

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias



APLICACIÓN DE FAGOS LÍTICOS EN VIÑEDOS PARA EL
CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE PIERCE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

OSMIN TORRES GUTIERREZ

Ensenada, Baja California

junio de 2012

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias

APLICACIÓN DE FAGOS LÍTICOS EN VIÑEDOS PARA EL
CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE PIERCE

TESIS PROFESIONAL
QUE PRESENTA
OSMIN TORRES GUTIERREZ

APROBADO POR:

DR. JOSE LUIS STEPHANO H.
DIRECTOR DE TESIS

DR. MARTÍN ESCOTO RODRÍGUEZ

M.C. MIGUEL H. CARRILLO M.

Agradecimientos

A la **Facultad de Ciencias de la U.A.B.C.** por educarme como profesionista; en especial a los maestros y técnicos de calidad que ahí laboran, comprometidos con su importante labor para el país.

A la **Dra. Meredith Gould C.** (†) y **Dr. José Luis Stephano H.**, más que maestros, amigos. Gracias por darme la oportunidad de aprender en su laboratorio; por largas horas de discusión, plática, trabajo incansable y por todo el dinero invertido en beneficio del país. Un profundo agradecimiento por no dejar de creer en los jóvenes de México.

A mis sinodales **M.C. Miguel Humberto Carrillo M.** y **Dr. Martín Escoto Rodríguez.** Estoy muy agradecido por ayudarme a salir adelante y aprender aun más. Agradezco su paciencia y voluntad por la enseñanza.

Al **M.C. Jesús Bernardino Ortiz**, profesor y amigo, por ayudarme con gran parte del análisis estadístico y formato del trabajo. Gracias por tus consejos y ayuda desinteresada.

A **Adalberto Xico Ramirez**, de Ajosia prototipos y manufacturas S.A. de C.V. por su invaluable ayuda en la asesoría y manufactura del dispositivo XyllaKill.

Al **Ing. Israel Gradilla** del laboratorio de microscopía electrónica del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la U.N.A.M. por su valiosa ayuda en la observación de muestras a lo largo de este y otros proyectos.

Al **equipo de trabajo de "Enfermedad de Pierce"**. Durante 6 años trabajé codo a codo con distintos compañeros, a todos les agradezco su camaradería, enseñanzas y críticas. Me hubiera gustado que estuvieran todos presentes. Un abrazo.

A mi **familia y amigos**, pieza fundamental en mi formación personal y académica. La lista de nombres es tan extensa como el agradecimiento mismo. Gran parte de lo que soy (y aspiro ser) es gracias a ustedes.

A **usted** que tiene este trabajo en sus manos, espero le sea de utilidad.

Dedicatoria

Al pueblo de México. Es mi anhelo que mi formación retribuya su apoyo.

A todos aquellos que luchan cada día por dejar el mundo mejor de cómo lo encontramos.

Resumen de la tesis de Osmín Torres Gutiérrez presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología.

Ensenada, Baja California, junio de 2012.

APLICACIÓN DE FAGOS LÍTICOS EN VIÑEDOS PARA EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE PIERCE.

La bacteria *Xylella fastidiosa*, causante de la enfermedad de Pierce en la vid, ocasiona pérdidas en la industria vitivinícola, así como en otras plantas de interés económico. Actualmente no hay un tratamiento para curar esta enfermedad. En el laboratorio "Meredith Gould", de la U.A.B.C., se desarrolló un bacteriófago lítico capaz de eliminar a la bacteria *in vitro*.

En este trabajo se estudiaron los factores que deben considerarse para llevar a cabo una aplicación de bacteriófagos en plantas adultas en campo, tales como técnicos, ambientales, fisiológicos de las plantas y estabilidad de los bacteriófagos.

Se encontró que los meses de mayo a julio son los más adecuados para realizar las aplicaciones al xilema. Además se estudió el movimiento de pintura vegetal dentro del xilema que simula al tratamiento de bacteriófagos; éste fue en sentido basipétalo y acropétalo, restringido a la porción de xilema en que se inyectó.

También se determinó el tiempo de estabilidad de los bacteriófagos en las condiciones de campo aquí utilizadas, siendo al menos de 10 días si se les protege de la radiación solar.

En relación con los experimentos de inyección de bacteriófagos en plantas enfermas, se encontraron diferencias significativas solamente en las primeras etapas de desarrollo post-letargo, comparando con plantas enfermas no tratadas. Al cuantificar colonias de *X. fastidiosa* (antes y después del tratamiento) no hubo diferencias significativas. Sin embargo, los resultados sugieren que el tratamiento evita la progresión de la enfermedad.

Este es apenas el primer paso para una serie de experimentos en campo con miras a combatir la enfermedad de Pierce a través del uso de bacteriófagos anti-*Xylella* creados en el Laboratorio Meredith Gould

Resumen aprobado por: _____
Dr. José Luis Stephano Hornedo

ÍNDICE

1.0.- Introducción.....	1
2.0.- Antecedentes.....	4
3.0.- Objetivos.....	11
4.0.- Metodología.....	12
4.1.- Sitio de estudio y plantas utilizadas.....	12
4.2.- Comparación entre distintos sistemas para aplicar tratamientos a plantas.....	13
4.2.1.- Sistemas utilizados.....	13
4.2.2.- Solución de pintura vegetal.....	14
4.2.3.- Construcción de dispositivo XyllaKill.....	15
4.2.4.- Aplicación de pintura vegetal en la vid.....	16
4.3.- Determinación del arreglo espacial de las aplicaciones/inyecciones..	17
4.3.1.- Medición del área teñida en xilema.....	18
4.3.2.- Registro de la distancia recorrida por la pintura.....	19
4.4.- Determinación de la época adecuada para aplicar/inyectar XyllaKill..	20
4.4.1.- Inyección de solución marcadora en la vid.....	20
4.4.2.- Análisis proximal de secreción en plantas.....	21
4.4.3.- Análisis por microscopia electrónica de barrido.....	21
4.5.- Estabilidad de Bacteriófagos en el campo.....	22
4.5.1.-Cultivo de bacteriófagos (VCSM13 Helper y VCSM13-scFv-CB)	22
4.5.2.- Incubación de bacteriófagos en el campo.....	24
4.5.3.- Estimación de bacteriófagos activos.....	25
4.6.- Aplicación de bacteriófagos en plantas enfermas.....	26
4.6.1.- Selección de plantas enfermas.....	26
4.6.2.- Producción de bacteriófagos VCSM13 Helper.....	27
4.6.3.- Aplicación de bacteriófagos por inyección y difusión.....	28
4.6.4.- Comparación cualitativa.....	29
4.6.5.- Muestreo post-aplicación.....	30
4.7.- Análisis estadístico.....	31
5.0.- Resultados.....	32
5.1 Comparación entre distintos sistemas para aplicar tratamientos a plantas.....	31
5.1.1.- Dispositivo XyllaKill.....	31
5.1.2.- Volumen aplicado con cada sistema.....	36
5.1.3.- Área teñida del xilema con cada sistema.....	39
5.1.4.- Distancia recorrida.....	42
5.1.5.- Otros aspectos a considerar.....	45
5.2.- Arreglo espacial de las aplicaciones.....	48
5.3.- Periodo de aplicación.....	52

5.4.- Estabilidad de los bacteriófagos en el campo.....	55
5.5.- Aplicación de bacteriófagos en plantas enfermas.....	59
5.5.1.-Plantas seleccionadas.....	59
5.5.2.- Producción de bacteriófago VCSM13 Helper.....	60
5.5.3.- Aplicación de bacteriófagos en las plantas.....	61
6.0.- Discusiones.....	69
7.0 Conclusiones.....	84
8.0.- Literatura citada.....	85
9.0.- Anexos.....	89

Índice de Cuadros

Cuadro 4-1: Resumen de los distintos tratamientos aplicados a los bacteriófagos y el antibiótico utilizado en el medio selectivo.

Cuadro 5-1: Volúmenes inyectados de acuerdo al sistema utilizado y al número de inyecciones por planta.

Cuadro 5-2: Parámetros estadísticos para los volúmenes inyectados con cada sistema haciendo una aplicación por planta.

Cuadro 5-3: Parámetros estadísticos para los volúmenes inyectados con cada sistema haciendo cuatro aplicaciones por planta.

Cuadro 5-4: Porcentaje de xilema marcado con cada uno de los sistemas de inyección.

Cuadro 5-5: Resumen de aspectos técnicos y económicos de los diferentes sistemas.

Cuadro 5-6: Composición de la goma encontrada en el sitio de aplicación.

Cuadro 5-7: Número de colonias resistentes a tetraciclina como indicador de fagos biológicamente activos.

Cuadro 5-8: Lotes de producción de fagos a gran escala, utilizados en los experimentos.

Índice de Figuras

Figura 4-1: Campo experimental en Viña Alegre, Valle de Guadalupe.

Figura 4-2: Sistemas para inyección de tratamientos a plantas.

Figura 4-3: Aislamiento de raíces laterales de la planta en invernadero.

Figura 4-4: Método para estimar el área teñida.

Figura 4-5: Línea del tiempo para la incubación de bacteriófagos en el campo.

Figura 5-1: Primer prototipo del dispositivo XyllaKill conectado a una planta de uva.

Figura 5-2: Compatibilidad entre la boca de la jeringa y la válvula arborplug.

Figura 5-3: Principales modificaciones en el prototipo de la 2ª etapa.

Figura 5-4: Dispositivo XyllaKill con válvula de hule para agregar presión.

Figura 5-5: Válvula arborplug completa y cortada a la mitad.

Figura 5-6: Prototipo final del dispositivo Xyllakill.

Figura 5-7: Comparación entre los distintos sistemas de acuerdo al volumen administrado con una aplicación por planta.

Figura 5-8: Comparación entre los distintos sistemas de acuerdo al volumen administrado con cuatro aplicaciones por planta

Figura 5-9: Comparación del porcentaje de área pintada en el xilema con cada uno de los sistemas haciendo una aplicación por planta.

Figura 5-10: Comparación del porcentaje de área pintada en el xilema con cada uno de los sistemas haciendo cuatro aplicaciones por planta.

Figura 5-11: Movimiento y tinción del xilema con cada uno de los sistemas y variando el número de aplicaciones por planta.

Figura 5-12: Cortes transversales de tallos de planta inyectada con pintura vegetal con el sistema Tree IV.

Figura 5-13: Cortes de brotes de planta inyectada con 4 dispositivos XyllaKill.

Figura 5-14: Cortes de brotes de planta control sin inyectar.

Figura 5-15: Solución de pintura vegetal en los vasos del xilema a diferentes alturas del tallo, introducida por la raíz, en una planta pequeña.

Figura 5-16: Cortes transversales del tallo de una planta adulta..

Figura 5-17: Planta con daño mecánico por mala aplicación de tratamiento.

Figura 5-18: Secreción de savia en los primeros meses del año, previo a la brotación.

Figura 5-19: Patrón de volúmenes inyectados a lo largo de dos años.

Figura 5-20: Micrografías electrónica de goma secretada por la planta.

Figura 5-21: Actividad de bacteriófagos bajo distintos tratamientos.

Figura 5-22: Número de colonias resistentes a carbencilina que produce cada grupo de fagos, según el tratamiento.

Figura 5-23: Formación de placas líticas con fagos incubados en el campo.

Figura 5-24: Colonias de *E. coli* XL1 blue infectadas por fagos bajo distintos tratamientos.

Figura 5-25: Colonias de *X. fastidiosa* en medio sólido PD2.

Figura 5-26: Placa para análisis de ELISA.

Figura 5-27: Grado de desarrollo (según Hellman, 2003) entre plantas tratadas y no tratadas (mes: marzo)

Figura 5-28: Grado de desarrollo en vid en plantas tratadas y no tratadas.

Figura 5-29: Comparación cualitativa entre plantas tratadas y no tratadas.

Figura 5-30: Número de racimos por planta en plantas tratadas y no tratadas (mes: junio)

Figura 5-31.- Grado de desarrollo de frutos (según Hellman, 2003) entre plantas tratadas y no tratadas (junio)

Figura 5-32.- Cantidad de fruto (kilogramos) por planta en plantas tratadas y no tratadas (mes: agosto)

Figura 5-33: Número de UFC (LOG10) en plantas tratadas y no tratadas, 2008 y 2010

Figura 5-34: Lectura de ELISA en plantas tratadas y no tratadas, 2008 y 2010

Figura 5-35: Regresión lineal entre el volumen de tratamiento inyectado y el número de colonias (LOG10) de *X. fastidiosa* después del tratamiento.

Figura 5-36: Regresión lineal entre la cantidad de fagos inyectados y el número de colonias (LOG10) de *X. fastidiosa* después del tratamiento (2010).

Figura 5-37: Regresión lineal entre el volumen de tratamiento aplicado y el valor de absorbancia por ELISA anti-*Xylella*, después del tratamiento (2010)

Figura 5-38: Regresión lineal entre la cantidad de bacteriófagos inyectados y el valor de absorbancia por ELISA anti-*Xylella*, después del tratamiento (2010).

1.0.Introducción

La bacteria *Xylella fastidiosa* es causante de muchas enfermedades en plantas con importancia económica, entre ellas está la enfermedad de Pierce que afecta a la vid (*Vitis vinifera*) (Chatelet *et al.*, 2006). Los síntomas característicos de esta enfermedad son: hojas con márgenes quemados; peciolo verde sin lámina; parches de tejido leñoso e inmaduro; necrosis y frutos anormales (Davis, 1991). Los efectos de esta enfermedad implican pérdidas económicas dado que la producción de frutos se reduce y finalmente mueren las plantas tras un lapso de 3 a 5 años (Bextine *et al.*, 2004; Ignoffo y Garcia, 1992 en Purcell, 1997). El rango de hospederos de *X. fastidiosa* incluye a plantas de al menos 28 familias (Bergamin, 1981 en Jones, 2007); entre las plantas afectadas de valor económico se encuentran cítricos, café, durazno, ciruelo, almendro, alfalfa, y algunos árboles ornamentales como el olmo, roble, arce y laurel, entre otros (Purcell y Hopkins, 1996). En Baja California el cultivo de vid es la principal actividad frutícola, abarcando 3,042 hectáreas (has) distribuidas entre 155 productores. Se estiman pérdidas de producción en las 16 has donde se ha presentado la enfermedad; así mismo, el costo de producción por hectárea se incrementa en \$5,000 pesos/ha debido al manejo agronómico que se requiere (SAGARPA, 2011). Las pérdidas potenciales podrían alcanzar hasta 642 millones de pesos (SAGARPA, 2009).

X. fastidiosa es una bacteria gram-negativa con forma de bastón, de 0.25 a 0.50 μm de diámetro y una longitud de 1 a 4 μm . Tiene 2 tipos de pili que le ayudan a moverse y a adherirse (Meng *et al.*, 2005). Su hábitat está limitado al xilema (Davis *et al.*, 1978) y eventualmente al aparato bucal de los insectos

vectores (Purcell, 1979; Bextine, 2004). Comúnmente se aísla de tejidos sintomáticos y una característica notable es el lento crecimiento de las colonias (Bank, 1999).

Un elemento esencial en la dispersión de *X. fastidiosa* son los insectos saltahojas (Homoptera: Cicadellidae, tribus Cicadellini y Proconiini), comúnmente llamados chicharritas, que se alimentan de la savia de las plantas (Redak *et al.*, 2004). Estos insectos, al alimentarse de la savia del xilema de plantas infectadas, toman células de *X. fastidiosa* y las llevan a plantas sanas (Purcell y Hopkins, 1996). Existen muchas especies de chicharras. En Baja California y California (EE.UU.) uno de los vectores nativos es la chicharra verde azul (*Graphocephala atropunctata*). Sin embargo, desde que se introdujo la chicharra de alas cristalinas (*Homalodisca vitripennis*, antes *H. coagulata*) en el sur de California en 1989, se incrementó drásticamente la incidencia de la enfermedad de Pierce en Estados Unidos (Blua *et al.*, 1999).

La enfermedad de Pierce ocurre cuando los vasos del xilema son obstruidos por *X. fastidiosa* y con ello se interrumpe el flujo de agua y nutrientes (Purcell y Hopkins, 1996). Una vez que *X. fastidiosa* es introducida al xilema de la planta por acción del vector, la bacteria comienza a multiplicarse y a dispersarse a lo largo del xilema. Los vasos del xilema se comunican entre sí a través de canales, conocidos como punteaduras, que permiten el flujo de la savia y bloquean el paso de objetos más grandes mediante una membrana reticulada cuyos poros tienen un tamaño entre 0.005 a 0.17 μm (Chatelet *et al.*, 2006). Las bacterias se adhieren a las paredes de los vasos y se multiplican formando agregados. Adicionalmente, y

como respuesta al patógeno, la planta comienza a producir pectinas, tilosas y gomas (Stevenson *et al.*, 2004). No se sabe con certeza si los síntomas son provocados directamente por los agregados de bacterias o por los geles de tilosas y polisacáridos que produce la planta (Chatterjee *et al.*, 2008).

La bacteria *X. fastidiosa* se encuentra ampliamente distribuida en los trópicos y sub-trópicos americanos (Purcell, 1997). Las enfermedades causadas por este patógeno están casi restringidas al continente americano, excepto por unos reportes de quemadura de hoja de pera en Taiwán (Su y Leu, 1995) y de enfermedad de Pierce en la antigua Yugoslavia (Redak *et al.*, 2004 en Berisha *et al.*, 1998). La mayoría de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* ocurren en Norte América y son particularmente severas en lugares donde el invierno es moderado, como en las regiones tropicales y sub-tropicales, incluyendo las regiones de clima mediterráneo (Redak *et al.*, 2004 en Purcell 1997). Sin embargo, existen reportes de la enfermedad de Pierce en Centroamérica (Redak *et al.*, 2004 en Goheen *et al.*, 1979) y de otras enfermedades en Sudamérica, como la Escaldadura en la Hoja del Ciruelo en Brasil y Paraguay (Redak *et al.*, 2004 en French y Kitajima, 1978) y la Quemadura en la hoja del Almendro en Argentina (Redak *et al.*, 2004 en Nomé *et al.*, 1992). Algunas enfermedades producidas por *X. fastidiosa* solo se distribuyen en Sudamérica, como la Clorosis Variegada de Cítricos (CVC) y la Quemadura en la Hoja del Café (CLS), que probablemente también ocurre en Costa Rica (Redak *et al.*, 2004).

2.0.- Antecedentes

Los métodos para controlar la enfermedad de Pierce se basan principalmente en el manejo de los insectos vectores y en la reducción de las fuentes de inóculo (Purcell y Hopkins, 1996). Una temprana detección del insecto vector y del patógeno es importante para evitar el esparcimiento de la enfermedad (Rodrigues *et al.*, 2003). En los esfuerzos dirigidos a controlar al insecto vector se siguen estrategias variadas, como el uso de insecticidas y programas de control biológico a fin de reducir la densidad de la población total de los vectores; hay quienes utilizan largas barreras de malla con el objetivo de reducir el número de insectos que entran a cultivos susceptibles o en cuarentena (Tariq *et al.*, 2002). En cuanto a las estrategias orientadas al tratamiento directo en plantas ha habido diversos intentos. El uso de antibióticos, como la estreptomicina, aplicados en el tronco se ha utilizado para eliminar a bacterias fitopatógenas desde mediados del siglo XX (Thayer y Stall 1961 en Jones *et al.*, 2007). Sin embargo, su uso extensivo ha propiciado el incremento de cepas resistentes, lo que ha llevado a que este método de control sea cada vez menos eficaz (Jones *et al.*, 2007). Otra estrategia es el desarrollo de variedades de vid resistentes a través de técnicas tradicionales o por transgénicos. Sin embargo, este es un campo en el que apenas se está incursionando (Tariq *et al.*, 2002). Un recurso más consiste en la eliminación total de la planta enferma (Purcell y Hopkins, 1996), lo que significa perder dinero y tiempo de cuidado al agricultor.

El uso de virus específicos de bacterias (bacteriófagos o fagos) para el combate a bacterias patógenas ha sido reconsiderado en sustitución a los

antibióticos (Jones *et al.*, 2007). Es de notar que su uso terapéutico no es reciente. La terapia con fagos fue introducida por Felix d'Herelle, co-descubridor de los mismos, a principios del siglo XX; a lo que siguió una oleada de interés una vez que se observaron sus propiedades antibacterianas (Matsuzaki *et al.*, 2005). Sin embargo, disminuyó el interés después del descubrimiento y aplicación de los primeros antibióticos en los años 30 (Clark y March, 2006).

