675440. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.675440/BIBTEX>

Grahame, D., Bryksa, B., & Yada, R. (2015). Factors affecting enzyme activity. En *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality* (pp. 11–55). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-285-3.00002-8>

Han, H., Koh, Y., Hur, J., & Jung, J. (2004). Occurrence of the strA-strB streptomycin resistance genes in *Pseudomonas* species isolated from kiwifruit plants - PubMed. *Journal of microbiology*, 42(4), 365–368. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15650697/>

Harada, L., Silva, E., Campos, W., Del Fiol, F., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V., & Balcão, V. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological research*, 212–213, 38–58. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.04.007>

Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their Genomes. *Current opinion in virology*, 1(4), 298–303. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2011.06.009>

- Higuera, G., González-Escalona, N., Véliz, C., Vera, F., & Romero, J. (2015). Draft Genome Sequences of Four *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* Strains Associated with Walnut Blight in Chile. *Genome Announcements*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01160-15>
- Hoopes, J. T., Stark, C. J., Kim, H. A., Sussman, D. J., Donovan, D. M., & Nelson, D. C. (2009). Use of a Bacteriophage Lysin, PlyC, as an Enzyme Disinfectant against *Streptococcus equi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1388–1394. <https://doi.org/10.1128/AEM.02195-08>
- Huda, A. K. M. N., Hossain, M., Mukta, R. H., Khatun, M. R., & Haque, M. A. (2021). EDTA-enhanced Cr detoxification and its potential toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Stress*, 2, 100014. <https://doi.org/10.1016/J.STRESS.2021.100014>
- Isaev, A. B., Musharova, O. S., & Severinov, K. V. (2021). Microbial Arsenal of Antiviral Defenses. Part II. *Biochemistry. Biokhimiia*, 86(4), 449–470. <https://doi.org/10.1134/S0006297921040064>
- Jiang, Y., Xu, D., Wang, L., Qu, M., Li, F., Tan, Z., & Yao, L. (2021). Characterization of a broad-spectrum endolysin LysSP1 encoded by a Salmonella bacteriophage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(13), 5461–5470. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11366-Z/FIGURES/9>
- Joerger, R. D. (2003). Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry science*, 82(4), 640–647. <https://doi.org/10.1093/PS/82.4.640>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., W. Senior, A., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Junjappa, R. P., Desai, S. N., Roy, P., Narasimhaswamy, N., Raj, J. R. M., Durgaiyah, M., Vipra, A., Bhat, U. R., Satyanarayana, S. K., Shankara, N., Basingi, S. M., Bhat, J. J., Hariharan, S., Sriram, B., & Padmanabhan, S. (2013). Efficacy of anti-staphylococcal protein P128 for the treatment of canine pyoderma: potential applications. *Veterinary research communications*, 37(3), 217–228. <https://doi.org/10.1007/S11259-013-9565-Y>
- Kałużna, M., Fischer-Le Saux, M., Pothier, J. F., Jacques, M. A., Obradović, A., Tavares, F., & Stefani, E. (2021). *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and pv. *corylina*: Brothers or distant relatives? Genetic clues, epidemiology, and insights for disease management. *Molecular plant pathology*, 22(12), 1481–1499. <https://doi.org/10.1111/mpp.13073>
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. (2002). The *Arabidopsis thaliana*-*pseudomonas syringae* interaction. *The Arabidopsis book*, 1, e0039. <https://doi.org/10.1199/tab.0039>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the