Los bacteriófagos representan una mejor opción debido a las siguientes ventajas esenciales. Los bacteriófagos tienen una tasa alta de mutación y replicación (Lorch, 1999), con esto se supera la cuestión de que muchos patógenos adquieren resistencia a antibióticos (Matsuzaki *et al.*, 2005). Otro beneficio es que los bacteriófagos son muy específicos con sus huéspedes bacterianos; así, otras células (eucariotas o procariotas benéficas) no se ven afectadas por los bacteriófagos ni sus productos (Lorch, 1999; Matsuzaki, 2005). Una ventaja técnica es que los bacteriófagos son relativamente fáciles de manipular y esto permite expresar librerías de proteínas, péptidos o anticuerpos con más facilidad (Clark y March, 2006). En cuanto a costos, el desarrollo de un sistema en bacteriófagos es más económico que el desarrollo de un nuevo antibiótico (Matsuzaki, 2005). En el aspecto legal también hay ventajas debido a que en algunos casos no se permite el uso de algún control químico previo a la cosecha, con los fagos no habría este problema (Zaccardelli *et al.*, 1992 en Jones *et al.*, 2007).

Actualmente existen varias aplicaciones comerciales de bacteriófagos, la mayoría de ellas en el campo de la medicina. Recientemente, en 2006, el

Departamento Federal de Agricultura de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó (Registro Federal Vol. 71, No. 160, Agosto 18, 2006) a la compañía Intralytix una formulación de 6 bacteriófagos diferentes para ser rociados en comida instantánea y productos avícolas (González *et al.*, 2008). Esta misma empresa biotecnológica, en colaboración con la Universidad de Maryland (EE.UU.), se encuentran desarrollando un polímero biodegradable –llamado PhageBioderm – impregnado con varios fagos que ayudarán a proteger contra infecciones causadas por bacterias patógenas en heridas y quemaduras (Lorch, 1999). Otro producto llamado IntestiPhage, que contiene 23 distintos bacteriófagos activos contra un amplio rango de enfermedades entéricas, ha sido desarrollado por el Instituto Eliava en Georgia (Jones *et al.*, 2007). Otros posibles avances importantes se encuentran aún en etapa de investigación. Tal es el caso de bacteriófagos M13 que expresan un scFv específico contra *Helicobacter pylori*, causante de infecciones estomacales. En pruebas de laboratorio se ha logrado disminuir los títulos de este patógeno en estómago de ratones (Matsuzaki, 2005).

También en el campo de patología de plantas existen importantes hallazgos en cuanto a la aplicación de bacteriófagos; en distintos experimentos se ha demostrado su efectividad como tratamiento preventivo. En 1971, Boyd y colaboradores demostraron que plantas de tomate podían absorber bacteriófagos de *Agrobacterium tumefaciens* a través de la raíz; además, observaron que la irritación que provoca esta bacteria a la planta disminuía notablemente al administrar los bacteriófagos previo al patógeno (Boyd *et al.*, 1971 en Jones *et al.*, 2007). Civerolo y Keil (1969) reportaron que si los bacteriófagos son aplicados a la

planta de durazno una hora antes de inocular al patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* se reducían los síntomas en gran porcentaje. Sin embargo, al aplicar los bacteriófagos después que al patógeno los síntomas no se reducen significativamente (Civerolo y Keil. 1969, citado en: Jones J.B. *et al.*, 2007). En 1981, Bergamin y colaboradores obtuvieron resultados similares en calabaza y pimiento. Observaron que si los bacteriófagos son aplicados a la planta desde tres días hasta un día antes, o el mismo día en el caso del pimiento, respecto a la inoculación del patógeno (*X. campestris*) se lograba reducir significativamente los síntomas de la Enfermedad de Raíz Negra (Bergamin *et al.*, 1981, citado en: Jones J.B. *et al.*, 2007). Algunas aplicaciones similares a las anteriores han alcanzado el sector comercial, es el caso de las compañías AgriPhi e IntraLytics. La primera ha comercializado mezclas de bacteriófagos mutantes y modificados contra diversos patógenos de plantas. La segunda compañía ha desarrollado y comercializado un producto llamado AgriPhage, que consiste en una mezcla de bacteriófagos contra el patógeno *X. campestris* pv. *vesicatoria* causante de la Enfermedad de la Mancha Bacteriana del Tomate (TBS, por sus siglas en inglés) (Jones *et al.*, 2007).

Otras investigaciones se han encaminado a estudiar la estabilidad de los bacteriófagos bajo las diversas condiciones que prevalecen en los agroecosistemas. En 1971, Kuo *et al.*, observaron que bacteriófagos de *X. oryzae* permanecían estables por siete días en el sitio de la aplicación, esto solo en ausencia de la bacteria huésped (Kuo *et al.*, 1971, citado en: Jones JB *et al.* 2007). Se ha estudiado también el efecto del pH en la viabilidad de los bacteriófagos. En

1944, Schade y Caroline observaron que al someter los virus a un pH menor a 3.5 estos perdían actividad de manera sustancial (Schade y Caroline, 1944). Resultados similares obtuvieron Ignoffo y colaboradores al demostrar que los bacteriófagos pierden actividad al ser sometidos a niveles de pH extremos (Ignoffo *et al.* 1992, citado en: Jones J.B.*et al.* 2007; Ignoffo *et al.* 1989, citado en: Jones J.B.*et al.* 2007). La radiación solar es otro factor ambiental que perjudica la actividad de los bacteriófagos. Ignoffo y García, en un experimento con luz solar artificial, encontraron que los fagos expuestos a la luz perdían 90% de actividad respecto a fagos no expuestos (Ignoffo *et al.* 1992, citado en: Jones J.B. *et al.* 2007). En 2002, Balogh logró un mejor control de la enfermedad TBS al aplicar bacteriófagos en la noche respecto a una aplicación matutina; en su estudio encontró que los niveles de radiación solar suben desde 0 a más de 400 W/m², de la noche al día respectivamente (Balogh, 2006). Otro ambiente hostil para los bacteriófagos es la rizósfera, donde las condiciones no son favorables. La falta de continuidad de una fase acuosa complica la movilidad de los bacteriófagos; además, estos pueden quedar atrapados dentro de agregaciones o ser adsorbidas a otras partículas del suelo, las arcillas por ejemplo. Además, la presencia de suelos muy ácidos es perjudicial, pues, como se mencionó antes, un pH muy bajo puede inactivar permanentemente las partículas de fago (Gill y Abedon 2003).

Para hacer factible una aplicación de bacteriófagos directamente al xilema de la planta, es necesario considerar algunos aspectos en la fisiología de la vid. En vid silvestre durante el invierno los vasos del xilema se encuentran llenos de aire. Al final de la estación, previo a la expansión de las hojas, los vasos se van

rellenando de agua por acción de la presión de raíz. Esta presión es positiva y puede llegar a alcanzar hasta 500 KPa en la base de la planta (Scholander *et al.* 1955, citado en: Sperry *et al.* 1987). En experimentos realizados en laboratorio, Sperry y colaboradores observaron que para rellenar los vasos del xilema con una solución de perfusión fue necesario aplicar una presión de 25 KPa; niveles similares a los que encontraron en el campo en plantas que secretan savia (Sperry *et al.* 1987). Más tarde, cuando las hojas se han expandido y las temperaturas son altas, en el xilema se genera una presión negativa de 2.4 MPa generados por el flujo de savia a causa de la tensión como resultado de la transpiración (Sperry *et al.* 1987; Redak *et al.* 2004).

Como una propuesta para combatir a la Enfermedad de Pierce, en el 2008 se desarrolló un bacteriófago filamentoso VCSM13 (M13) modificado, específico contra *X. fastidiosa* (Silva-Valdés, 2008). Este bacteriófago expresa una quimera formada por un fragmento de anticuerpo (scFv) específico contra *X. fastidiosa* y uno de dos péptidos líticos disponibles, ya sea Cecropín P1 o Cecropín B. Este sistema de expresión tiene el potencial para producirse a gran escala, lo que facilita su aplicación a un gran número de plantas enfermas en el campo (Silva-Valdés, 2008). El tamaño del fago filamentoso M13 es de 6.5 nm de diámetro y 930 nm de largo (Barbas *et al.*, 2001).

En este trabajo se examinan aspectos fisiológicos específicos de la vid, así como la estabilidad del bacteriófago VCSM13 modificado expuesto a las condiciones ambientales que prevalecen en un viñedo del Valle de Guadalupe. Esto con el objetivo de ayudar en la estrategia de aplicación del bacteriófago anti-

Xylella, y optimizar la interacción bacteriófago-huésped. Este estudio también pretende servir a los viticultores en la expansión de su conocimiento y que en un futuro hagan una mejor aplicación, no solo para combatir a la enfermedad de Pierce sino para administrar diferentes suplementos en plantas.

3.0.- Objetivos

Objetivos Generales

Describir las condiciones óptimas para hacer una aplicación de bacteriófagos en el combate a la enfermedad de Pierce.

Evaluar el impacto del bacteriófago VCSM13 Helper en plantas de campo infectadas naturalmente por *X. fastidiosa*.

Objetivos Particulares

- Comparar distintos sistemas de inyección para la aplicación de bacteriófagos al xilema.
- Determinar el arreglo espacial en que deben hacerse las aplicaciones sobre el tronco para lograr una mayor cobertura de bacteriófagos en el xilema.
- Determinar la época del año en que es adecuado hacer las aplicaciones de bacteriófagos.
- Evaluar la estabilidad de los bacteriófagos bajo condiciones del campo.
- Evaluar el efecto del bacteriófago anti-*Xylella* sobre plantas naturalmente infectadas en un campo experimental.

4.0.- Metodología

4.1.- Sitio de estudio y plantas utilizadas

Los experimentos se realizaron en el rancho Viña Alegre (Figura 4-1), propiedad de la vinícola L.A. Cetto. Este se ubica en el Valle de Guadalupe (32°6'57.66"N, 116°29'22.45"O), Baja California, México. El clima es de tipo mediterráneo (Delgadillo, 1992).

Para los experimentos se utilizaron plantas de vid (*V. vinífera*) de la variedad Chardonnay. Al momento de los experimentos (2008 a 2010) las plantas tenían una edad de 14 a 20 años (Ing. E. Flores¹, comentario personal).

Adicionalmente, se trabajó en otras localidades y con variedades de vid distintas. Se utilizaron plantas de un año, variedad Globo Rojo, germinadas en el invernadero de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Autónoma de Baja California. Otros experimentos se hicieron en el Rancho del Dr. José Luis Stephano (32°0'24.40"N, 116°39'3.70"W), en la zona de San Antonio de las Minas, aledaña al Valle de Guadalupe. Las plantas ahí utilizadas fueron de la variedad Thompson, las plantas tenían una edad de aproximadamente 20 años (Dr. J.L. Stephano², comentario personal).

¹Ing. Agr. Eduardo Flores, Vinícola LA Cetto

²Dr. José Luís Stephano, Facultad de Ciencias, U.A.B.C.



Figura 4-1: Campo experimental en Viña Alegre, Valle de Guadalupe.

4.2.- Comparación entre distintos sistemas de inyección.

Se adquirieron tres sistemas comerciales de la compañía ArborJet Inc. y adicionalmente se desarrolló un sistema propio (Figura 4-2). Se realizaron experimentos para elegir aquel que se ajuste mejor a nuestras necesidades. Las variables comparadas fueron: volumen inyectado, proporción del xilema que abarca la inyección, distancia que recorre el tratamiento, aspectos técnicos relacionados con la instalación y costo.

4.2.1.- Sistemas utilizados

- Sistema de micro-inyección Quikjet, Arborjet.
- Sistema hidráulico de micro-inyección Viper, Arborjet.
- Sistema de micro-difusión Tree I.V., Arborjet.
- Sistema XyllaKill, creado en el laboratorio.



Figura 4-2: Sistemas para inyección de tratamientos a plantas: (A) Sistema de micro-inyección QUIKjet; (B) Sistema hidráulico de micro-inyección Viper; (C) Sistema de micro-infusión Tree I.V. y (D-1) Dispositivo para micro-difusión XyllaKill, desarrollado en el laboratorio y (D-2) modelo final del mismo dispositivo XyllaKill.

4.2.2.- Solución de pintura vegetal

Se preparó una solución marcadora a base de pintura vegetal Chefmaster®, Byrnes & Kieffer Co. (40 mg/mL) en agua destilada. Se utilizó color rojo (Super Red) para obtener mayor contraste con el tejido vascular de la planta.

4.2.3.- Construcción de dispositivo XyllaKill

El desarrollo del dispositivo XyllaKill se realizó en tres etapas: 1) elaboración de un prototipo, 2) pruebas con el prototipo y 3) manufactura del modelo final.

En la primera etapa se hizo un ensayo con un prototipo hecho con material de laboratorio. Se utilizó para su elaboración una columna de purificación (YM3, Amicon, Centricon, No. Cat. 4240) y una jeringa de insulina. La columna de purificación, a la cual se le retiró previamente la membrana de celulosa, sirvió como reservorio para la solución marcadora. La función de la jeringa fue de conductor entre el reservorio y la planta. Se hizo un ensayo con este primer prototipo en una planta de vid.

En la segunda etapa, siguiendo el modelo anterior se construyeron más prototipos. Se variaron algunas cosas respecto a la etapa anterior: como reservorio se utilizaron tubos de polipropileno de fondo cónico para centrífuga, de 50 mL (No Cat. 21008690, Corning, NY, EE.UU.); se aprovechó la compatibilidad entre la punta de la jeringa y la válvula arborplug (No. Cat. 070-0150, Arborjet Inc., MA, E.U.) utilizado en los sistemas comerciales Arborjet y se utilizó como adaptador adicional para sujetar más firme el dispositivo a la planta.

Para la tercera etapa, se contactó a una compañía de ensamblaje y manufactura de plásticos, Ajosia S.A. de C.V. (Tecate, B.C.) Esta compañía, con base en nuestros prototipos, elaboró un diseño y lo manufacturó mediante impresión Polyjet 3D. A través de constantes pruebas a los prototipos que la compañía fue elaborando es como se hicieron varias correcciones.

4.2.4.- Aplicación de pintura vegetal en la vid

Se inyectó pintura vegetal (descrita arriba) en la base del tronco de las plantas, a 10 cm del suelo y siempre por encima de la unión del injerto. Cada inyección se hizo en una planta diferente. Para reducir al máximo la variable *tamaño de la planta*, se seleccionaron plantas que tuvieran un tronco con perímetro entre 14 y 19 cm.

Al inyectar la solución con cualquiera de los 3 sistemas comerciales Arborjet se utilizó la metodología descrita por el fabricante, a continuación se explica brevemente: Con ayuda de un taladro y broca de 0.71 ó 0.95 cm (arborplug #3 ó #4 respectivamente) se hizo un agujero en el tronco con profundidad 1.58 cm y se insertó la válvula arborplug, a través del cual se inyectó la pintura.

Para colocar el dispositivo XyllaKill la metodología es similar. Se hizo un agujero de 1.58 cm de profundidad en el tronco con una broca previamente limpiada con etanol. En los casos en que se colocó el dispositivo directo se usó la broca de 0.71 cm, cuando se colocó el dispositivo con ayuda de la válvula arborplug se utilizó la broca de 0.95 cm. Al colocarse el dispositivo directo en el tronco se utilizó un sellador para árboles (Morrison's Tree Seal, Lilly Miller Brands, CA, E.U.) para fijar el sistema a la planta. Al usar la válvula arborplug #4, solamente se insertó en la planta y se fijó el dispositivo a este. Previamente se le quitó el sello de silicón que incluye para evitar fugas con los sistemas Arborjet (para más detalle sobre instalar los sistemas Arborjet ver Anexo 1).

4.3.- Determinación del arreglo espacial de las aplicaciones/inyecciones

Se realizaron algunos experimentos preliminares en plantas de invernadero Globo Rojo. Los experimentos de campo se llevaron a cabo en el rancho Viña Alegre.

En las plantas de invernadero se administró pintura vegetal a través de la raíz. En un microtubo (No Cat. 3810X, Eppendorf®) de 1.5 mL, sin tapa, se colocó solución marcadora y se tapó con plástico parafilm (Pechiney, Plastic Packaging). En el plástico se hizo un pequeño agujero por el cual se introdujo cuidadosamente una sola raíz lateral de la planta. Para descubrir la zona radicular de la planta: cuidadosamente se fue escarbando con un lápiz hasta encontrar una de las raíces laterales (Figura 4-3), se manejó cuidadosamente pues se rompen fácilmente.



Figura 4-3: Aislamiento de raíces laterales de la planta en invernadero.

4.3.1.- Medición del área teñida

Se inyectaron 12 plantas (3 por cada sistema) con solución marcadora de la manera en que se explicó en la sección 4.2.4. Sin embargo, solo se cortó una planta por cada tratamiento. Esto por la cuestión de no cortar muchas plantas que son útiles en la producción de uva.

Después de la dosificación de la pintura vegetal, las plantas se dejaron intactas por 24 horas y después se cortaron desde la base y debajo de la unión del injerto. En el laboratorio, con ayuda de una sierra de disco se cortaron el tronco y ramas en segmentos de 2.5 cm (aproximadamente).

Se determinó el área de la siguiente manera: para cada segmento se dibujó el perímetro total y el perímetro del área teñida (Figura 4-4) en plástico protector (Standard Protector, C-Line Products, No 62027). Utilizando una balanza analítica (Adventurer™, No. AR1530, OAHUS Corp.) se pesó primero la figura correspondiente al área total de cada segmento, después se pesó únicamente el área correspondiente al área teñida. Tomando como referencia el peso de 1 cm² del plástico se estimó el área total de cada segmento y del área teñida, con estos dos valores se obtuvo la relación (en porcentaje) del área teñida respecto al área total de cada segmento. Finalmente se calculó el promedio de todos los segmentos en cada planta.

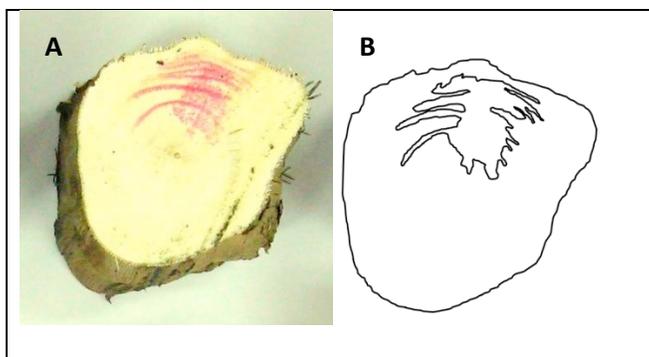


Figura 4-4: Método para estimar el área teñida. (A) Segmento de tronco de vid teñido con pintura vegetal, (B) Dibujo del área total y del área teñida, hecho sobre plástico protector.

4.3.2.- Registro de la distancia recorrida por la pintura.

En experimentos previos, con plantas Globo Rojo en invernadero, se administró pintura vegetal en el tallo de la vid; similar al protocolo utilizado para inocular bacteriófagos en plantas de invernadero. Brevemente: se agregó un volumen de 75-100 μL (dosificado en pequeñas gotas) de pintura vegetal (40 mg/mL) a la altura del tercer nudo; con una aguja hipodérmica se hicieron punciones sobre el tallo, en el sitio donde se puso la gota; la solución entró al tallo por acción de la capilaridad en los vasos del xilema; la planta se mantuvo por 24 horas en el invernadero; después se cortó el tallo en segmentos transversales de 2 mm para seguir el recorrido de la solución administrada.

En otro experimento, que solo sirvió para probar el primer prototipo de difusión (sección 4.2.3), se inyectó 2 mL de solución marcadora en una planta de vid y enseguida se cortó parte del tronco para registrar la trayectoria de la pintura.

Para los experimentos del campo experimental, se hizo provecho de las plantas utilizadas en la sección 4.3.1. Se registró el número de segmentos o

incluso ramas en los que la pintura vegetal estaba presente en el xilema, yendo de la base hacia la copa de la planta.

4.4.- Determinación de la temporada del año adecuada para aplicar XyllaKill

Para determinar la temporada del año en que es más adecuado realizar las aplicaciones, nos basamos en la época en que puede inyectarse mayor volumen a las plantas. Se hicieron inyecciones semanales de la solución marcadora, durante dos años continuos (2008 y 2009), utilizando el sistema comercial Quikjet. Este sistema permite medir el volumen inyectado gracias a que tiene un émbolo graduado, similar a una jeringa. El estudio se llevó a cabo en el campo experimental de Viña Alegre con plantas de uva variedad Chardonnay. Para cada inyección se usó una planta distinta cada vez.

4.4.1.- Inyección de pintura vegetal en la vid

La inyección se realizó en la base de la planta de la misma manera en que se explicó en la sección 4.2.4. En cada sesión semanal se inyectaron 6 plantas distintas.

Se registró el volumen inyectado en cada planta y se calculó un promedio para las 6 plantas de cada sesión. Para el análisis se realizó una gráfica con todos los promedios semanales. El experimento se realizó durante 2 años (2008 y 2009).