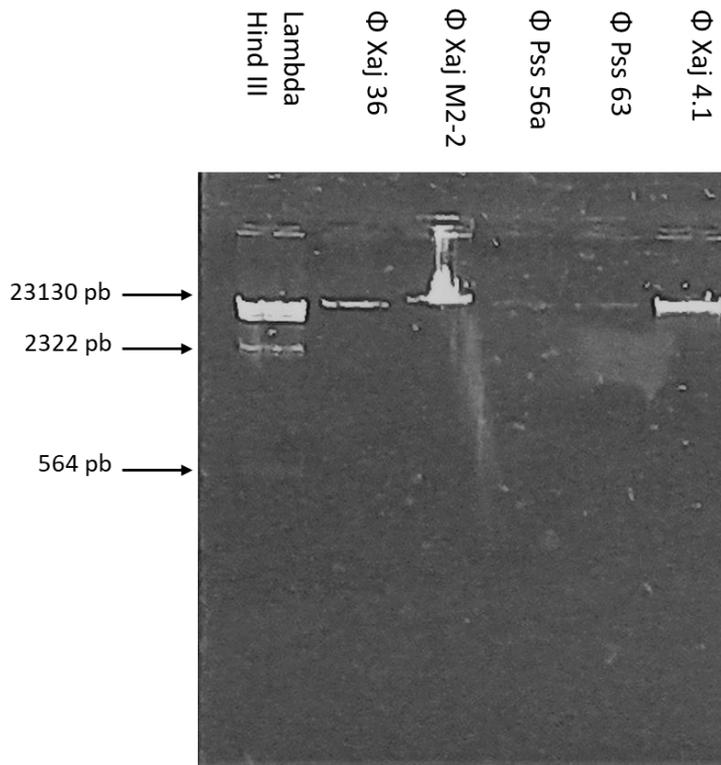
- organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS199>
- Kim, H. S., Cheon, W., Lee, Y., Kwon, H. T., Seo, S. T., Balaraju, K., & Jeon, Y. (2021). Identification and Characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* Causing Bacterial Blight of Walnuts in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 37(2), 137–151. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.12.2020.0217>
- Kim, S., Lee, D. W., Jin, J. S., & Kim, J. (2020). Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 32–39. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2020.01.005>
- Kulshreshtha, A., Sharma, S., Padilla, C., & Mandadi, K. (2022). Plant-based expression platforms to produce high-value metabolites and proteins. *Frontiers in plant science*, 13, 1043478. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1043478>
- Ladomersky, E., & Petris, M. J. (2015). Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics*, 7(6), 957–964. <https://doi.org/10.1039/C4MT00327F>
- Lamichhane, J. (2014). *Xanthomonas arboricola* Diseases of Stone Fruit, Almond, and Walnut Trees: Progress Toward Understanding and Management. *Plant Disease*, 98(12), 1600–1610. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-14-0831-FE>
- Lamichhane, J., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., & Aubertot, J. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(3), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S13593-018-0503-9>
- Lemus S., Osorio N., & France I., R. (2019). Cáncer bacteriano en cerezos: opciones de control de cancos. En *Boletín INIA* (Vol. 67). <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/4953>
- Lin, D., Koskella, B., & Lin, H. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162–173. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>
- Liu, G., Zhang, S., Gao, T., Mao, Z., Shen, Y., Pan, Z., Guo, C., Yu, Y., & Yao, H. (2022). Identification of a novel broad-spectrum endolysin, Ply0643, with high antibacterial activity in mouse models of streptococcal bacteraemia and mastitis. *Research in veterinary science*, 143, 41–49. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2021.12.014>
- Lopatina, A., Tal, N., & Sorek, R. (2020). Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy. *Annual review of virology*, 7(1), 371–384. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-011620-040628>
- López Hidalgo, S. A. (2012). *Análisis de las exportaciones chilenas de fruta fresca a los principales mercados mundiales en la última década*. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE.
- Lu, Y., Wang, Y., Wang, J., Zhao, Y., Zhong, Q., Li, G., Fu, Z., & Lu, S. (2021). Phage Endolysin LysP108 Showed Promising Antibacterial Potential Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.668430/PDF>
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2014.02.001>