4.4.2.- Análisis proximal de secreción en plantas

En los casos en que fue necesario, cuando hubo plantas secretando goma, se mandó una muestra (400 mg) de la goma al servicio de Glycotechnology Core Resource (UCSD, CA, EE.UU.). Se solicitó un análisis composicional de monosacáridos (Com-001) por Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alta Eficacia acoplado a un Detector de Pulsos Amperométricos (HPAEC-PAD, por su acrónimo en inglés)

4.4.3.- Análisis por microscopía electrónica de barrido de secreción en plantas

Para el análisis de microscopía se siguió el método de fijación con gluteraldehído – tetraóxido de osmio (OsO_4). Se hicieron pequeñas modificaciones al protocolo del Laboratorio de microscopía electrónica, UC Berkeley, CA, EE.UU., brevemente: se colocó la muestra en un filtro con membrana de PVDF, 0.22 μm (Millex-GV Filter Unit, No. Cat. SLGVR04NL, Millipore); se fijó en gluteraldehído al 2% en buffer de cacodilato de sodio (0.1 M) para la fijación de proteínas principalmente, por 8-12 horas; se hicieron 3 lavados consecutivos con buffer de cacodilato de sodio; se hizo una post-fijación con tetraóxido de osmio (1%) en buffer de cacodilato de sodio por 2 horas para fijar lípidos; se hicieron 3 lavados consecutivos con buffer de cacodilato de sodio; enseguida se hizo una deshidratación por alcoholes seriados (35%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%, 100%); se extrajo la membrana de PVDF del filtro y se llevó al laboratorio de microscopía electrónica de barrido del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la U.NA.M.; ahí se hizo el desecado al punto crítico en cámara de vacío y enseguida

se montó en los soportes para microscopio; finalmente, el recubrimiento metálico se hizo con oro (0.5 mm, Sigma-Aldrich, No. Cat 310980). Para más detalle del método y reactivos consultar el Anexo 2.

4.5.- Estabilidad de bacteriófagos en el campo

4.5.1.- Cultivo de bacteriófagos (VCSM13 Helper y VCSM13-scFv-CB)

Para el cultivo de bacteriófago ayudador (Helper) se siguió el protocolo descrito por Carlos Barbas *et al.* (2001); mientras que para producir bacteriófago VCSM13-scFv-CB se siguió el protocolo descrito por Stephano y colaboradores (Batta-Lona *et al.* 2002). A continuación se describen brevemente las dos técnicas (ver Anexo 3 y 4 para una descripción más detallada).

Para el cultivo del fago Helper: se creció un cultivo de *Escherichia coli* (*E.coli*) cepa XL1 Blue (células vírgenes) en medio líquido SB. Se dividió en porciones (una o varias, según el caso) de 50 μ L y a cada alícuota se le agregó 1 μ L de bacteriófagos comerciales (Stratagene VCSM13 Helper Phage, No. Cat. 200251, Agilent Technologies, Inc. TX, EE.UU.), previamente diluidos a una concentración aproximada de 10^{-6} - 10^{-7} unidades formadoras de placa/mL (ufp/mL); se mezcló suavemente y se le agregó 3 mL de medio LB Top agar líquido (50°C aprox.); se mezcló nuevamente y se vertió sobre placas de LB Agar; se dejó incubando por 8-12 horas a 37 °C; se seleccionó una placa lítica y se agregó a un cultivo nuevo de *E. coli* XL1 Blue; se agregó kanamicina (70 μ g/mL) para seleccionar solo las células infectadas y se incubó a 12 horas. El cultivo fue centrifugado para precipitar y quitar las células. Se recuperó el sobrenadante con

los bacteriófagos y se incubó a 70°C para eliminar cualquier célula remanente. Enseguida se centrifugó para quitar los restos de partículas celulares. Para concentrar las partículas de fagos en el sobrenadante, se agregó 4 volúmenes de PEG 8000 5X para secuestrar el agua. Enseguida se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El paquete de fagos precipitados fue re-suspendido en solución amortiguadora TBS/BSA 1% y se almacenó protegido de la luz y a 4°C hasta su uso.

Para el cultivo de M13-scFv-CB se inició un cultivo de *E. coli* cepa XL1 Blue transformadas con el plásmido (pComb3x) con los genes del scFv-CB, en medio LB líquido, a 37°C. En el transcurso se fueron agregando distintos antibióticos para seleccionar solo células *E. coli* XL1 Blue (tetraciclina), que tengan el plásmido deseado (carbencilina) y que hayan sido infectadas por el fago Helper M13 (kanamicina), previamente agregado. Se dejó incubando por 8-12 horas y se centrifugó para quitar las células. Al sobrenadante con fagos se le agregó 4 volúmenes de PEG 5X para secuestrar las moléculas de agua y se centrifugó para precipitar los bacteriófagos. Se descartó el sobrenadante y los bacteriófagos fueron re-suspendidos en buffer TBS/BSA 1%. Se guardaron protegidos de la luz y a 4°C hasta su uso.

En ambos casos, la cuantificación de partículas de fagos se realizó en espectrofotómetro a una longitud de onda 269 y 320. Se utilizaron las siguientes ecuaciones para estimar el número de partículas de fago VCSM13Helper y M13-scFv-CB, respectivamente:

$$\text{Ec. 4-1: M13 Helper ufp/mL} = \frac{(\lambda_{269})(6 \times 10^{16})}{\# \text{ nucleótidos genoma}}$$

$$\text{Ec. 4-2: M13-scFv-CB ufp/mL} = \frac{(\lambda_{269} - \lambda_{320})(6 \times 10^{16})}{\# \text{ nucleótidos genoma}}$$

Donde:

ufp=Unidades Formadoras de Placas (Plate Forming Units, en inglés)

λ_{269} = absorbancia a 269 nm

nucleótidos genoma = número de nucleótidos del genoma del fago (vector + inserto)

(Genoma VCSM13 Helper = 6400 pb; genoma M13-scFv-CB = (4060 pb)

4.5.2.- Incubación de bacteriófagos en el campo

Se incubaron en el campo muestras de bacteriófagos (M13-scFv-CB), expuestos a la temperatura y radiación solar prevalentes en el campo experimental. Esto con el fin de evaluar los experimentos se llevaron a cabo entre julio y septiembre (2008), época en la que se registran las más altas temperaturas en el valle de Guadalupe. Los bacteriófagos se colocaron en viales de vidrio traslúcido (Fisherbrand Clear Glass Threaded Vials, No. 03-338C) a una distancia de 1 m sobre el nivel del suelo, en una caja plástica sin tapadera. La concentración utilizada fue de 5.2×10^{10} fagos/ μL , en 500 μL totales (2.6×10^{13} fagos totales). El tiempo de incubación fue variable: uno, cinco y diez días (Figura 4-5). Paralelamente se incubaron bacteriófagos bajo las mismas condiciones y periodos con la única variante de que se protegieron con aluminio para aislar de la radiación solar. Se realizaron dos controles positivos; en uno se incubaron bacteriófagos por el mismo periodo de tiempo a 4 °C; también se incubó solución

amortiguadora (TBS/BSA 1%), en la que están resuspendidos los bacteriófagos, en el campo. De cada tratamiento se realizaron tres réplicas.



Figura 4-5: Línea del tiempo para la incubación de bacteriófagos en el campo.

4.5.3.- Estimación de fagos activos

Para comparar la actividad biológica de los bacteriófagos, bajo los distintos tratamientos, se comparó el número de células infectadas que se producen al ser incubados con estos. Para medir la tasa de infectividad se utilizaron células de *E. coli* XL1 blue. Cada prueba se realizó por triplicado, el procedimiento se hizo de la siguiente manera, brevemente: se inició un cultivo de *E. coli* cepa XL1 Blue (células vírgenes) en medio LB líquido. Se realizaron alícuotas de 200 μ L y cada una por separado se mezcló con los diferentes tratamientos de bacteriófagos. Se les dio una agitación suave y se dejaron incubando 30 minutos a 37°C. La mezcla se sembró por el método de gota escurrida en fracciones de 25 μ L sobre medio sólido LB Agar + antibiótico, según corresponda (Cuadro 4-1)

Cuadro 4-1: Resumen de los distintos tratamientos aplicados a los bacteriófagos y el antibiótico utilizado en el medio selectivo.

Tratamiento	Antibiótico usado en el medio sólido
Fagos incubados en campo	Carbencilina + Tetraciclina
Fagos incubado en campo (protegido)	Carbencilina + Tetraciclina
Control (+) fagos incubados a 4°C	Carbencilina + Tetraciclina
Control (+) amortiguador TBS/BSA 1%	Carbencilina
Control (-) no fagos, solo amortiguador	Tetraciclina

4.6.- Aplicación de bacteriófagos en plantas enfermas en campo experimental

4.6.1.- Selección de plantas enfermas

Se buscó un predio donde hubiera muchas vides enfermas, para ello se llevó a cabo un muestreo intenso en distintos ranchos de la región. El muestreo se realizó en el mes de agosto de 2008, periodo en el que los síntomas son evidentes y los títulos de bacterias son mayores. En primer término se buscaron plantas que presentaran los síntomas de la enfermedad de Pierce: hojas con márgenes quemados, peciolo verde sin lámina, parches de tejido leñoso e inmaduro, necrosis y frutos anormales. De cada planta sintomática se tomaron 8 a 12 hojas y se metieron a una bolsa hermética (17.7 cm x 19.5 cm) en donde se anotó la información correspondiente (rancho, lote, surco y número de planta). Las muestras fueron transportadas al laboratorio en condiciones frescas y secas, alejadas de temperaturas extremas para evitar que el patógeno muriera. Una vez

en el laboratorio se separaron peciolo y lamina, los peciolo se utilizaron para el diagnóstico por cultivo de la bacteria en medio sólido (medio PD2) y las láminas para el diagnóstico por Ensayo por Inmuno-absorción ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), de acuerdo a las especificaciones del kit (Agdia, Inc., Elkhart, IN). Ambos protocolos se explican detalladamente en Anexos 2 y 3, respectivamente. Las plantas que dieron positivo, ya sea en uno o en dos de los diagnósticos, se seleccionaron para el experimento de aplicación de bacteriófagos.

Las plantas seleccionadas fueron marcadas con un listón de nailon, de un metro aproximadamente, amarrado en uno de los tallos laterales o en el tronco principal. Se utilizó el siguiente código de colores:

- Azul rey: planta muestreada
- Rosa: planta positiva a la enfermedad
- Naranja: planta tratada con bacteriófagos
- Amarillo: planta no tratada, control negativo

En cada listón se anotó con marcador permanente el código de la planta, refiriéndose al número de surco y número de planta dentro del surco.

4.6.2.- Producción de bacteriófagos VCSM13 Helper

Se escaló la producción del bacteriófago; el montaje del laboratorio y el proceso fue desarrollado por el biól. José Echánove Juan. A continuación se describe brevemente (Echánove y Stephano, 2009):

Se inició un cultivo de *E. coli* (XL1 Blue), con 30 mL de medio. Se incubó a 37°C por 12 horas hasta alcanzar la fase exponencial; después de agregar fago ayudador (VSCM13) se agregó kanamicina (40 µg/mL) para seleccionar las células infectadas; enseguida, el cultivo se escaló a un volumen de 300 mL bajo las mismas condiciones, hasta alcanzar la fase exponencial; después se escaló nuevamente a un volumen de 3 litros en un fermentador (BioFlo2000, No. Cat BF 2000, New Brunswick Scientific Co.) a una velocidad de 300 a 600 rpm por 1.5 horas; se purificó el sobrenadante, utilizando una columna de cromatografía de intercambio aniónico por Adsorción de Cama Expandida (EBA, por sus siglas en inglés, Upfront Technologies); después, los bacteriófagos fueron pasados a un sistema de ultrafiltración (QuixStand, No Cat QSM-03SP, Amersham General Electric) para filtrar y concentrar, que además permitió eliminar las sales provenientes del medio.

4.6.3.- Aplicación de bacteriófagos por inyección y difusión

Se seleccionaron al azar 40 plantas para ser tratadas con bacteriófagos, de las 104 plantas marcadas para el experimento. El uso de los sistemas para la aplicación de bacteriófagos fue de la siguiente manera: 31 plantas se trataron con el dispositivo XyllaKill, 1 con la pistola QUIKjet, 1 con el sistema Tree IV y 6 en combinación entre el sistema Tree IV con el dispositivo XyllaKill.

Para la aplicación de bacteriófagos se usaron entre uno y cinco dispositivos xyllakill o válvulas arborplug, por cada árbol, según el grosor del tronco, tal como

se aborda en la sección 5.2; además se buscó un sitio estratégico (dirigido a sitios potencialmente enfermos y alejado de heridas).

La aplicación se realizó entre los meses de julio y noviembre de 2009. Aunque no son los meses más recomendados, de acuerdo a la sección 5.3 (Figura 5.16), se retrasó debido a problemas técnicos con el equipo. Sin embargo, el experimento se llevó a cabo sin mayor contratiempo.

La aplicación con cualquiera de los tres sistemas se realizó de acuerdo a lo explicado en la sección 4.2.4.

4.6.4.- Comparación cualitativa

Se realizaron tres visitas para observación y registro cualitativo de las plantas; los parámetros a evaluar fueron los siguientes: brotación y desarrollo (marzo 2010); cuantificación de racimos por planta y desarrollo del fruto (junio 2010); por último, se cuantificó el peso de producción de fruto en cada planta (agosto 2010). En algunas plantas no se pudo pesar la cantidad de fruto debido a que estaba muy inmaduro y no se cosechó.

Según el grado de madurez y desarrollo (en hojas y fruto) se asignó un valor preciso, de acuerdo a Hellman (2003).

Asimismo se evaluó la tasa de mortandad (dentro del periodo en que se realizaron los experimentos) en ambos grupos de plantas.

4.6.5.- Muestreo Post-aplicación

El muestreo post-aplicación se llevó a cabo entre los meses de julio y agosto de 2010. Es decir, al año siguiente de haber aplicado los bacteriófagos. Se tomó muestra de peciolo para el análisis por cultivo en medio sólido y láminas para el análisis por ELISA. Los resultados del cultivo en PD2 se tuvieron varios días después (entre 7 y 10 días) debido al lento crecimiento de *X. fastidiosa*. El criterio para considerar una muestra positiva con el método de ELISA, fue siempre que la lectura de absorbancia ($\lambda=405$ nm) fuese el doble de la media (X) más tres veces la desviación estándar (ds) de los controles negativos ($2X + 3ds$) (McGaha *et al.* 2007), a esta línea divisoria entre los datos negativos y los positivos se le llamó *línea discriminatoria (cut-off, en inglés)*.

4.7.- Análisis estadístico

Para el procesamiento y análisis de información se utilizó el programa Minitab (Minitab 15.1.30.0., 2007 Minitab Inc) y Microsoft Excel 2010. Las pruebas utilizadas fueron las siguientes:

- Para observar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Ryan-Joiner (similar a Shapiro-Wilk).
- Para comparar indicadores (UFC y lecturas de ELISA) antes y después del tratamiento se utilizó la prueba t-pareada (datos paramétricos) y la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (datos no paramétricos).
- Para comparar indicadores (grado de desarrollo, cantidad de fruto) en dos poblaciones diferentes (tratadas y no tratadas) se utilizó la prueba de Mann-Whitney (para datos no paramétricos).
- Para comparar los parámetros (volumen administrado y porcentaje de área pintada) medidos con los 4 sistemas se aplicó ANOVA de una vía (para datos paramétricos) y la prueba de Kruskal-Wallis (para datos no paramétricos); enseguida se utilizó la prueba de Tukey (Tukey-Kramer sí las muestras son de tamaño desigual) para encontrar diferencias individuales entre las medias de cada población.
- Para evaluar la actividad biológica de los fagos bajo dos variables (radiación UV y tiempo de incubación) se aplicó ANOVA de dos vías.

En todos los casos el índice de confianza fue de 95%.

5.0.- Resultados

5.1.- Comparación entre distintos sistemas para aplicar tratamientos a plantas

5.1.1.- Dispositivo XyllaKill.

Se elaboró un dispositivo para aplicar bacteriófagos al tronco de las plantas de uva. Para su desarrollo se trabajó en 3 etapas.

En la primera etapa el objetivo fue evaluar la posibilidad de utilizar un sistema alternativo a los comerciales y de diseño propio. Fue así que surgió la idea de conectar un reservorio a la planta, a manera de infusión de suero. Para su elaboración se utilizó material de laboratorio como una columna de purificación, una jeringa de insulina (1 mL) y sellador de plantas para sostenerlo al tronco (Figura 5-1). Su utilización fue efímera pero sirvió para demostrar que era posible aplicar un tratamiento directamente al xilema por difusión pasiva solamente (Sección 5-2, Figura 5-16).



Figura 5-1: Primer prototipo del dispositivo XyllaKill conectado a una planta de uva.

Los objetivos de la segunda etapa fue mejorar el prototipo anterior a través de modificaciones continuas y realizar pruebas para ver la funcionalidad de este sistema comparado con los otros sistemas comerciales. Para su construcción se utilizó como reservorio tubos de polipropileno de fondo cónico de 50 mL, se siguió utilizando jeringas de insulina (1 mL) y se le adicionó la válvula arborplug para sustituir el uso del sellador de plantas, aprovechando la compatibilidad entre la válvula arborplug y la boca de la jeringa de insulina de 1 mL (Figura 5-2). Esta válvula arborplug incluye un sello de silicón para evitar fugas al inyectar; este se retiró para dejar el libre flujo del tratamiento.



Figura 5-2: Compatibilidad entre la boca de la jeringa y la válvula arborplug.

Una de las principales modificaciones fue la reducción del tubo conector (jeringa). Se hizo más corto y se eliminó el ángulo recto que incluía las primeras versiones de este segundo prototipo (Figura 5-3), esto le dio mayor resistencia al tubo conector además que el centro de masa del dispositivo quedó más cerca del tronco y esto le dio más firmeza al instalarse. Finalmente quedó un prototipo como el de la figura 5-3b.

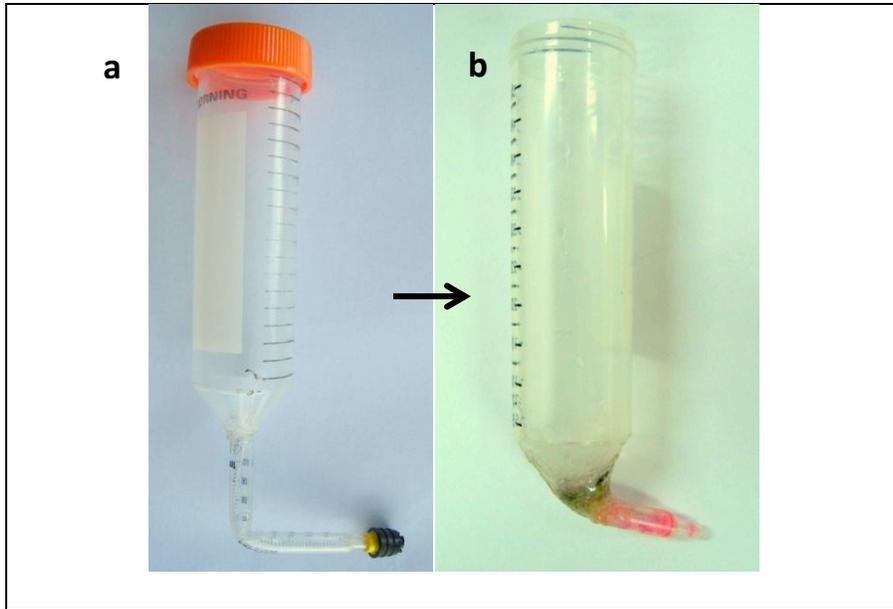


Figura 5-3: Principales modificaciones en el prototipo de la segunda etapa

Se intentó agregar un tapón de hule para meter aire a presión y así acelerar la entrada de la solución, sin embargo la falta de hermetismo en el dispositivo hizo esto difícil (Figura 5-4).



Figura 5-4: Dispositivo XyllaKill con válvula de hule para agregar presión.

Otra modificación se hizo en la válvula arborplug: se cortó a la mitad de manera transversal. Esto para aumentar la superficie de contacto entre el xilema y la solución administrada (Figura 5-5).

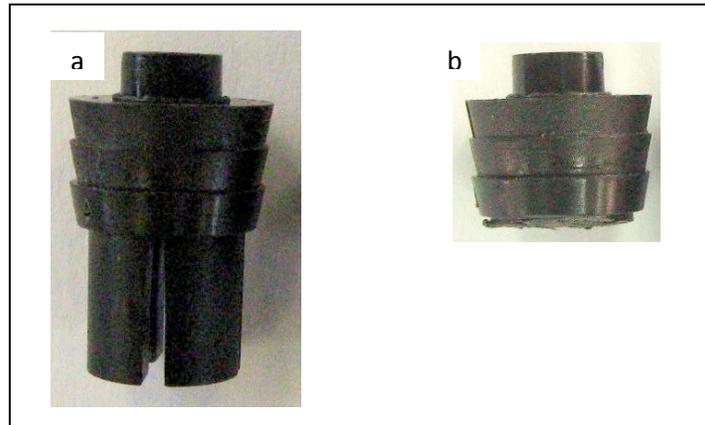


Figura 5-5: Válvula arborplug completa (a) y cortada a la mitad (b).