- Martinez, J. L., & Baquero, F. (2000). Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(7), 1771–1777.
- Mills, S., Ross, R. P., & Hill, C. (2017). Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. *FEMS microbiology reviews*, *41*, S129–S153. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX022>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, *4*(2). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0016-2015>
- Ni, P., Wang, L., Deng, B., Jiu, S., Ma, C., Zhang, C., Almeida, A., Wang, D., Xu, W., & Wang, S. (2021). Characterization of a Lytic Bacteriophage against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and Its Endolysin. *Viruses*, *13*(4), 631. <https://doi.org/10.3390/v13040631>
- Oliveira, H., Melo, L. D. R., Santos, S. B., Nóbrega, F. L., Ferreira, E. C., Cerca, N., Azeredo, J., & Kluskens, L. D. (2013). Molecular Aspects and Comparative Genomics of Bacteriophage Endolysins. *Journal of Virology*, *87*(8), 4558–4570. https://doi.org/10.1128/JVI.03277-12/SUPPL_FILE/ZJV999097509SO1.PDF
- Olson, R., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J., Dempsey, D., Dickerman, A., Dietrich, E., Kenyon, R., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E., Lu, J., Machi, D., Macken C., Mao C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G., Overbeek, J., Parrello, B., Parrello, V., Porter, J., Pusch, G., Shukla, M., Singh, I., Stewart, L., Tan, G., Thomas, C., VanOeffelen M., Vonstein, V., Wallace, Z., Warren, A., Wattam, A., Xia, F., Yoo, H., Zhang, Y., Zmasek, C., Scheuermann, R., & Stevens, R. (2023). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*, *51*(1 D), D678–D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>
- Olszak, T., Latka, A., Roszniowski, B., Valvano, M. A., & Drulis-Kawa, Z. (2017). Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. *Current medicinal chemistry*, *24*(36), 3987–4001. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170413100136>
- Orlova, E., y Orlova, E. (2012). Bacteriophages and Their Structural Organisation. En I. Kurtboke (Ed.), *Bacteriophages*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/34642>
- Osman, A. M. (2022). Manual del manejo orgánico del nogal. En *Boletín INIA*. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/68595>
- Pefaur, J. (2020). *Evolución de la Fruticultura Chilena en los Últimos 20 Años*. <https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/70234/evolucionFruticulturaChilena.pdf>
- Pefaur, J. (2023). *Boletín de fruta, agosto 2023*. <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-fruta-agosto-2023>
- Pennone, V., Sanz-Gaitero, M., O'connor, P., Coffey, A., Jordan, K., Van Raaij, M. J., & McAuliffe, O. (2019). Inhibition of *L. monocytogenes* Biofilm Formation by the Amidase Domain of the Phage vB_LmoS_293 Endolysin. *Viruses*, *11*(8), 722. <https://doi.org/10.3390/V11080722>
- Pinilla C., B., & Alvarez A., M. (2003). Principales enfermedades del nogal en Chile [peste negra, pudrición radicular y del cuello]. *Tierra Adentro*, *48*, 40–43. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/32612>

- Rahman, M. U., Wang, W., Sun, Q., Shah, J. A., Li, C., Sun, Y., Li, Y., Zhang, B., Chen, W., & Wang, S. (2021). Endolysin, a Promising Solution against Antimicrobial Resistance. *Antibiotics*, *10*(11), 1277. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10111277>
- Sambrook, J., & Russell, D. (2006). Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2006*(1). <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT4455>
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J., & Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, *4*(4), 519–537. <https://doi.org/10.1007/S12571-012-0200-5/METRICS>
- Subrei-ProChile. (2021). *Liderazgo Exportador de Chile en 2021*.
- Sundin, G., & Bender, C. (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>
- Thomas, C., & Nielsen, K. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(9), 711–721. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO1234>
- Torres P., A., Lolas C., M., & Labra L., E. (2006). Cerezos: principales enfermedades presentes en la región del Maule. *Boletín INIA*, *141*. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/7067>
- Vanneste, J., McLaren, G., Yu, J., Conzish, D., & Boyd, R. (2005). Copper and streptomycin resistance in bacterial strains isolated from stone fruit orchards in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, *58*, 101–105. <https://doi.org/10.30843/NZPP.2005.58.4262>
- Vikram, A., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2021). Phage Biocontrol Applications in Food Production and Processing. *Current issues in molecular biology*, *40*, 267–302. <https://doi.org/10.21775/CIMB.040.267>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, *46*(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY427>
- Win, M. H., & Yasuhiro, K. (2018). Effects of EDTA and citric acid on dry biomass, lead concentration and accumulated amounts in *Brachiaria decumbens* and *Paspalum atratum* from lead contaminated acidic soils. *International Journal of Research Publications*, *12*(1), 20–20.
- Wu, T., Jiang, Q., Wu, D., Hu, Y., Chen, S., Ding, T., Ye, X., Liu, D., & Chen, J. (2019). What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. *Food chemistry*, *274*, 698–709. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.09.017>
- Wu, Z., Zhang, Y., Xu, X., Ahmed, T., Yang, Y., Loh, B., Leptihn, S., Yan, C., Chen, J., & Li, B. (2021). The Holin-Endolysin Lysis System of the OP2-Like Phage X2 Infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Viruses*, *13*(10), 1949. <https://doi.org/10.3390/v13101949>