Los resultados de las pruebas hechas con este prototipo se describen en las secciones: 5.1.2; 5.1.3; y 5.2.

El objetivo en la tercer etapa fue el de producir un dispositivo, construido con molde y materiales adecuados, ya no en laboratorio. Para ello se contactó a la compañía manufacturera Ajosia S.A. de C.V. y se les dio una muestra de nuestro último prototipo. Se produjeron unas muestras preliminares que se probaron en el campo. El dispositivo producido en esta etapa siguió sufriendo algunas modificaciones con base en la experiencia de los empresarios y en nuestras observaciones y pruebas.

Básicamente se redujo el tamaño del reservorio; se le agregó un tapón de hule (Voigt Global Distribution, Inc. No. Cat 224100-093) en la parte inferior para agregar la solución de tratamiento; en la boca que se introduce en la planta se le dio forma decreciente hacia la punta (Figura 5-6), esto permite penetrar

firmemente en el tronco y así eliminar el uso de la válvula arborplug; además el cuerpo del gotero se construyó de una sola pieza. El material con que se construyó es de un fotopolímero color naranja que protege contra la radiación UV y es resistente al medio ambiente (comentario personal del empresario)

Se produjeron 25 dispositivos que fueron utilizados en los experimentos en el campo.



Figura 5-6: Prototipo final del dispositivo XyllaKill. Obsérvese la boca en forma decreciente, esto permitió eliminar el uso de la válvula arborplug.

5.1.2.- Volumen aplicado con cada sistema.

Se observó que los sistemas comerciales Quikjet y pistola hidráulica Viper administran poco volumen respecto a los sistemas Tree IV y dispositivo XyllaKill (Cuadro 5-2 y 5-3). El volumen inyectado con Quikjet y pistola Viper fue similar: entre 2.5 y 4.6 mL, cuando se hace una inyección por planta; y, entre 10.75 y 15 mL cuando se hacen cuatro inyecciones por planta. Los sistemas Tree IV y

XyllaKill, por su parte, administran más volumen que los anteriores. Con el dispositivo XyllaKill, haciendo una aplicación por planta se administró hasta 30 mL; no se inyectó con el Tree IV a través de una sola inyección por planta debido a que el sistema funciona con cuatro agujas simultáneas. Haciendo cuatro aplicaciones por planta con dispositivo XyllaKill y Tree IV se inyectó hasta 170 ml. No se encontraron diferencias significativas entre el sistema Tree IV y el dispositivo XyllaKill, con y sin válvula arborplug (prueba de Tukey-Kramer). Los volúmenes administrados con cada sistema a través de una aplicación por planta y cuatro aplicaciones por planta se muestran en las figuras 5-7 y 5-8, respectivamente.

Cuadro 5-2: Parámetros estadísticos para los volúmenes inyectados (mL) con cada sistema haciendo una aplicación por planta.

	Vol. mínimo	Vol. promedio	Vol. máximo	Desv. Std.	n
QUIKjet	2.5	3.6	5.6	1.38	7
P.H. Viper	3	4.66	7	1.69	3
Tree IV	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
XyllaKill s/A	10	16.98	25	6.79	4
XyllaKill c/A	9.4	20	31.6	9.89	3

n/d: no disponible

s/a: sin válvula arborplug

c/a: con válvula arborplug

Cuadro 5-3: Parámetros estadísticos para los volúmenes inyectados (mL) con cada sistema, haciendo cuatro aplicaciones por planta.

	Vol. mínimo	Vol. promedio	Vol. máximo	Desv. Std.	n
QUIKjet	10.75	10.91	11	0.117	3
P.H. Viper	11	15	18	2.9	3
Tree IV	150	160.6	170	8.21	3
XyllaKill s/A	54	93.5	169	44.5	4
XyllaKill c/A	90	112.91	156	30.48	3

n/d: no disponible

s/a: sin válvula arborplug

c/a: con válvula arborplug

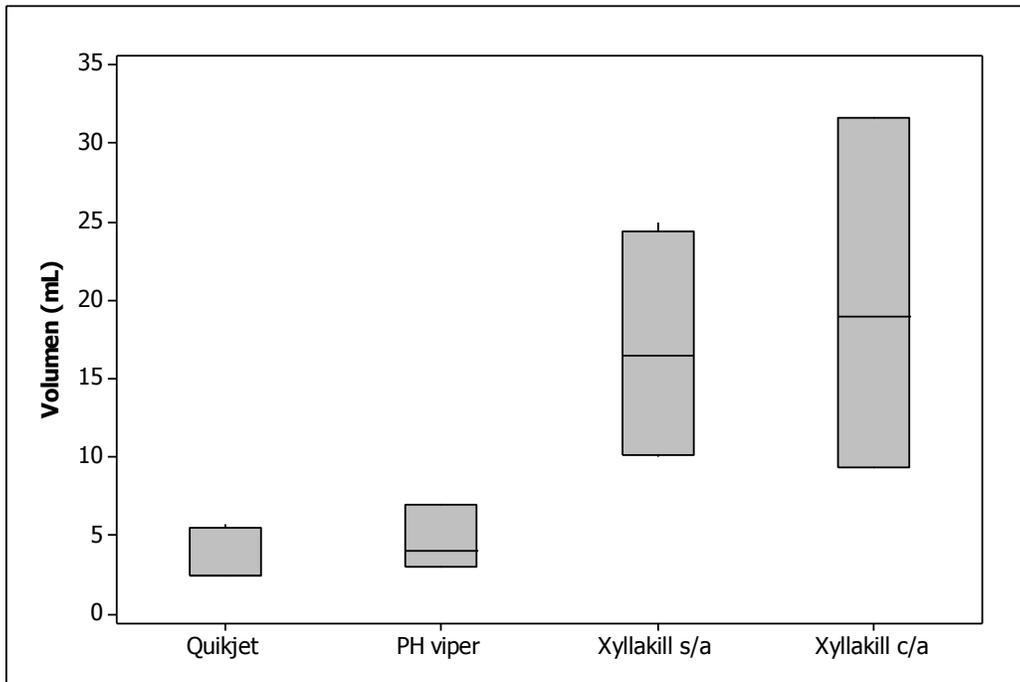


Figura 5.7.- Comparación entre los distintos sistemas de acuerdo al volumen administrado con una aplicación por planta (s/a= sin válvula arborplug, c/a= con válvula arborplug).

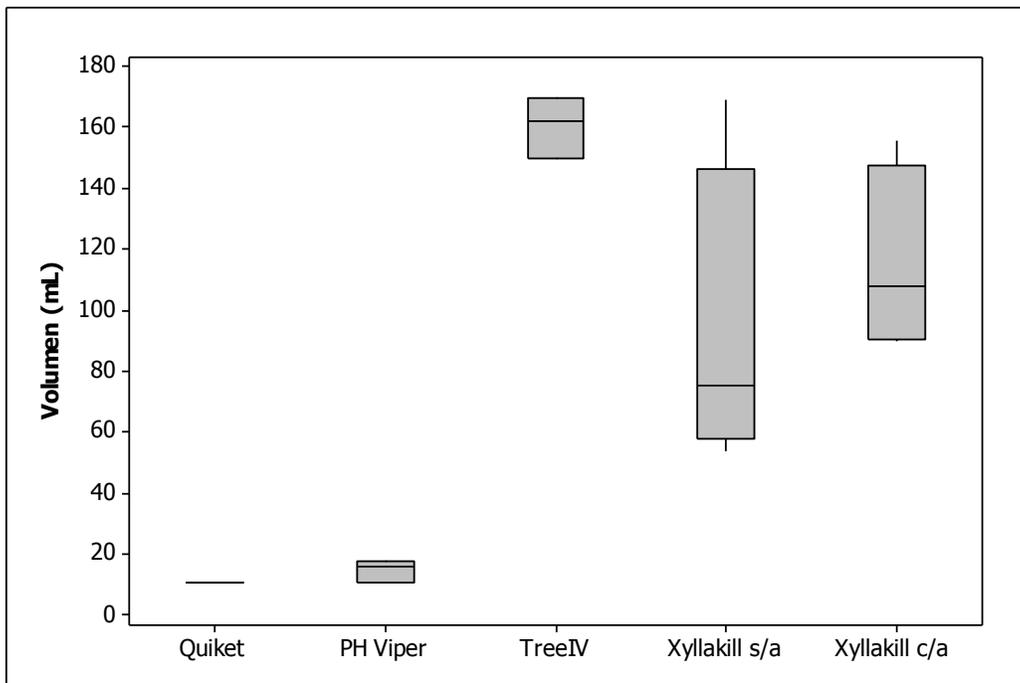


Figura 5.8.- Comparación entre los distintos sistemas de acuerdo al volumen administrado con cuatro aplicaciones por planta (s/a= sin válvula arborplug, c/a= con válvula arborplug).

5.1.3.- Área teñida del xilema con cada sistema

De los cuatro sistemas, el dispositivo de difusión XyllaKill fue el que más área marcó en el xilema, a este le siguieron los otros dos sistemas comerciales (Quikjet y Tree IV), muy similares entre sí (Cuadro 5-4, Figuras 5-9 y 5-10). Con el sistema XyllaKill se logró marcar 10.7% con un solo dispositivo por planta conectado y 40.77% cuando se conectaron cuatro dispositivos por planta. Con el sistema Tree IV se logró marcar una superficie de 14.61% de xilema al hacer 4 aplicaciones por planta. No se utilizó el Tree IV con “una aplicación por planta” ya que el sistema funciona con cuatro agujas simultáneas. Al utilizar el sistema QUIKjet se marcó un área de 5.5% cuando se hizo una inyección por planta y 18.87% cuando se hicieron cuatro inyecciones por planta. Así mismo se comparó el uso del dispositivo XyllaKill con la válvula arborplug y sin ésta; no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey-Kramer) y la ventaja es grande al utilizarla. En la Figura 5.11 se observan los cortes y la proporción pintada con cada sistema.

En estas pruebas no se incluyó a la pistola hidráulica Viper, dado que se había observado un desempeño similar al Quikjet y, como se explicó anteriormente (Sección 4.3.1), se trató de cortar el mínimo de plantas.

Cuadro 5-4: Porcentaje de xilema marcado con cada uno de los sistemas de inyección.

Sistema utilizado	1 aplicación p/planta	4 aplicaciones p/planta
QUIKjet	5.5 %	18.87 %
Tree IV	n/d	14.61 %
XyllaKill directo	10.7 %	40.77 %
XyllaKill c/ arborplug	10.55 %	37.36 %

n/d: no disponible, no se hizo por cuestiones técnicas.

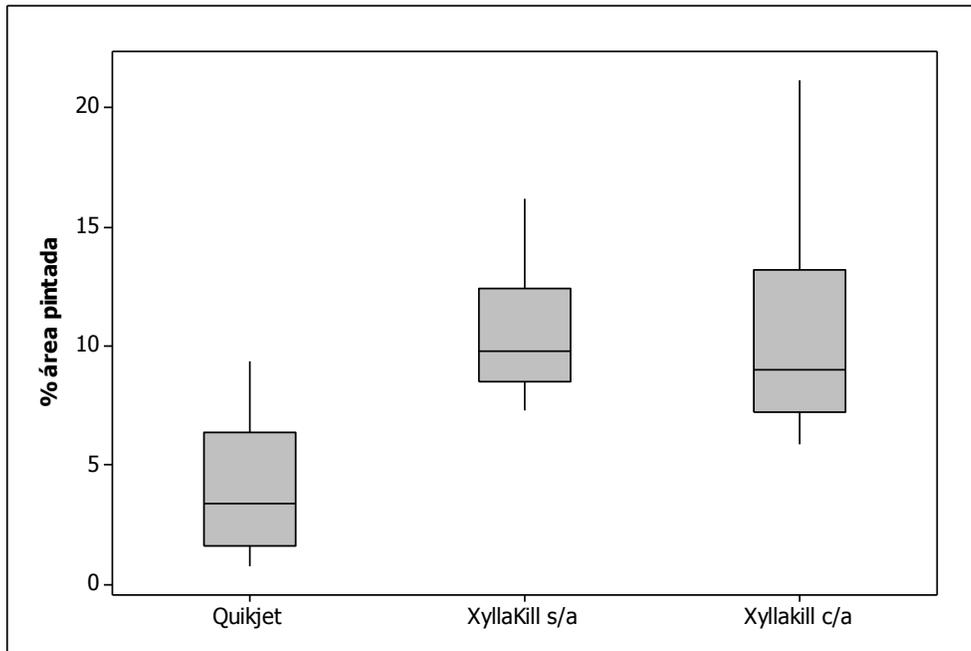


Figura 5-9.- Comparación del porcentaje de área pintada en el xilema con cada uno de los sistemas haciendo una aplicación por planta (s/a= sin válvula arborplug; c/a= con válvula arborplug).

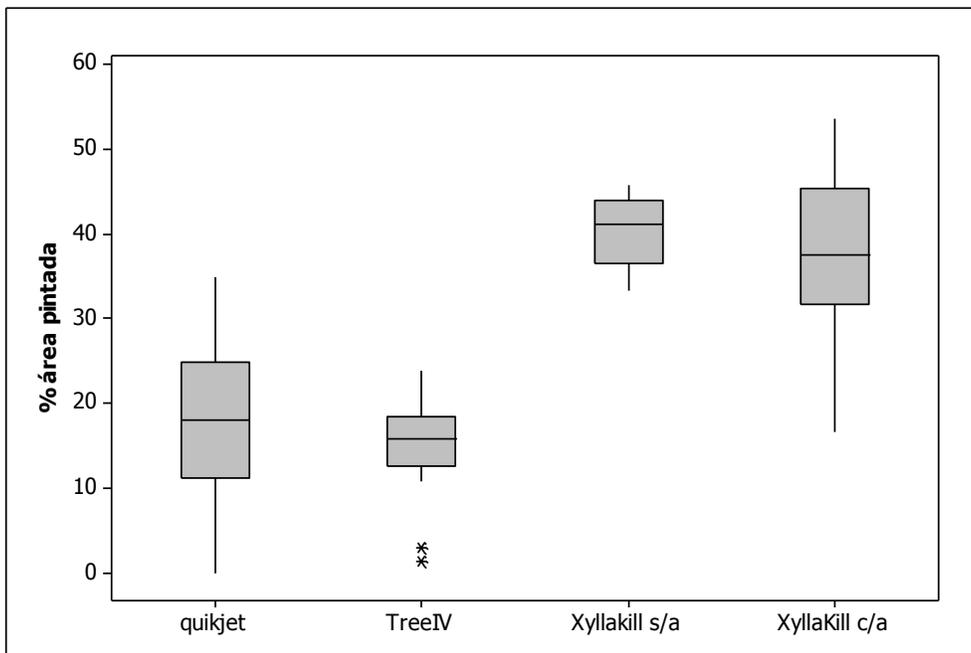


Figura 5-10.- Comparación del porcentaje de área pintada en el xilema con cada uno de los sistemas haciendo cuatro aplicaciones por planta (s/a= sin válvula arborplug; c/a= con válvula arborplug).



a) Sistema QUIKjet, 1 válvula arborplug



b) Sistema QUIKjet, 4 válvulas arborplug

(Espacio en blanco)



c) Sistema Tree IV, 4 válvulas arborplug



d) Sistema XyllaKill, 1 dispositivo



e) Sistema XyllaKill, 4 dispositivos

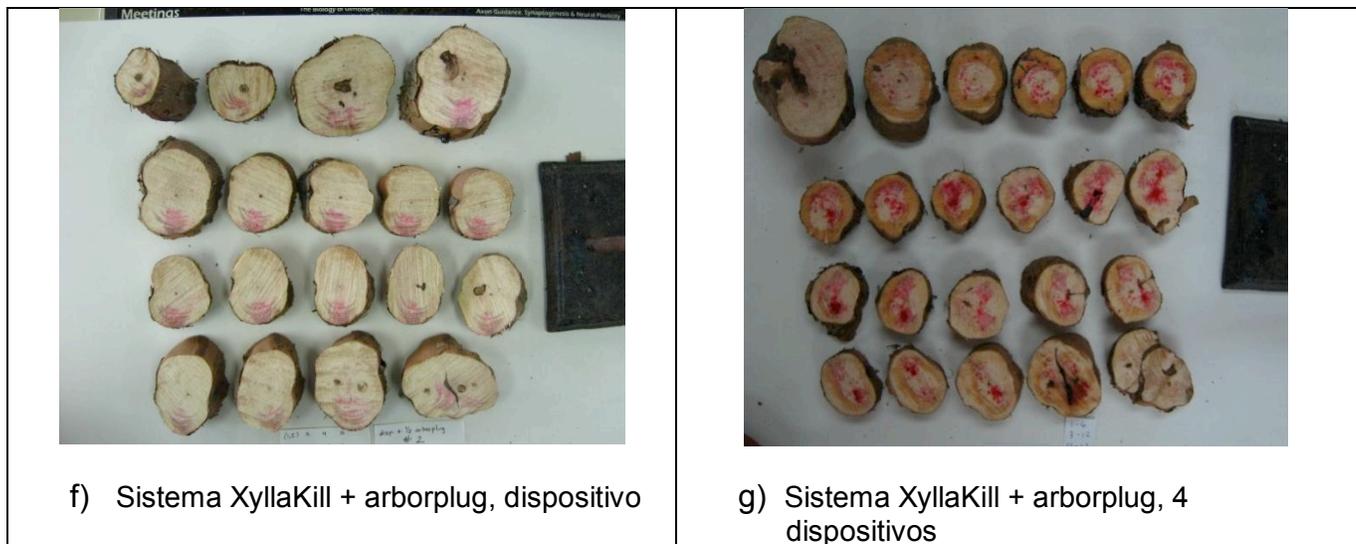


Figura 5-11: Movimiento y tinción del xilema con cada uno de los sistemas y variando el número de aplicaciones por planta.

5.1.4. Distancia recorrida

Con el sistema QUIKjet la pintura recorrió menos distancia respecto a los sistemas Tree IV y dispositivo XyllaKill, en estos últimos la pintura marcó brotes y peciolos. Con el sistema Quikjet, haciendo una y cuatro aplicaciones por planta, la pintura recorrió una distancia de 62 cm y 56 cm, respectivamente, enseguida la pintura se va perdiendo paulatinamente en los vasos conductores del tronco. Con el sistema Tree IV, realizando cuatro aplicaciones por planta, la pintura recorrió toda la trayectoria correspondiente al tronco principal y alcanzó a penetrar en los vasos de algunos brotes e incluso algunos peciolos. Con el dispositivo XyllaKill, conectado directamente al tronco, la pintura recorrió un patrón similar al Tree IV, la pintura penetró hasta los brotes y algunos peciolos. Al conectar el dispositivo XyllaKill a través del arborplug (una y cuatro aplicaciones por planta) la pintura

recorrió gran parte del tronco, incluso llegó a penetrar en ambos tallos laterales pero ya no penetró en los brotes, figuras 5-12 a 5-14.

En todos los casos se observó que la pintura también se mueve por el xilema en dirección basipétala respecto al punto de inyección, no solo en dirección acropétala. Esto concuerda con resultados obtenidos en invernadero (ver Sección 5.2). Sin embargo, no se obtuvieron muestras de secciones muy por debajo del punto de inyección ni de raíz.

A continuación se muestran algunas imágenes en las que se observa la pintura penetrando en los brotes. En la figura 5-12 los cortes pertenecen a la planta que se inyectó con el Tree IV. Nótese los peciolos con pintura en el xilema (5-12c y 5-12f). En la imagen 5-13 se muestran cortes de brotes pertenecientes a la planta tratada con el dispositivo XyllaKill. En 5-13b se observa la pintura moviéndose por el brote principal y un peciolo. En 5-13c y 5-13f, la pintura moviéndose por los peciolos. En la imagen 5-14 se muestran plantas controles en las que no se administró pintura, obsérvense cortes de brotes y peciolos sin rastro de colorante.

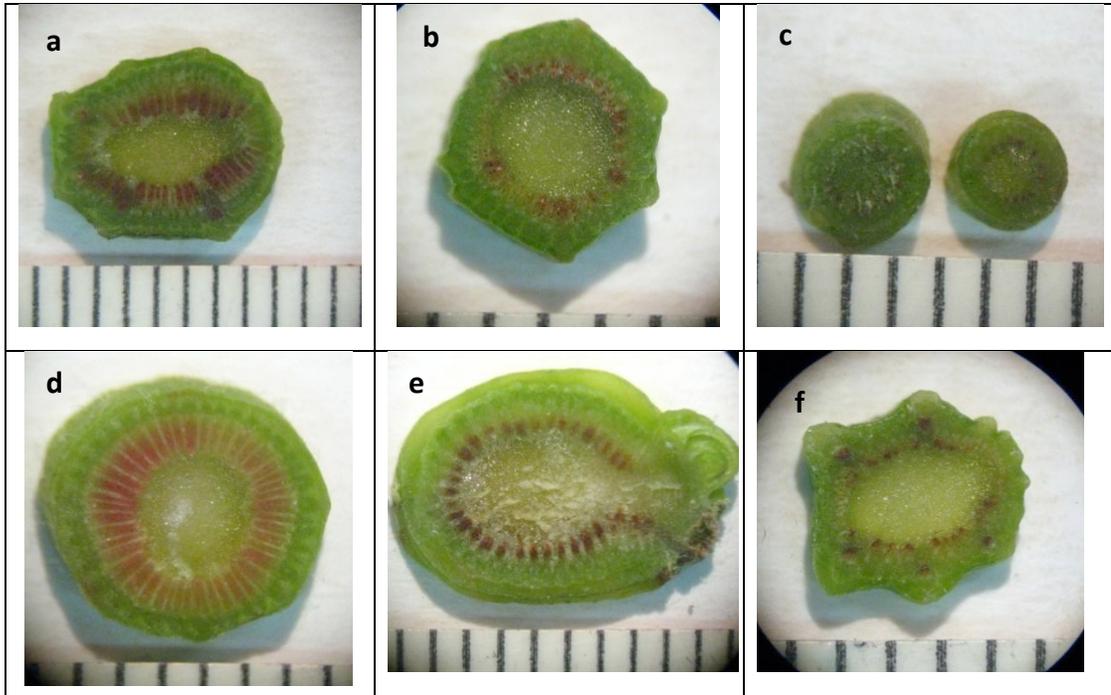


Figura 5-12: Cortes transversales de tallos de planta inyectada con pintura vegetal con el sistema Tree IV. Figuras (a), (b), (d) y (e) pertenecen a la porción del tallo; en (c) y (f) se observa cortes de peciolo.

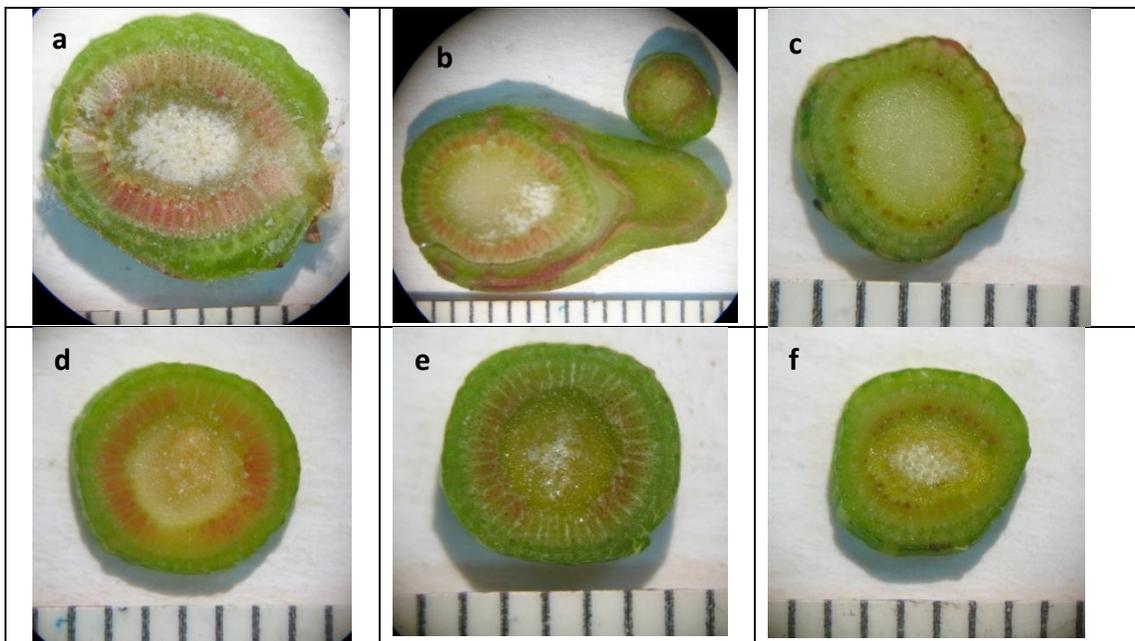


Figura 5-13: Cortes de brotes de planta inyectada con 4 dispositivos XyllaKill. Figuras (a), (b), (d) y (e) pertenecen a la porción del tallo; en (b), (c) y (f) se observa cortes de peciolo.

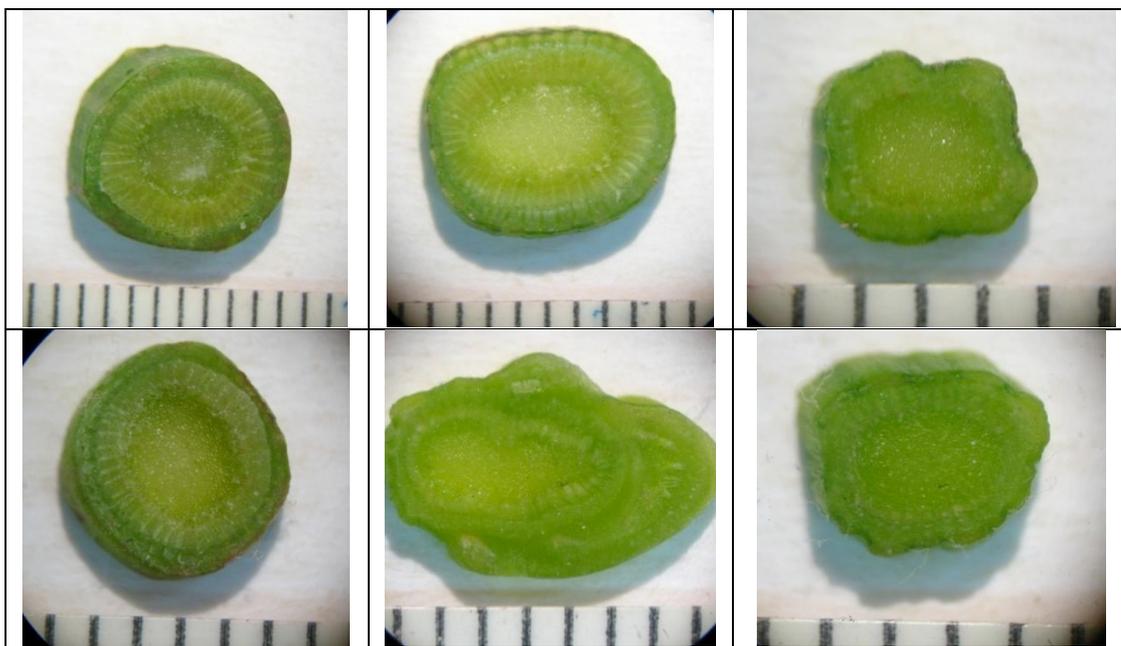


Figura 5-14: Cortes de brotes, planta control sin inyectar. Figuras (a), (b), (d) y (e) pertenecen a la porción del tallo; en (c) y (f) se observa cortes de peciolo.

5.1.5.- Otros aspectos a considerar: técnicos y económicos

Además de los aspectos mencionados anteriormente, existen otros cualitativos que son de importancia al momento de elegir un sistema:

- En cuestión de instalación los cuatro sistemas son prácticos en su instalación. El dispositivo XyllaKill requiere menos tiempo debido a que se conecta directamente sin necesidad de la válvula arborplug (considerando la última versión del dispositivo; Figura 5-6). Además del tiempo necesario, la instalación de la válvula arborplug requiere una herramienta especial – Aplicador o set-tool en inglés – no así con el dispositivo XyllaKill.

- El tiempo de dosificación es importante cuando se trata de sustancias que pueden desnaturalizarse o inactivarse por acción de la radiación solar. Además, de manera indirecta, permite saber cuándo hay vasos del xilema tapados o la presión positiva en el tallo es alta. Los sistemas QUIKjet y Viper ofrecen esta ventaja, ambos inyectan directa y rápidamente la solución dentro de la planta, en cuestión de segundos. Con el Tree IV el tratamiento tarda más tiempo en entrar (horas o días) a pesar de que se agrega aire a presión para acelerar la dosificación. Con el dispositivo XyllaKill la penetración de la solución es aún más lenta ya que no hay ninguna presión que ayude; la entrada de la solución se ayuda únicamente de la presión generada en la columna de solución a causa de la gravedad y por la capilaridad en los vasos del xilema.
- El tiempo de dosificación se relaciona directamente con el mecanismo de penetración. Los dos primeros sistemas (QUIKjet y Viper) dosifican el tratamiento por micro-inyección y los otros dos sistemas (Tree IV y Xyllakill) lo hacen a través de macro-infusión. La principal diferencia entre ambos tipos de penetración es la cantidad de volumen aplicado y la distribución del tratamiento dentro de la planta.
- Ninguno de los cuatro sistemas es propenso a fugas. Los tres sistemas comerciales de Arborjet tienen una válvula arborplug que funciona a su vez como válvula y permite únicamente el ingreso de la disolución. El dispositivo XyllaKill se fue mejorando hasta eliminar este problema presente en los primeros prototipos. La última versión del dispositivo (figura 5-6) incluye una boquilla decreciente que se encaja perfectamente en el tronco y evita que haya fugas o se caiga del tronco. Sin embargo, si puede haber fugas si el dispositivo XyllaKill se utiliza en momentos en que la presión

positiva del xilema es alta; la savia fluyó de la planta hacia el dispositivo hasta llenarlo por completo y se salió por la tapa superior (no hermética) o incluso por el agujero de inserción en el tronco.

- Los cuatro sistemas son reutilizables, a diferencia de otros métodos comerciales no utilizados en este trabajo. Sin embargo, cada uno de los sistemas tiene un tiempo de vida inherente al material de fabricación (es el caso del dispositivo XyllaKill) o algunas piezas que necesiten remplazarse como válvulas, resortes, mangueras, etc (sistemas Arborjet).
- En cuestión de costo, el sistema XyllaKill es 14 veces más barato que el QUIKjet y 24 veces más barato que el Tree IV. La pistola hidráulica Viper es el sistema más costoso de los cuatro, siendo hasta 116 veces mayor el precio respecto al sistema XyllaKill y entre cuatro y ocho veces más costoso que los otros sistemas de Arborjet, Tree IV y QUIKjet respectivamente.

En el cuadro 5-5 se enumeran brevemente las características descritas anteriormente:

Cuadro 5-5: Resumen de aspectos técnicos y económicos de los diferentes sistemas.

Sistema	Instalación	Tiempo de dosificación¹	Mecanismo de penetración	Costo del sistema²
QUIKjet	≈10 min	Instantánea (minutos)	Micro-inyección	\$359.00
Viper	≈10 min	Instantánea (minutos)	Micro-inyección	\$2,900.00
Tree IV	≈10 min	Pasiva (horas-días)	Macro-infusión	\$599.00
XyllaKill	≈5 min	Pasiva (>1 día)	Macro-infusión	\$25.00

¹=tiempo que tarda en entrar la solución

²= Dólares Norteamericanos

5.2.- Arreglo espacial de las aplicaciones

En los experimentos previos en invernadero se observó que la pintura vegetal solamente se mueve en sentido longitudinal por los vasos en los que penetra y que, al inyectarse determinado sitio, se mueve hacia arriba y abajo. Este patrón se observó también en las plantas adultas. En plantas de invernadero, al introducirse pintura vegetal a través de la raíz se vio que únicamente se marcaban los vasos por los que entró la pintura (Figura 5-15). Asimismo, al aplicarse pintura vegetal sobre el tallo – se puso una gota sobre el tronco y se pinchó con una aguja, el líquido entró por capilaridad – se observó que la pintura se movió 3.1 cm hacia arriba y 3.6 cm hacia abajo en una planta y 4.0 y 4.2 cm en otra planta (datos no mostrados). Estos mismos resultados se vieron al administrarse la pintura con dispositivo en el tronco de una planta adulta, la pintura se movió solamente por los vasos en los que se conectó el dispositivo. También se observó que recorrió 60 cm hacia arriba y 70 cm hacia abajo (Figura 5-16). En las plantas inyectadas en el campo experimental se observó este mismo fenómeno, como se explicó en la Sección 5.1.4. Sin embargo, no se registró la distancia hacia abajo pues estaban las raíces inmediatamente.

Observaciones hechas en las plantas de campo se demostró el daño mecánico que causa el colocar 2 o más sistemas sobre una misma línea de vasos del xilema. En 2001 algunos técnicos de la vinícola aplicaron Oxitetraciclina (Ing. E. Flores, comentario personal) en un sistema con forma de tornillo. Algunas de las plantas tratadas se agrietaron o, inclusive, murieron a causa de colocar varios tornillos continuos longitudinalmente (Figura 5-17). Esto mismo podría suceder si

se hacen varias aplicaciones a la misma altura sobre el tronco al formarse un anillo de discontinuidad entre los vasos del xilema, el transporte de agua se interrumpe parcial o totalmente.

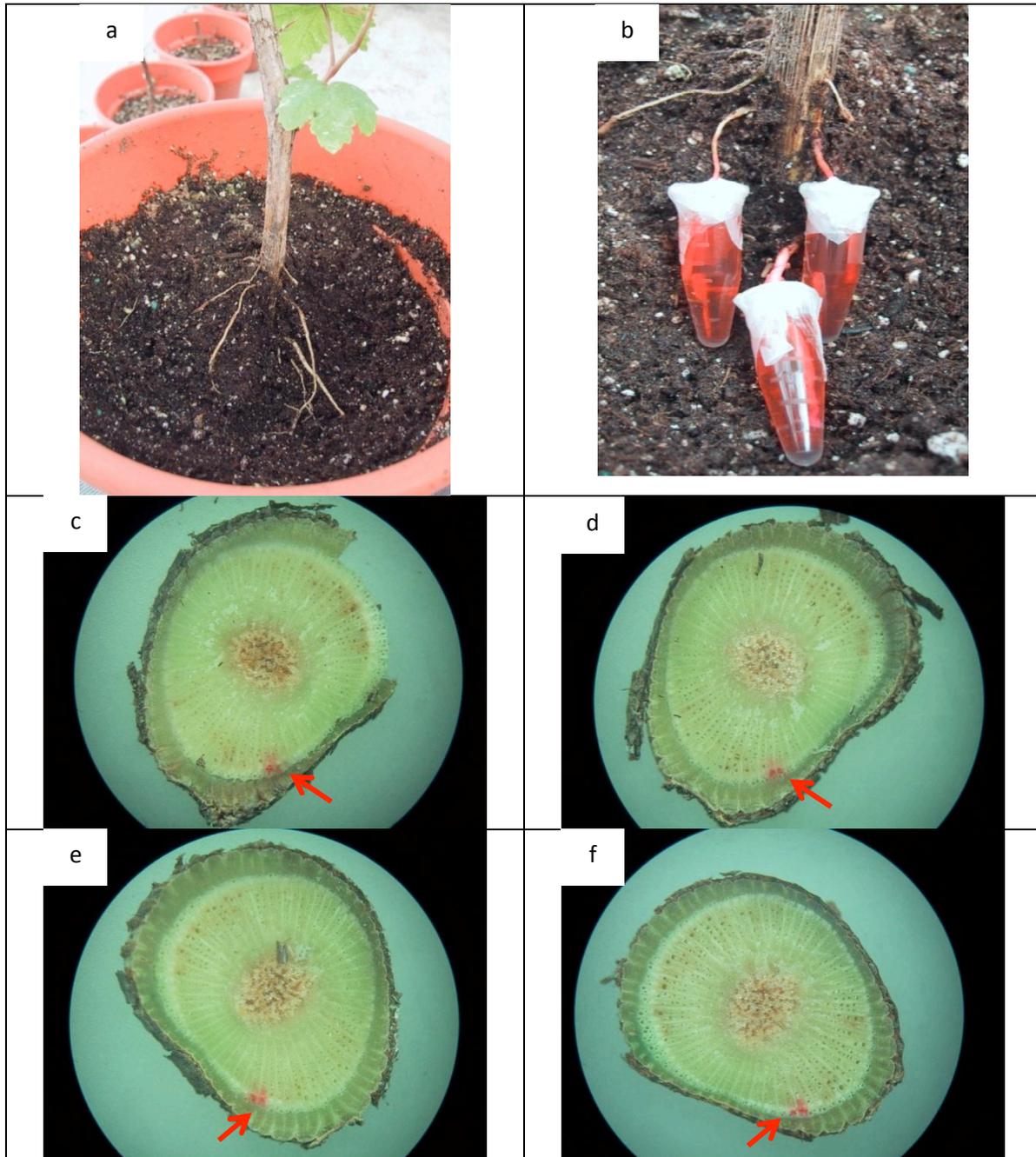


Figura 5-15: Solución de pintura vegetal (flecha) en los vasos del xilema a diferentes alturas del tallo, introducida por la raíz, en una planta pequeña. (a)Planta de vid en invernadero, se muestran las raíces de fuera. (b) Acercamiento de las raíces, sumergidas en solución de pintura vegetal. (c – f) Cortes transversales de tallo a diferentes alturas, observe que la pintura solo se mueve por ciertos vasos del xilema.

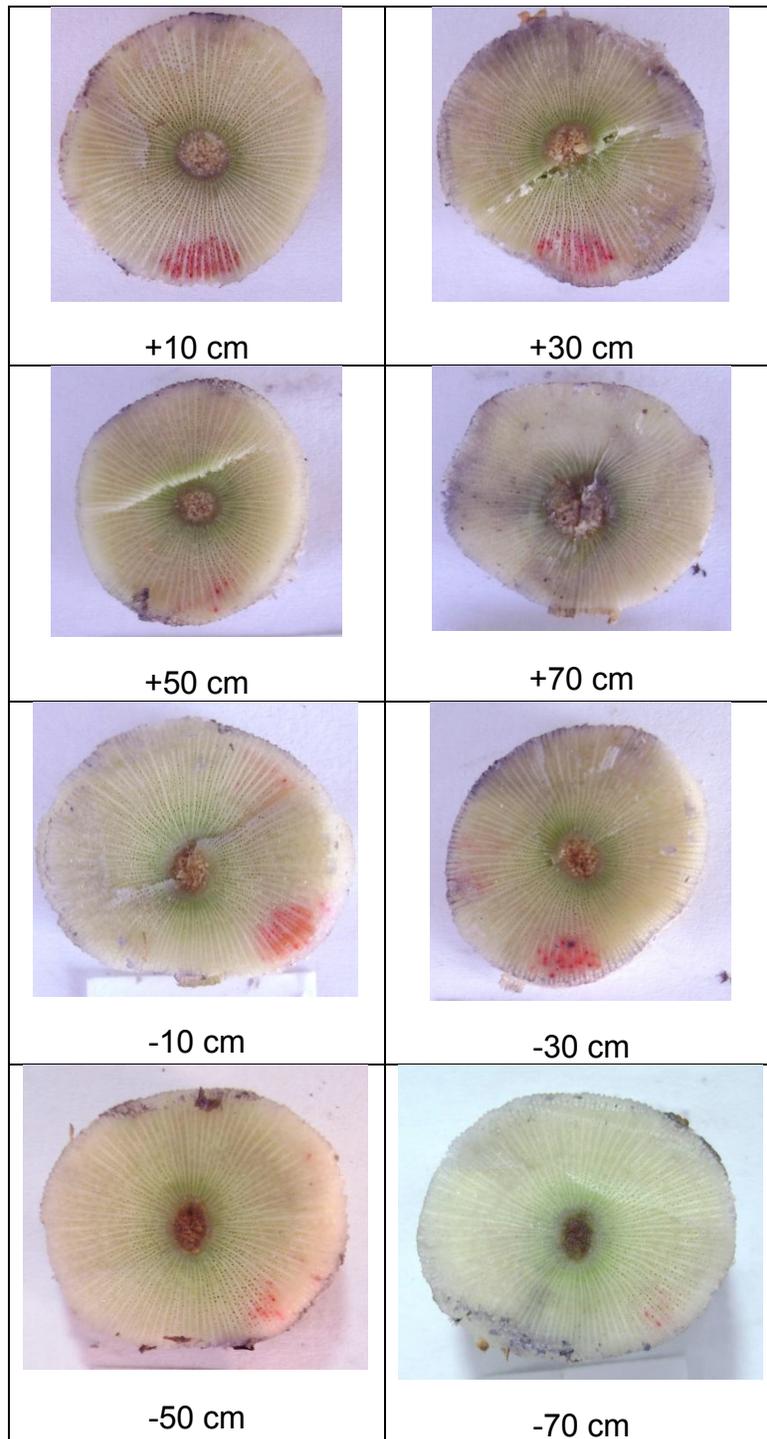


Figura 5-16: Cortes transversales del tallo de una planta adulta. Se muestra como la pintura vegetal solo se mueve en igual proporción hacia arriba y abajo a partir del punto de aplicación. Se utilizó el prototipo de la primera etapa como se menciona en la sección 5.1.1.



Figura 5-17: Planta con daño mecánico por mala aplicación de tratamiento.