- 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>
- Yan, G., Yang, R., Fan, K., Dong, H., Gao, C., Wang, S., Yu, L., Cheng, Z., & Lei, L. (2019). External lysis of *Escherichia coli* by a bacteriophage endolysin modified with hydrophobic amino acids. *AMB Express*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S13568-019-0838-X/FIGURES/5>
- Yang, Y., Kessler, M., Marchán-Rivadeneira, M., & Han, Y. (2023). Combating Antimicrobial Resistance in the Post-Genomic Era: Rapid Antibiotic Discovery. *Molecules*, 28(10), 4138. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28104183>

9. Anexos

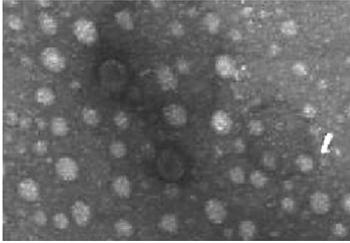


ANEXO 1: EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE LOS BACTERIÓFAGOS CON EL MÉTODO DE FENOL – CLOROFORMO.

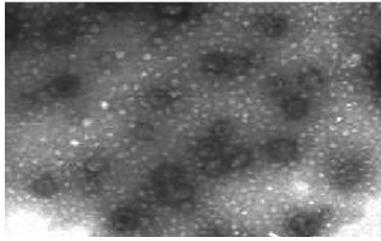
Carril 1: *Ladder* Lambda *Hind*III; Carriles 2, 3, 4, 5 y 6: Genomas de los bacteriófagos de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj 36, Xaj M2-2 y Xaj 4.1) y de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss 56a y Pss 63).

A.