5.3.- Periodo de aplicación

Al utilizar el sistema QUIKjet se pudo inyectar durante todo el año en plantas de vid. Sin embargo, el volumen inyectado no siempre fue el mismo. En los primeros 3 meses del año se sentía una gran presión positiva en el interior de la planta que no permitía inyectar con tanta facilidad. Incluso, en la mayoría de los casos hubo secreción de savia a través de cualquier herida o agujero (Figura 5-18). En estos primeros meses el rango fue de 1.5 a 3.5 mL inyectados. Algunas veces fue imposible inyectar debido a dicha presión positiva. Los mayores volúmenes se inyectaron durante la temporada de mayo a julio, entre 2.5 y 4.4 mL. Después de julio el volumen que se puede inyectar comienza a decrecer gradualmente. Solamente en octubre y parte de noviembre se observó nuevamente un ligero incremento en el volumen inyectado, 3.2 a 3.5 mL en promedio. Este incremento coincide con la segunda época de rebrote que ocurre en las plantas, previo al letargo (Ing. E. Flores, comentario personal). En la figura 5-19 se observa claramente el patrón arriba descrito.

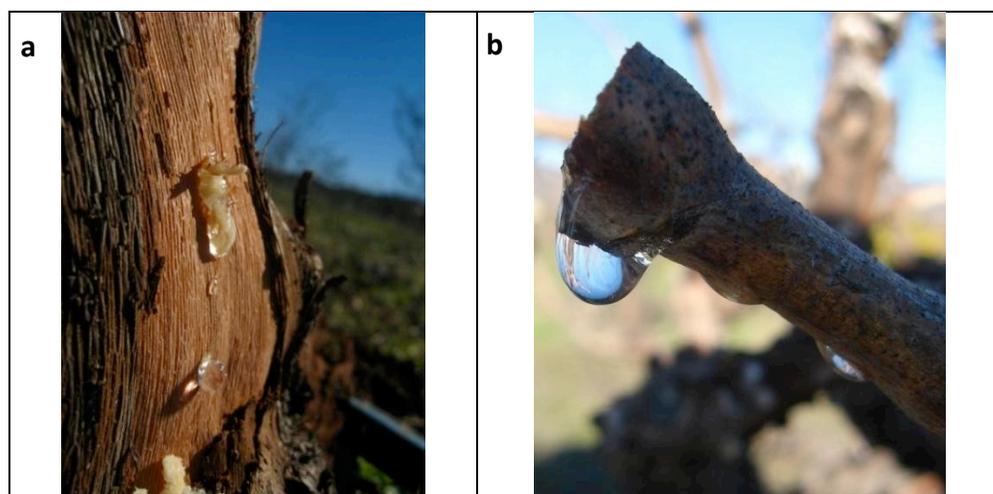


Figura 5-18: Secreción de savia durante los primeros meses del año, previo a la brotación. En (a) secreción a través de un agujero que se hizo para colocar una válvula arborplug. En (b), secreción al momento de podar los brotes.

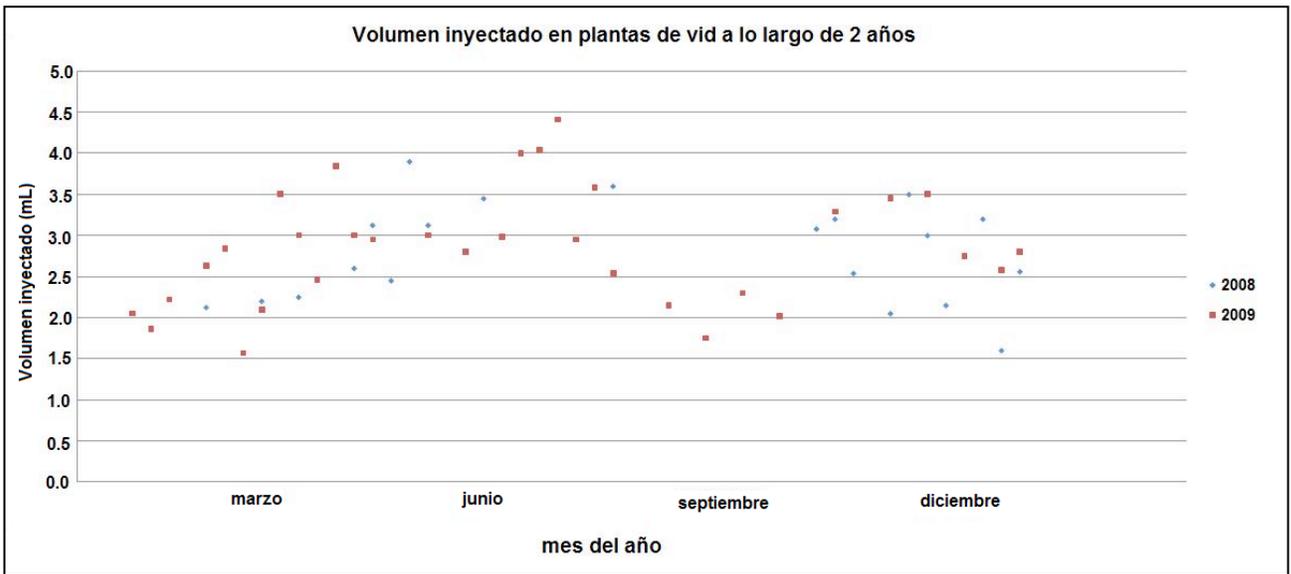


Figura 5-16: Patrón de volúmenes inyectados a lo largo de 2 años. Observe que los mayores volúmenes se inyectan entre mayo y julio. En el año 2008 hay un hueco de información (junio a octubre) debido a problemas técnicos con el sistema QUIKjet.

Un factor importante a evitar es la secreción de gomas por parte de la planta en cierta época del año. A partir septiembre (aproximadamente) en la mayoría de las plantas que estaban bajo tratamiento de bacteriófagos se observó que la solución de fagos (incolora) se tornó café. Esto fue evidente solo con los dispositivos XyllaKill. Incluso, en algunos casos se observó que la boca del dispositivo se tapó con una goma color café. Los resultados arrojados por análisis proximal indican que se trata de una goma con una composición mayoritaria de arabinosa y galactosa (Cuadro 5-6). El análisis por microscopía electrónica de barrido no confirmó la presencia de bacterias, solamente se observó una matriz de superficie uniforme (Figura 5-20).

Cuadro 5-6: Composición de la goma encontrada en el sitio de aplicación.

Carbohidrato	Porcentaje	Carbohidrato	Porcentaje
Arabinosa	52.79%	Ácido Glucurónico	5.17%
Galactosa	36.1%	Glucosa	0.37%
Manosa	5.55%		

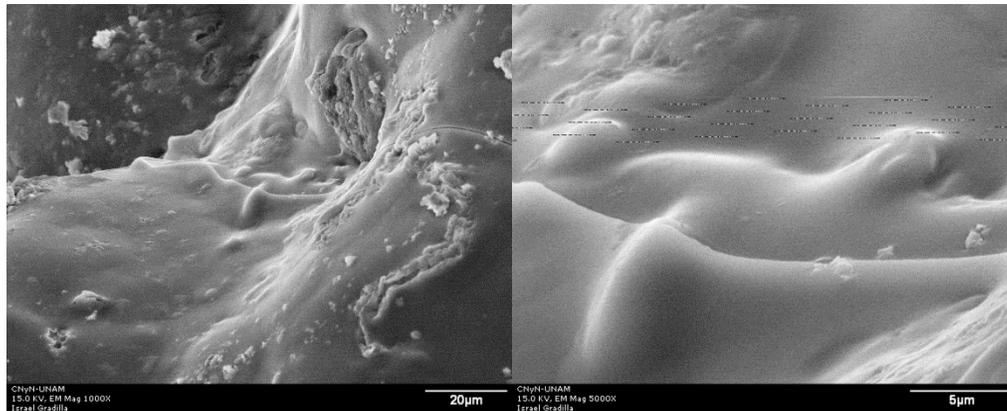


Figura 5-20.- Micrografías de la goma encontrada en el sitio de aplicación.

5.4.- Estabilidad de los fagos en el campo

Se hicieron pruebas de infectividad para comparar la actividad biológica de los fagos bajo distintos tratamientos. Esto de acuerdo al número de células infectadas que produjera cada tratamiento (Figura 5-21). Las dos variables a evaluar fueron la exposición a radiación UV y el tiempo de incubación en el campo. Como control se utilizaron fagos incubados a 4 °C durante los mismos periodos de tiempo (uno, cinco y diez días). En el cuadro 5-7 se indica el número de colonias de células infectadas (en medio selectivo) que produjo cada tratamiento de fagos.

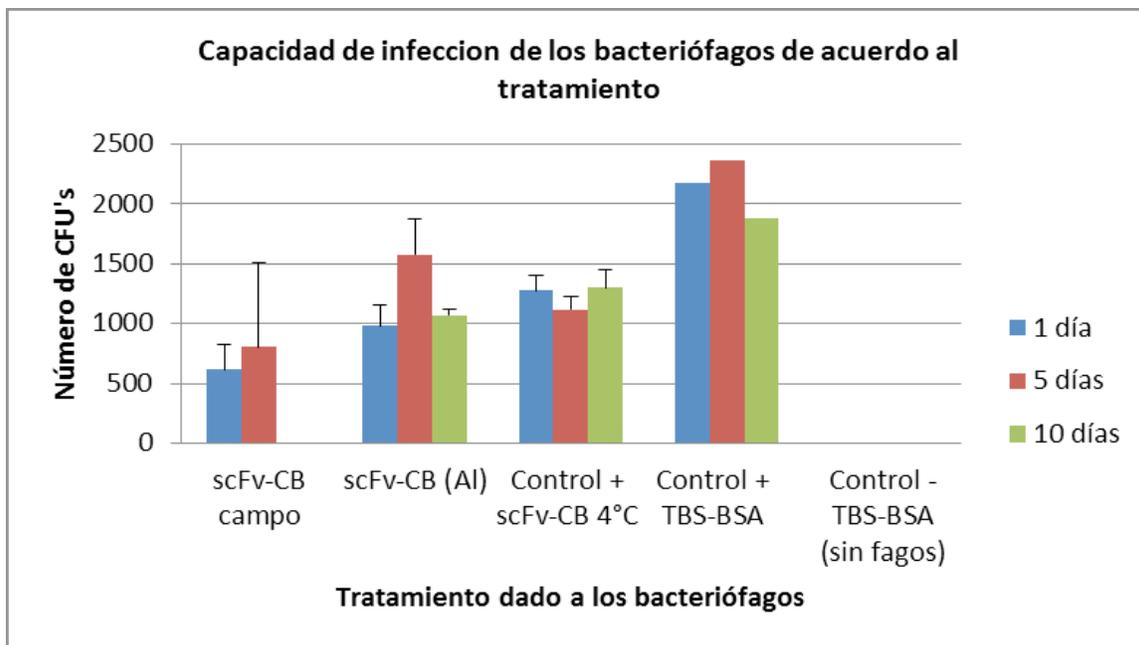


Figura 5-21: Actividad de bacteriófagos bajo distintos tratamientos. Las barras de error indican la desviación estándar. Obsérvese que los bacteriófagos incubados en campo, sin protección, fueron los que menos células infectaron (prueba de Tukey); se aplica a los 3 periodos de incubación. Al proteger los bacteriófagos de la radiación solar se observa que los bacteriófagos infectan de manera similar que los controles incubados a 4°C, excepto por la muestra incubada por 5 días, en la que hubo un aumento (prueba de Tukey).

Cuadro 5-7: Número de colonias resistentes a tetraciclina como indicador de fagos biológicamente activos. Se utilizaron fagos bajo distintos tratamientos.

	1 día	5 días	10 días
Campo	612.66	803	0
Protegidos	979.33	1574	1067.35
Ctrl 4°C	1272.66	1114.66	1299.33
Ctrl TBS campo	2168	2361	1881

Respecto a la exposición a radiación UV se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$, ANOVA de dos vías). Los bacteriófagos incubados sin protección a UV mostraron menor actividad biológica respecto a los controles y a los fagos incubados en campo con protección a UV (prueba de Tukey). En la muestra de fagos incubados por cinco días con protección a UV (scFv-CB[AI]) se observó un incremento de colonias, sin embargo las diferencias no fueron significativas (prueba de Tukey; Figura 5-22).

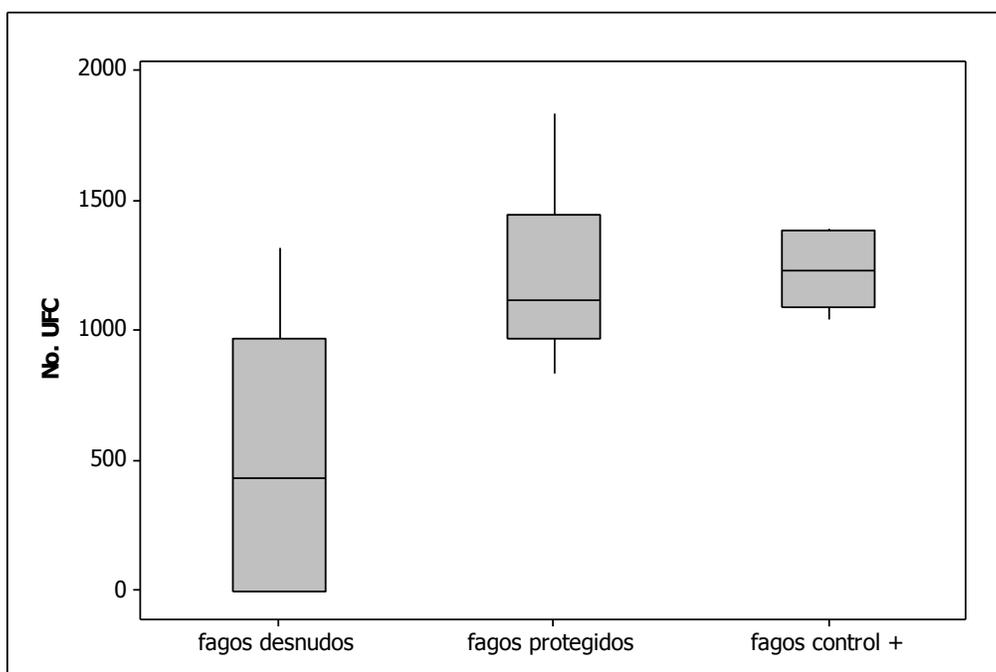


Figura 5-22.- Número de colonias (UFC) resistentes a carbencilina que produce cada grupo de fagos, según el tratamiento.

En relación con el tiempo de incubación también se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.03$, ANOVA de dos vías). El efecto es muy evidente con la muestra de fagos incubados por diez días sin protección, no se observa actividad biológica (no hay colonias de *E. coli*). En los controles (fagos a 4°C) no hubo efecto del tiempo de incubación (prueba de Tukey).

En los controles positivos (incubados sin fagos, solo amortiguador TBS/BSA, medio LB tetraciclina), siempre hubo mayor número de colonias, esto se debe a que los bacteriófagos filamentosos (M13) disminuyen la tasa de crecimiento de las células. En los controles negativos (incubados sin fagos, solo amortiguador TBS/BSA, medio LB carbencilina) no hubo crecimiento de colonias; esto descarta que haya colonias resistentes a tetraciclina a causa de mutación espontánea.

Adicionalmente, se hicieron pruebas de formación de placas sobre medio LB top agar (Figura 5-23) para corroborar la actividad biológica de los fagos.

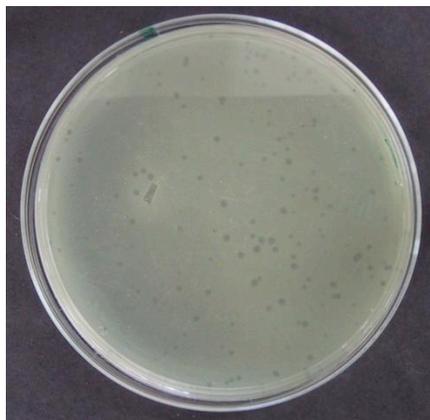


Figura 5-23: Formación de placas líticas con fagos incubados en el campo.

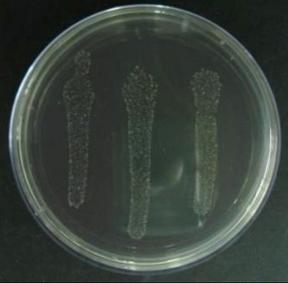
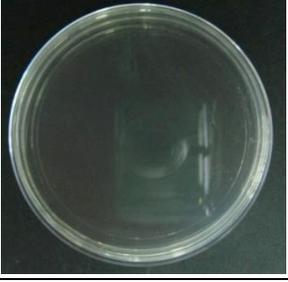
	XL1 Blue + ScFv (campo) LB Agar (carb+tetra)	XL1 Blue + ScFv (campo- protegido) LB Agar (carb+tetra)	XL1 Blue + ScFv (4°C) (ctrl +) LB Agar (carb+tetra)	XL1 Blue + TBS-BSA 1% (campo / 4°C) LB Agar (tetraciclina)
24 hrs.				
5 días				
10 días				

Figura 5-24.- Colonias de *E.coli* XL1 Blue infectadas por fagos bajo distintos tratamientos. Medio selectivo LB Agar (carbencilina, tetraciclina o ambos).

5.5.- Aplicación de bacteriófagos en plantas enfermas en campo experimental

5.5.1.- Plantas seleccionadas

En el campo experimental, rancho Viña Alegre, las 104 plantas seleccionadas (uva variedad Chardonnay) presentaron evidencia de laboratorio positiva a la enfermedad, ya sea por cultivo de colonia en medio sólido (PD2) o por ELISA; ya sea uno o ambos métodos.

En la figura 5-25, se muestra un ejemplo de colonias de *X. fastidiosa* en medio sólido PD2. También se muestra un ejemplo de un ensayo de ELISA (Figura 5-26) con muestras que dan positivo a la enfermedad (pozos azules).

Los valores iniciales (UFC/gramo y absorbancia en ELISA) de las plantas seleccionadas se encuentran en el apéndice 11.

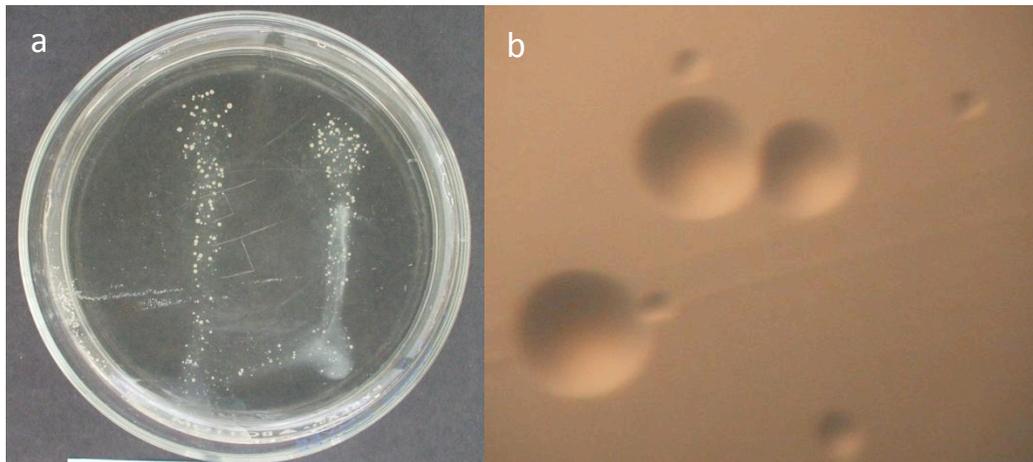


Figura 5-25.- Colonias de *X. fastidiosa* en medio sólido PD2. En (a) Medio sólido PD2 con cientos de colonias, sembrado por el método de gota escurrida. En (b) acercamiento de colonias de *X. fastidiosa* (40 aumentos, aprox.)

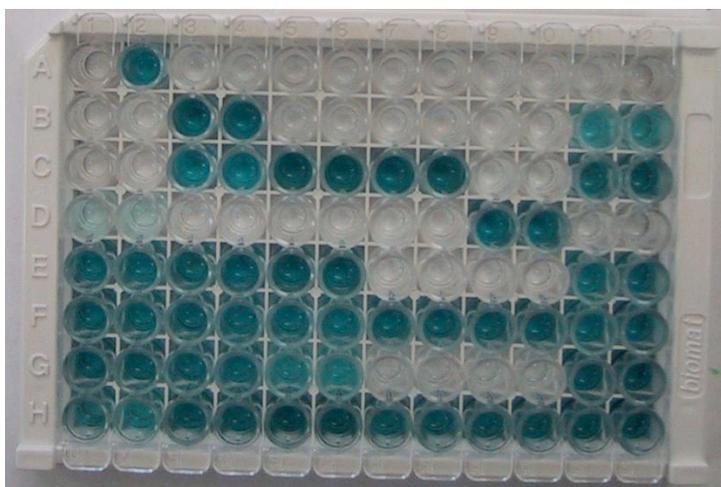


Figura 5-26.- Placa para análisis de ELISA. Los pozos azules son muestras positivas a la bacteria *X.fastidiosa*, los pozos claros resultan negativos al patógeno. Pozo A1 es el control negativo y pozo A2 es el control positivo.