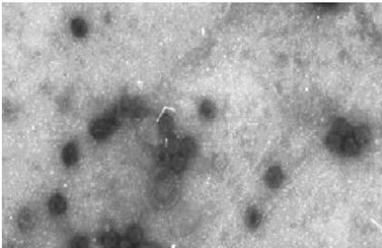
Φ Xaj M310-91a



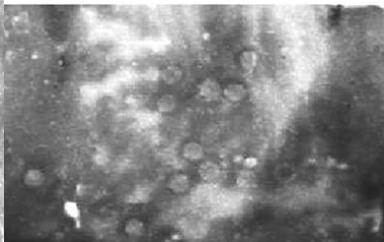
Φ Xaj M307-70a



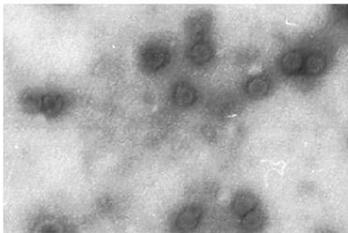
Φ Xaj M4-109a



Φ Xaj M2-2



Φ Xaj 36



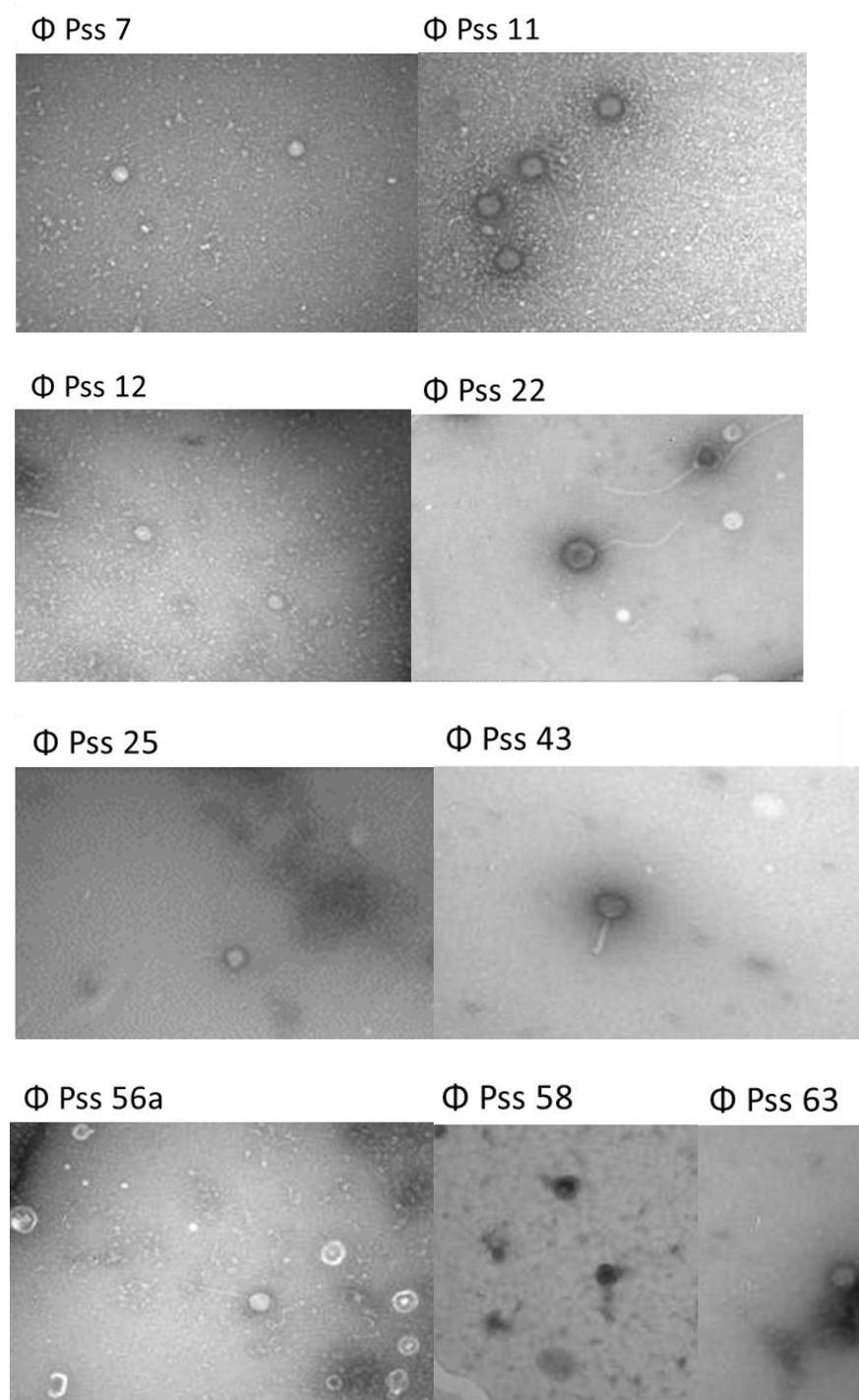
Φ Xaj 6



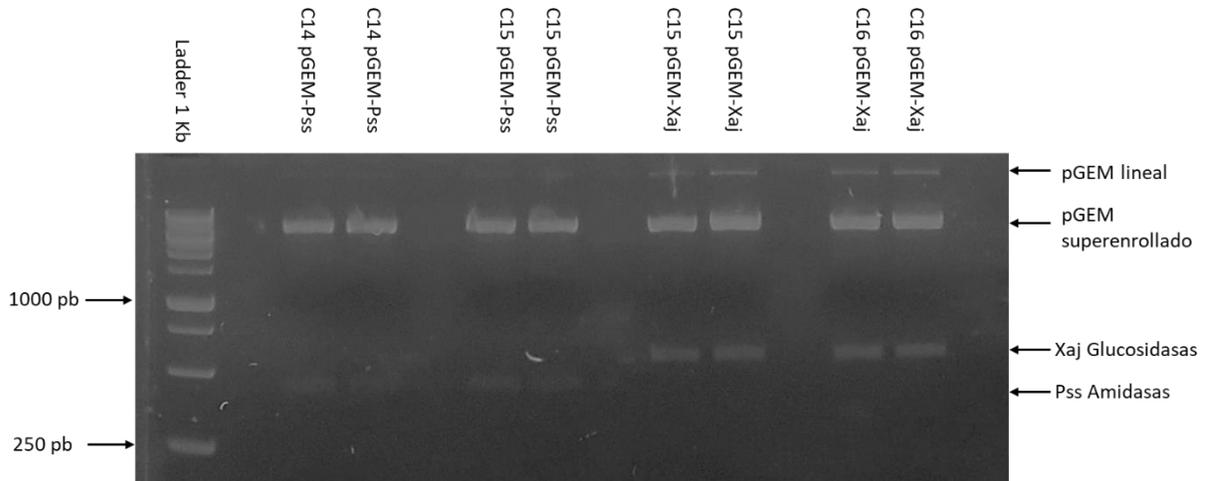
Φ Xaj 4.1



B.



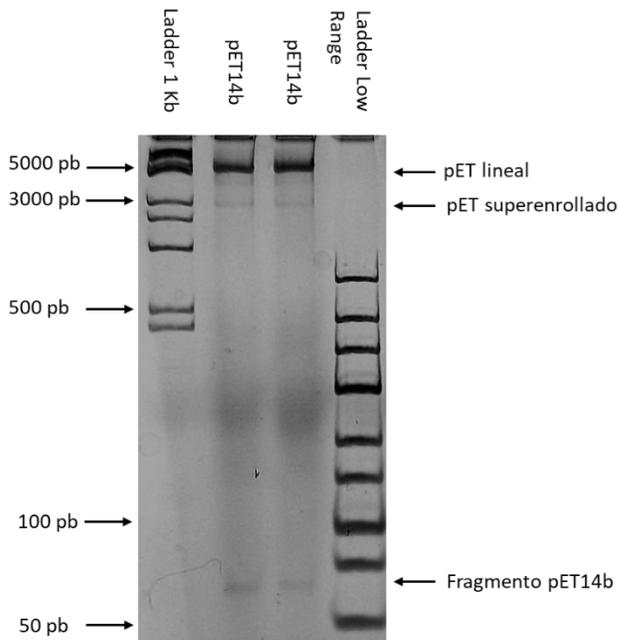
ANEXO 2: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LOS DISTINTOS BACTERIÓFAGOS DE XAJ Y PSS.
A. Morfología de los bacteriófagos de Xaj. B. Morfología de los bacteriófagos de Pss.



ANEXO 3: DIGESTIÓN DE PLÁSMIDO pGEM-XAJ/PSS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN *XhoI* Y *NcoI*.

En el proceso de digestión del plásmido, se observó un fragmento específico de 554 pb para los vectores que contenían el gen de la endolisina del fago Pss 63 (pGEM-Pss), y un fragmento de 681 pb correspondiente a los vectores con el inserto del gen de la endolisina del fago Xaj 4.1 (pGEM-Xaj), estos fragmentos fueron extraídos y purificados.

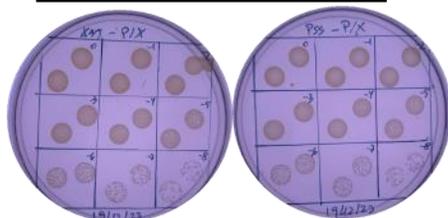
Carril 1: *Ladder* 100 bp; Carriles 2, 3, 4 y 5: Digestión de pGEM-Pss; Carriles 6, 7, 8 y 9: Digestión de pGEM-Xaj.