5.5.2.- Producción de bacteriófago VCSM13 Helper

La producción de bacteriófagos se realizó en 4 lotes, bajo las condiciones descritas en la sección 4.6.2. Los lotes tuvieron la concentración mostrada en el cuadro 5-8.

Cuadro 5-8.- Lotes de producción de fagos a gran escala, utilizados en los experimentos en campo experimental.

Lote	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Concentración de fagos (ufp/mL)	3.0×10^{12}	6.72×10^{12}	1.34×10^{12}	5.86×10^{11}

Cada lote se fue produciendo conforme se fue requiriendo. Los fagos se almacenaron a 4 °C hasta su uso y envueltos en aluminio para protegerlos de la luz. Fueron transportados al campo en un recipiente con hielo.

5.5.3.- Aplicación de los tratamientos

Con base en observaciones cualitativas en la vid, se comparó el grado de desarrollo y la cantidad de frutos en el año posterior a la aplicación del tratamiento de fagos. Respecto al grado de desarrollo en los primeros meses (marzo), se encontraron diferencias significativas entre el grupo de plantas tratadas y las no tratadas ($p=0.004$, prueba Mann-Whitney; Figura 5-27); esta diferencia implica una tendencia en la que mientras las plantas tratadas comenzaban a desarrollar las primeras hojas (etapa 11, figura 5-28a), las plantas no tratadas apenas comenzaban a desarrollar las yemas de brotación (etapa 05 a 07; figura 5-28b). En la segunda observación de desarrollo (junio) se observaron algunas diferencias visuales (no cuantificadas) entre plantas tratadas y no tratadas (Fig 5-29) como el vigor de las plantas o la proporción de tejido muerto. Sin embargo, en cuanto al número de racimos y el grado de desarrollo de los mismos no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.1$ y $p=0.96$, respectivamente; Mann-Whitney) entre ambos grupos (Figuras 5-30 y 5-31, respectivamente). Finalmente, tampoco hubo diferencias significativas en cuanto a la cantidad de fruto (kilogramos) por planta ($p=0.96$; Mann-Whitney) entre plantas tratadas y no tratadas (Figura 5-32).

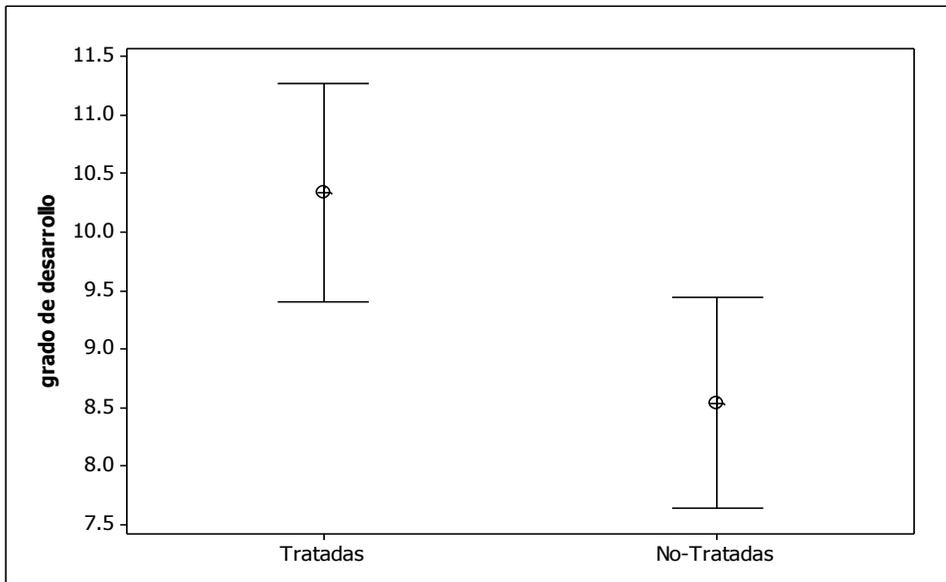


Figura 5-27.- Grado de desarrollo (según Hellman, 2003) entre plantas tratadas y no tratadas (mes: marzo)

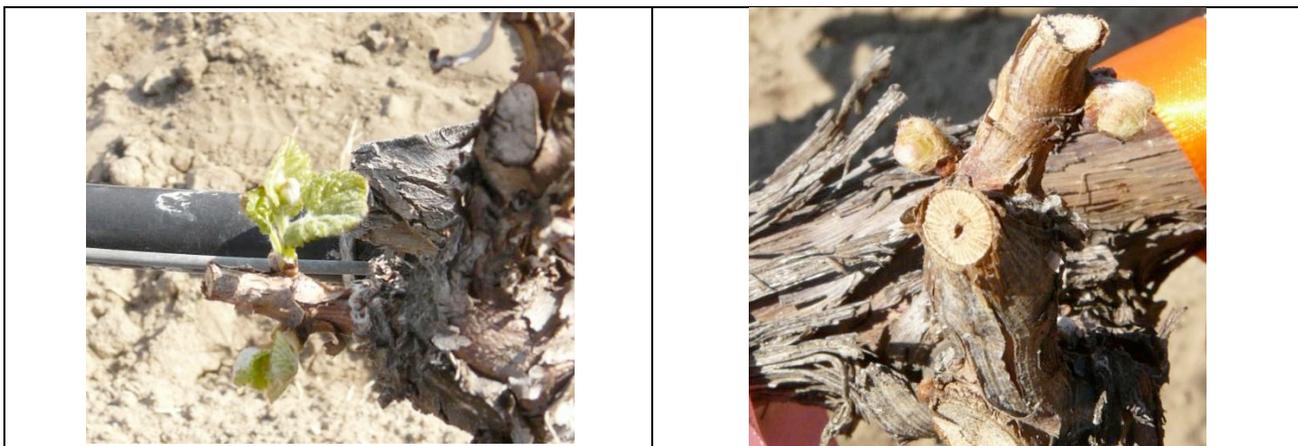


Figura 5-28.- Grado de desarrollo en vid (Hellman, 2003) en plantas tratadas y no tratadas. En (a) etapa 11: primeras hojas desarrolladas y alejadas del brote; en (b) etapa 05 a 07: puntas de lana - puntas de los brotes visibles



Figura 5-29.-Comparación cualitativa entre plantas tratadas y no tratadas. El listón naranja corresponde a planta tratada, el listón amarillo corresponde a una planta no tratada.

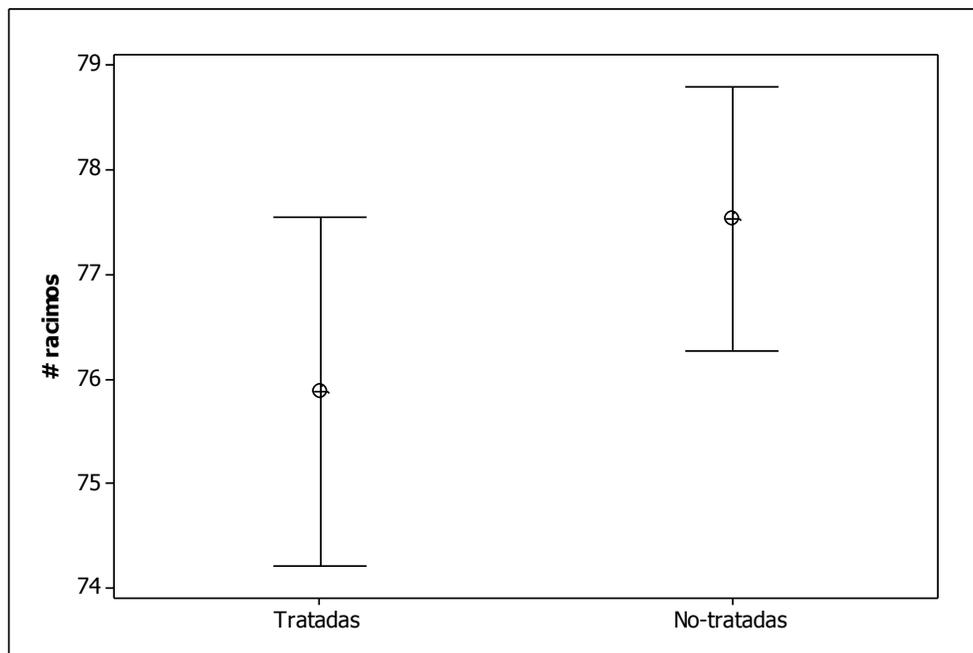


Figura 5-30.- Número de racimos por planta en plantas tratadas y no tratadas (mes: junio)

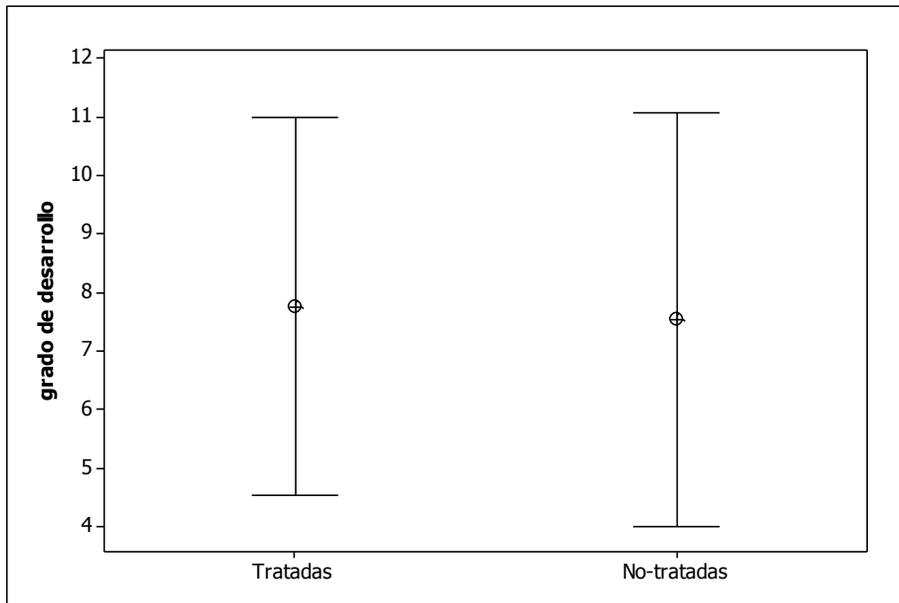


Figura 5-31.- Grado de desarrollo de frutos (según Hellman, 2003) entre plantas tratadas y no tratadas (mes: junio)

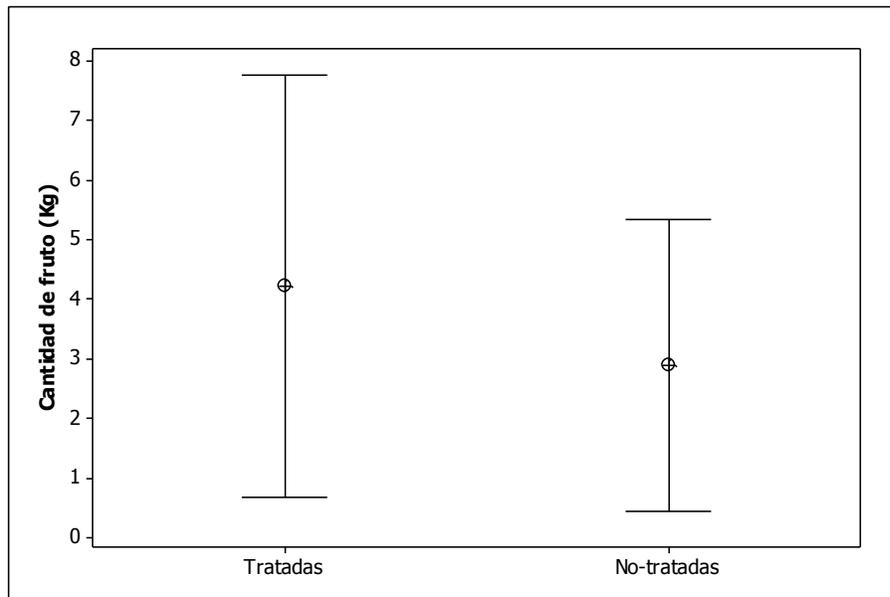


Figura 5-32.- Cantidad de fruto (kilogramos) por planta en plantas tratadas y no tratadas (mes: agosto)

Durante el experimento, de las 64 plantas no tratadas, 10 de estas murieron con síntomas de estrés hídrico (posiblemente enfermedad de Pierce); esto representa 15.6% de las plantas no tratadas. En las plantas tratadas ninguna murió por estrés hídrico. Adicionalmente 4 plantas no tratadas y 2 plantas tratadas fueron eliminadas por los trabajadores del rancho en situaciones distintas. Desconocemos los motivos.

En el análisis cuantitativo, comparando la cantidad de UFC, antes y después del tratamiento, (Figura 5-30) se observó que no hay diferencias significativas en el grupo de plantas tratadas, antes y después del tratamiento ($p=0.073$, t-pareada). Sin embargo, en el grupo de plantas no tratadas (plantas control) si se observaron diferencias significativas entre un año y el otro ($p<0.001$, t-pareada).

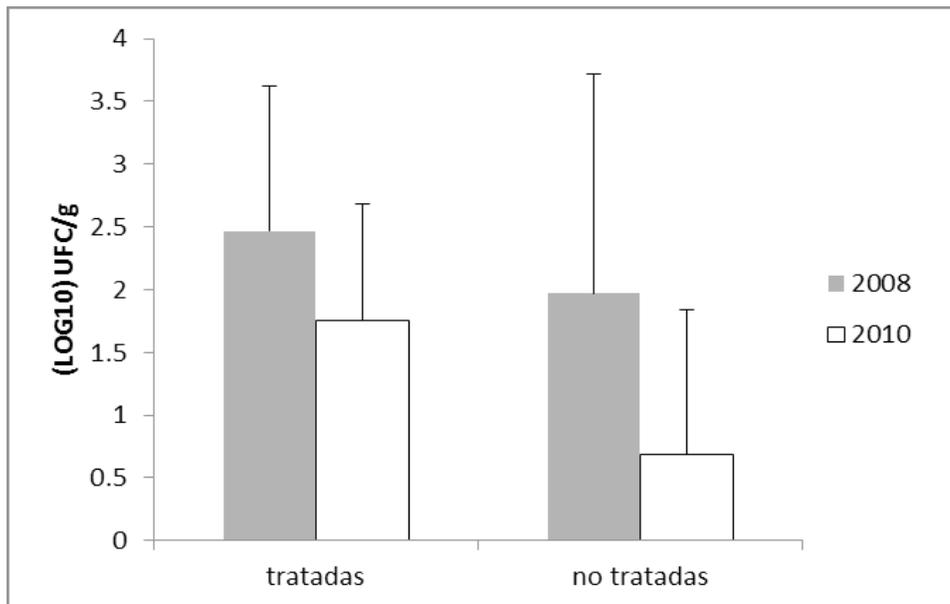


Figura 5-33.- Número de UFC (LOG10) en plantas tratadas comparando antes (2008) y después (2010) del tratamiento, y con el grupo de plantas no tratadas (controles). La barra de error indica la desviación estándar.

Haciendo la misma comparación con las lecturas de ELISA (Figura 5-31), en ambos grupos se observan diferencias significativas ($p < 0.001$, t-pareada).

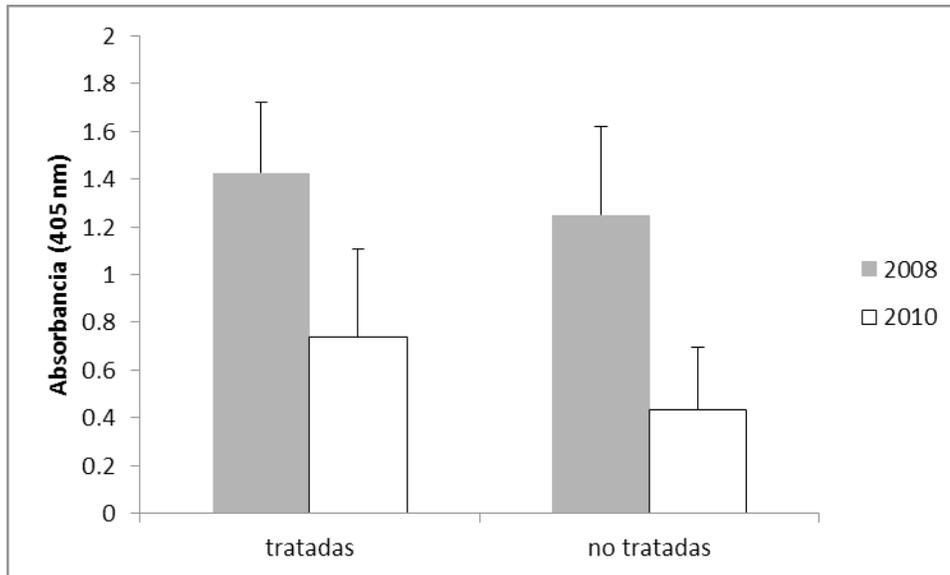


Figura 5-34.- Lectura de ELISA en plantas tratadas y no tratadas comparando antes (2008) y después (2010) del tratamiento, y con el grupo de plantas no tratadas (controles).

En los análisis de regresión entre indicadores (cantidad de UFC ó lecturas de ELISA, después del tratamiento) y el volumen y/o cantidad de fagos totales aplicados se observa una tendencia que a mayor volumen y más fagos es mejor; sin embargo los coeficientes de determinación (R^2) son muy bajos. Al graficar el número de UFC en relación con el volumen y cantidad de fagos (Figuras 5-35 y 5-36) se ve que los datos son pocos y además están dispersos ($R^2=0.033$ y 0.0013). Al relacionar volumen y cantidad de fagos con lecturas de ELISA (Figuras 5-37 y 5-38) los datos también están muy dispersos ($R^2=0.062$ y 0.018 , respectivamente), aunque hay más datos colectados. En las cuatro regresiones no hubo significancia estadística ($p= 0.49$; 0.89 ; 0.12 ; 0.58 , respectivamente).

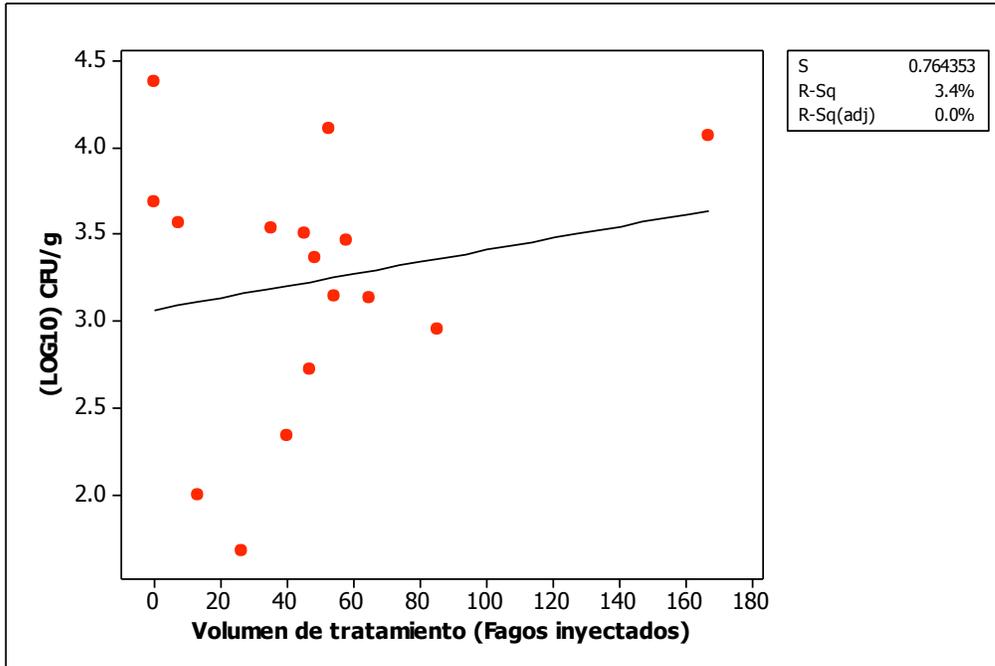


Figura 5-35.- Regresión lineal entre el volumen de tratamiento inyectado y el número de colonias (LOG10) de *X. fastidiosa* después del tratamiento.