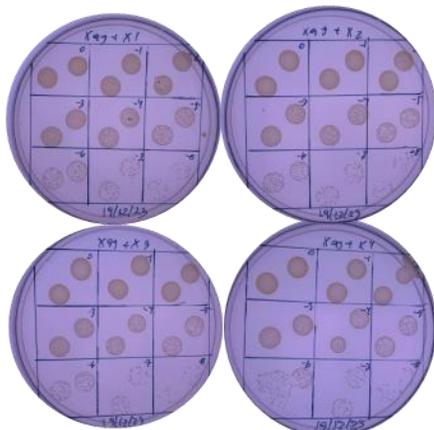
ANEXO 4: DIGESTIÓN DE PLÁSMIDO pET14B CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN *XhoI* Y *NcoI*.

En el proceso de digestión del plásmido, se obtuvo un fragmento específico de 65 pb. Sin embargo, es importante destacar que la banda purificada correspondía al vector pET14b lineal, con un tamaño aproximado de 4.606 pb. Carril 1: *Ladder* 100 bp; Carriles 2 y 3: Digestión de pET14b; Carril 4: *Ladder* de bajo peso molecular.

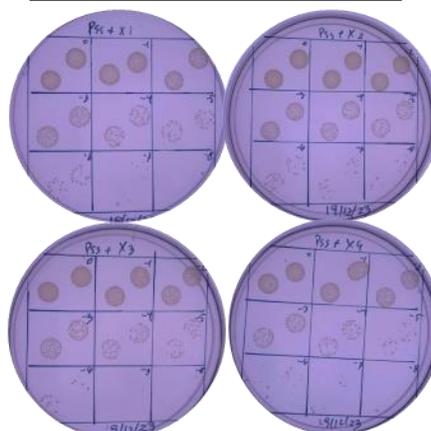
Control sin tratamiento



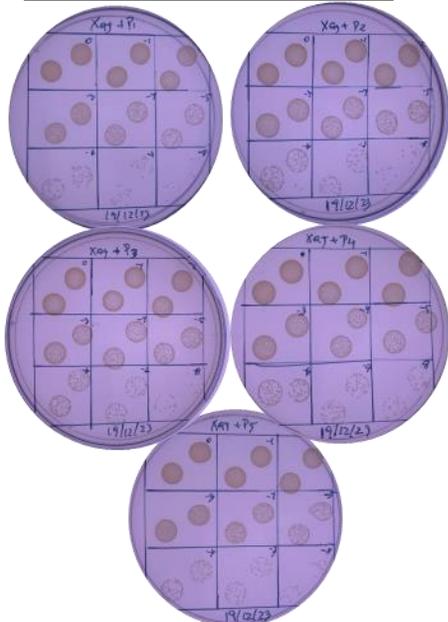
Xaj en presencia de X1-4



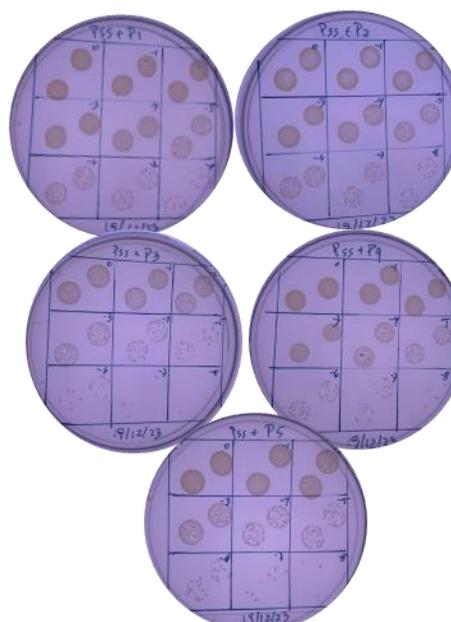
Pss en presencia de X1-4



Xaj en presencia de P1-5



Xaj en presencia de P1-5



ANEXO 5: EVALUACIÓN BACTERICIDA DE LOS EXTRACTOS DE ENDOLISINAS CONTRA LAS BACTERIAS PSS Y XAJ.

Las bacterias fitopatógenas Xaj y Pss fueron con tres grupos de pruebas: un primer grupo utilizando los extractos de proteínas totales de la endolisina proveniente del fago Xaj 4.1, el segundo grupo utilizando los extractos de proteínas totales de la endolisina proveniente del fago Pss 63 y un tercer grupo control donde no se realizó ningún tratamiento.