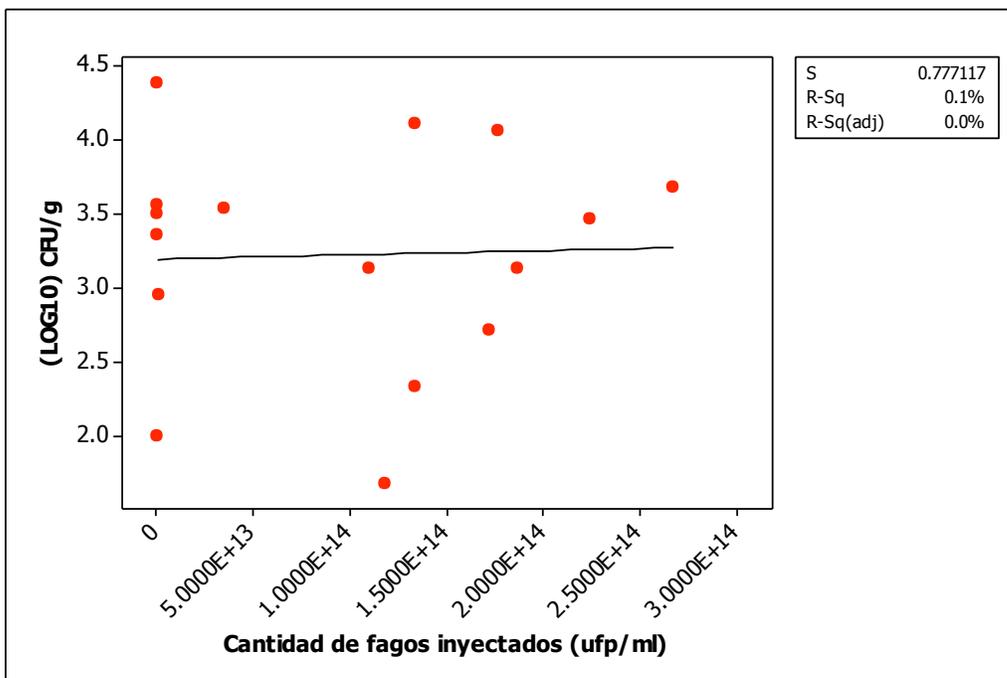


Figura 5-36.- Regresión lineal entre la cantidad de fagos inyectados y el número de colonias (LOG10) de *X. fastidiosa* después del tratamiento (2010).

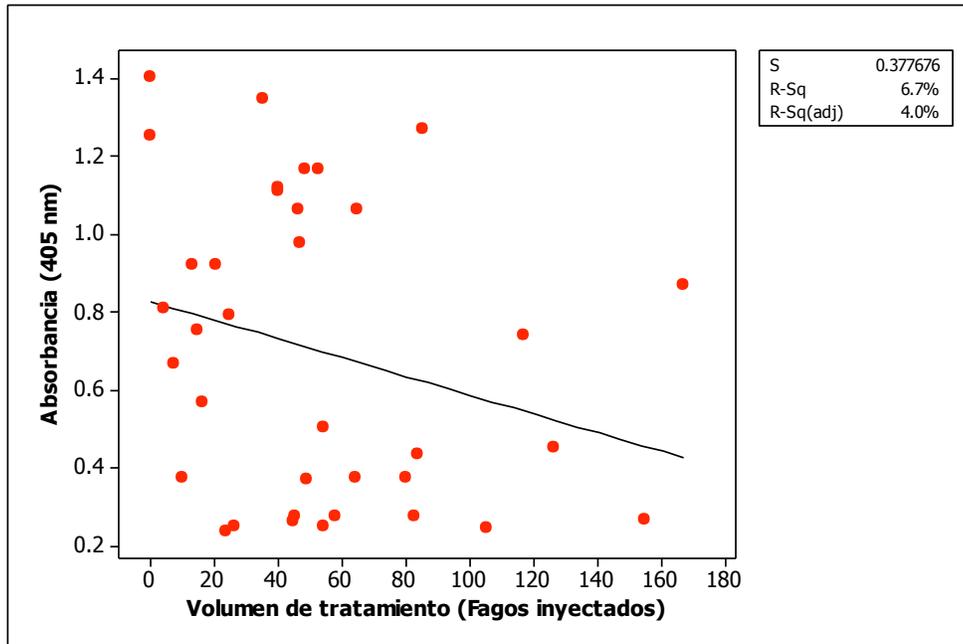


Figura 5-37.- Regresión lineal entre el volumen de tratamiento aplicado y el valor de absorbancia por ELISA anti-*Xylella*, después del tratamiento (2010).

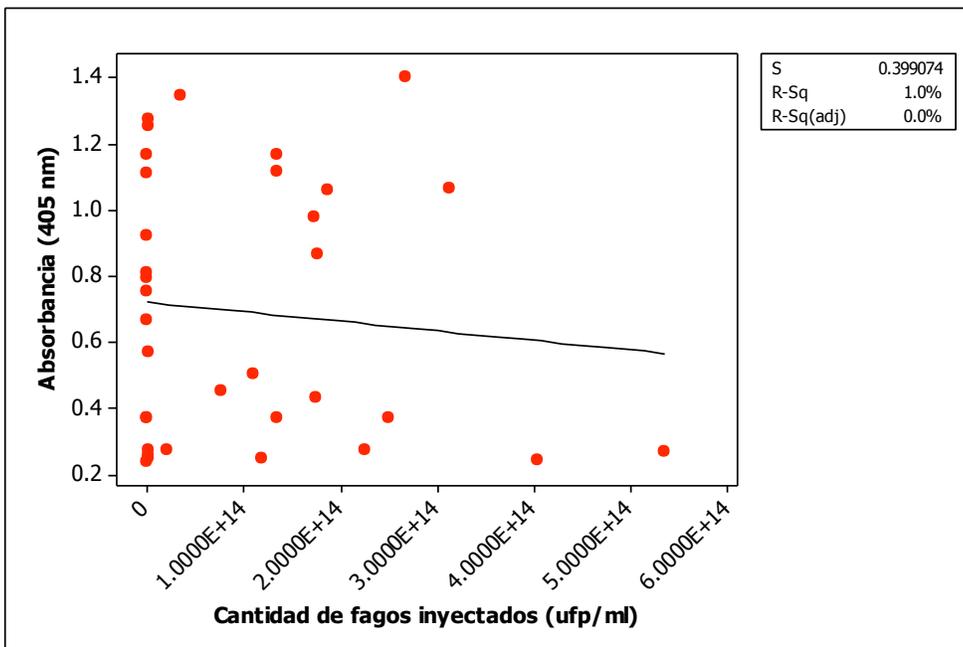


Figura 5-38.- Regresión lineal entre la cantidad de bacteriófagos inyectados y el valor de absorbancia por ELISA anti-*Xylella*, después del tratamiento (2010).

6.0.- Discusiones

En este trabajo se generó información que será de utilidad al momento de planear una aplicación de bacteriófagos en plantas o incluso otro tratamiento similar; para decidir algún sistema de aplicación en particular, y como usarlo, para identificar o conocer las condiciones ambientales que puedan favorecer tal aplicación, y para planificar futuros experimentos.

6.1.- Comparación entre distintos sistemas de aplicación.

Adicional al estudio de sistemas de micro-inyección o macro-infusión se contribuyó con el desarrollo de un sistema de difusión pasiva, llamado XyllaKill (tomado del nombre que lleva la solución de bacteriófagos desarrollados para combatir la enfermedad de Pierce). El diseño de este dispositivo es obra del esfuerzo de todo el equipo del Laboratorio Meredith Gould, no solo mío; así como de colaboradores externos.

Para realizar una aplicación de bacteriófagos en plantas deben tomarse varios factores en cuenta, tanto técnicos como ambientales, fisiológicos y económicos.

Los sistemas de micro-inyección (QUIKjet y p.h. Viper) administran poco volumen (2.5 a 18 mL) de manera inmediata, esto nos sirve para plantas pequeñas o soluciones concentradas de bacteriófagos; es útil para evitar una exposición prolongada de los bacteriófagos a las condiciones ambientales. Por el otro lado, los sistemas Tree IV y dispositivo XyllaKill ofrecen la ventaja de administrar un gran volumen (54 – 170 mL) de tratamiento de bacteriófagos, solo que en un tiempo

mayor. Este factor es de gran consideración para el tratamiento: en el caso de los bacteriófagos se vio que en un periodo de 10 días expuestos a la radiación solar pierden actividad, por lo que deben protegerse del sol o ser administrados en un tiempo no mayor a dicho periodo.

Por otro lado, si se decide inyectar el tratamiento, es posible que una solución concentrada de bacteriófagos puede llevar a la agregación de los mismos y evitar que fluyan libremente por el xilema (Stephano, comentario personal) siendo esta una de las desventajas de los sistemas de micro-inyección (QUIKjet y p.h. Viper); por el contrario, los sistemas de macro-infusión y difusión permiten administrar soluciones diluidas de bacteriófagos. La decisión entre administrar una solución concentrada o diluida y el volumen del solvente dependerá en gran medida del tamaño de la planta, la dosis de bacteriófagos que se desee inyectar y de la condición fisiológica de la planta o incluso el grado de la enfermedad.

En una etapa importante de los experimentos se utilizaron únicamente los dispositivos de la segunda etapa, por ello fue importante evaluar la utilidad de la válvula arborplug en adición al dispositivo. En el aspecto técnico, la válvula arborplug hizo gran diferencia ya que sin este se invertía casi una hora para instalar cada dispositivo y aun así había fuga de líquido en algunas ocasiones. Gracias al Arborplug se hizo posible la instalación del dispositivo en menos de 10 minutos y se evitó en todos los casos el problema de fugas. En la cuestión de volumen inyectado: al utilizar 1 dispositivo por planta no hubo ninguna diferencia, al utilizar 4 dispositivos por planta la diferencia fue más evidente; el dispositivo sin válvula arborplug difundió más volumen de pintura que aquel al que se le agregó el

la válvula arborplug. No obstante, se prefiere utilizar la válvula por las cuestiones técnicas explicadas arriba.

A pesar de que los vasos del xilema se encuentran hidráulicamente conectados con otros vasos laterales, a través de la membrana perforada (Thorne *et al.* 2006), se observó que la pintura recorrió únicamente el conjunto de vasos del xilema correspondientes al sitio de inyección, es decir, no se movió lateralmente solo longitudinalmente. Este mismo patrón se observó al introducir la pintura vegetal por la raíz, en donde la pintura subió por el conjunto de vasos conectados con la raíz por la que se difundió la solución marcadora. Anteriormente, Chatelet y colaboradores (2006) tuvieron resultados similares con diversas partículas (células de *Yersinia enterocolitica*, pintura, aire y partículas fluorescentes) en donde vieron que el movimiento de éstas dentro del xilema estaba restringido a un solo vaso del xilema o un conjunto de estos. A partir de estas observaciones se sugiere que la aplicación de bacteriófagos - ya sea por micro-inyección, macro-infusión o difusión pasiva – debe realizarse en varios puntos sobre el tallo de la planta con el fin de abarcar varios conjuntos de vasos de xilema.

En cuanto al área del xilema que abarca cada sistema se observó que el dispositivo XyllaKill marcó casi el doble comparado con el área marcada por el sistema QUIKjet. El Tree IV no marcó tanto como se esperaba, incluso marcó menos que el QUIKjet. Es importante recordar que debido a la poca disponibilidad de plantas para cortar no se realizaron réplicas de estos experimentos y por tanto no hay un respaldo estadístico; por la misma causa se decidió excluir a la pistola hidráulica ya que su desempeño en otras pruebas fue similar al QUIKjet. No se

encontró gran diferencia al utilizar el dispositivo XyllaKill sin válvula arborplug o con ella. En estas pruebas no se incluyó al dispositivo de la tercera etapa ya que su fabricación fue posterior a estos experimentos. Sin embargo, sería interesante generar información al respecto. Además del área del xilema que cubre un sistema, es importante la trayectoria recorrida por el tratamiento con el fin de asegurar que este llegue a todos los brotes y hojas y no se quede únicamente en la porción del tronco o tallo. En estos experimentos se observó que la distancia alcanzada por la pintura no depende directamente del sistema utilizado sino del volumen de pintura administrado; sin embargo, el volumen dosificado si está en relación directa del sistema utilizado. Con el QUIKjet, cuyo volumen máximo inyectado fue de 5.6 mL y 11 mL (1 y 4 inyecciones respectivamente), la pintura solamente recorrió una distancia de 62 y 56 cm, es decir, se quedó en la porción del tronco y no llegó a los brotes ni hojas. Por el contrario, con los sistemas Tree IV y XyllaKill, cuyos volúmenes máximos difundidos fue de 170 mL y 156 mL respectivamente, la pintura penetró hasta los brotes y peciolo.

Se observó también que la trayectoria recorrida por la pintura es acropétala y basipétala. En invernadero se demostró que a partir del punto de inyección la distancia recorrida en sentido acropétalo es igual o similar a la distancia recorrida en sentido basipétalo. En campo no se pudo registrar la distancia recorrida hacia la raíz ya que la inyección se realizó muy cerca del suelo. Este comportamiento es favorable considerando que deseamos aplicar el tratamiento en plantas en las que no sabemos la ubicación de las bacterias dentro del xilema. Estas observaciones

fueron muy oportunas para experimentos en invernadero en que se aplicaron bacteriófagos en uva (*V. vinifera* variedad Globo Rojo), en el año 2008.

En algunas cuestiones técnicas los 4 sistemas son equiparables, tal es el caso del tiempo de instalación, la inexistencia de fugas y la ventaja de que todos los equipos son re-utilizables. También es cierto que cada uno de los sistemas de inyección posee alguna ventaja sobre los demás. Con los sistemas de micro-inyección el tiempo de dosificación es instantáneo, esto tiene 2 ventajas: se reduce el tiempo que los bacteriófagos están expuestos a la radiación solar; y además permite saber de manera instantánea si el sitio de inyección no es el adecuado (vasos tapados o rotos) o la presión interna de la planta es alta. Por el contrario, utilizando el sistema Tree IV y el XyllaKill estos problemas (sitio de inyección inadecuado o presión interna alta) no pueden descifrarse sino hasta horas o días después. Además, si no se tiene cuidado los bacteriófagos podrán desnaturalizarse e inactivarse a causa de las arduas condiciones ambientales. Una opción sería utilizar dos sistemas de aplicación: uno de micro-inyección (como quikjet) que nos permita saber si el tratamiento entrará a la planta; después uno de macro-inyección (tree IV) o difusión (XyllaKill) para dosificar más volumen de tratamiento.

El costo de cada sistema es un factor secundario pero útil al momento de decidirse por uno u otro sistema. El sistema más económico es el dispositivo XyllaKill (\$25 dólares); incluso si se piensa en utilizar 4 dispositivos XyllaKill por planta, el precio (\$100 dólares) sigue siendo más barato que su competencia más próxima: el Tree IV (\$599 dólares). El sistema QUIKjet tiene un costo de \$359 dólares, en desempeño es similar al sistema Viper; sin embargo en costo este

último es 8 veces mayor (\$2900 dólares). El precio señalado para el sistema XyllaKill esta basado en una producción a baja escala de 500 unidades, aumentando la producción bajaría el costo. En el caso de los otros tres sistemas comerciales, quizá pudiesen bajar en una compra al mayoreo pero difícilmente podrían bajar tanto como el XyllaKill.

Haciendo un análisis integral de las todas las variables hasta aquí mencionadas se recomienda utilizar el sistema QUIKjet para los casos en que se desea inyectar poco volumen del tratamiento y/o una alta concentración de este, también cuando se desea que la penetración de los bacteriófagos sea inmediata. Los sistemas Tree IV y XyllaKill se recomiendan para los casos en los que desea inyectar una gran cantidad de volumen (hasta 170 mL) y en los que se desea disminuir la carga de trabajo y tiempo de instalación/aplicación. Para los casos en los que el recurso económico es bajo se recomienda el dispositivo XyllaKill por encima del Tree IV. La pistola hidráulica Viper no se recomienda debido a que su desempeño es similar al del QUIKjet pero su costo es 8 veces mayor.

6.2.- Arreglo espacial de las aplicaciones.

Con base a los resultados obtenidos en las secciones 5.1.2, 5.1.3 y 5.1.4 se sugiere que el arreglo espacial de las aplicaciones sobre el tronco debe adecuarse al sistema utilizado, pero tomando en cuenta el tamaño de la planta. Tomando como base al dispositivo XyllaKill con cuatro aplicaciones por planta (cobertura = 40.77% del xilema) - en el que se marcó gran parte del xilema y la pintura llegó hasta brotes y algunos peciolos – se aconseja adaptar el número de aplicaciones

con los otros sistemas para que alcancen una cobertura similar. Con el sistema QUIKjet, y probablemente también con la pistola hidráulica Viper, se debiera colocar de 6 a 7 válvulas arborplug para alcanzar una cobertura similar al sistema XyllaKill. Con el sistema Tree IV sucede una extraña cuestión: aunque los arborplugs son los mismos utilizados en los otros 2 sistemas Arborjet (QUIKjet y Viper), con el sistema de macro-infusión se necesitarían al menos 10 válvulas arborplug por planta. No obstante la cobertura obtenida con el sistema Tree IV, en las pruebas de *distancia recorrida* se observa que la pintura alcanza a marcar satisfactoriamente los brazos laterales, brotes y peciolos. Esto nos hace pensar que en plantas con un grado moderado de la enfermedad (no crónico) el sistema Tree IV, con 4 válvulas arborplug por planta, es útil.

Además del número de aplicaciones por planta, se debe tomar en cuenta la manera en que éstas estarán espaciadas sobre el tronco. Lo mejor es colocar los arborplugs o los dispositivos en forma de espiral sobre el tronco de la vid. Sí las aplicaciones de fagos se realizan a una misma altura sobre el tronco, esto causará daño mecánico a la planta al crear un anillo de daño y discontinuidad en el sistema vascular. Otro error que debe evitarse es el colocar más de una válvula arborplug o dispositivo sobre un mismo conjunto de vasos del xilema ya que esto es innecesario y crea daño mecánico sobre esa sección de la planta, lo que puede llevar paulatinamente a un daño total de la planta. Durante la exploración de plantas en el Rancho Viña Alegre se encontraron 18 plantas muertas, 11 de estas habían sido tratadas y dañadas con tornillos de oxitetraciclina. Una penetración muy profunda en el tronco también puede ser perjudicial en la planta, no se debe

alcanzar la zona de la médula. En los casos en que el tronco es de poco diámetro y la válvula arborplug puede dañar la planta, se recomienda únicamente el uso del dispositivo XyllaKill; al utilizar este, se debe evaluar la profundidad con que se insertará en el tronco a fin de no lastimar.

Además de localizar sitios distribuidos y equidistantes para las aplicaciones de bacteriófagos, se debe buscar que estén localizados adecuadamente. Por ejemplo: hay que escoger el lado de la planta que presente los síntomas; se debe evitar aplicar en aquellos sitios que están o conducen hacia secciones o ramas muertas de la planta. Estas recomendaciones incluyen la observación de otros patógenos en las plantas (hongos, nematodos, termitas, etc) ya que estos podrían interferir en la completa distribución del tratamiento de bacteriófagos.

6.3.- Periodo de aplicación.

Se encontró que la mejor época para realizar las aplicaciones de fagos es entre mayo y julio. Durante los primeros tres meses del año la planta está en letargo o saliendo de este; no se puede introducir ninguna solución al xilema pues la presión positiva no lo permite. Por el contrario hay secreción de savia por cualquier agujero que se haga en la planta. A partir de abril, cuando las hojas ya están completamente expandidas, la presión interna disminuye y es posible introducir la solución. Enseguida comienza el periodo adecuado (mayo a julio) para realizar la introducción del tratamiento. Tomando en cuenta las altas temperaturas y radiación solar que ocurren en el Valle de Guadalupe durante el verano, se recomienda realizar las aplicaciones entre finales de primavera e inicios de verano,

preferentemente. Esto porque las condiciones ambientales adversas pueden ser perjudiciales para los bacteriófagos, como lo describen Ignoffo y García (1992) y Balogh (2002). Al comparar el volumen aplicado en diferentes fechas se observa un ligero repunte en el mes de noviembre, quizá se debe al re-brotamiento que sufren las plantas previo al periodo de letargo, como lo comentó el Ing. Eduardo Flores (responsable del viñedo).

Durante la aplicación de bacteriófagos en el campo (julio a diciembre de 2009), a partir del mes de septiembre se observó en las plantas tratadas la aparición de una goma de apariencia café oscuro, en el área donde penetra el dispositivo en la planta. Esto se registró en 18 plantas por lo menos. La cuestión de que en todas las plantas haya aparecido hacia el otoño sugiere que guarda relación con la época del año. Sin embargo, los análisis realizados y la literatura sugieren que se trata de una reacción de la planta como respuesta a un agente extraño o daño físico (Großl, et al. 2005). En 2004, Stevenson y colaboradores describieron la aparición de unas oclusiones dentro del xilema de vid; de apariencia gelatinosa, color café y de textura suave; esto sucedió como respuesta a la introducción de células de *X. fastidiosa* en el sistema vascular de plantas de vid. La goma observada en nuestras plantas comparte al menos dos características con las Proteínas Arabinogalactanos (AGP): su función en el tejido vascular durante la defensa contra daño a la planta (Liu y Mehdy, 2007) y que en la estructura predominan las unidades de arabinosa y galactosa (Showalter, 2001). Asimismo, la apariencia que describen Stevenson y colaboradores (2004) concuerda con la observada en nuestras plantas. Estas 3 características nos sugieren que la goma

observada se trata de un sistema de defensa de la planta, ya sea que se debe al daño mecánico producido por la introducción del dispositivo XyllaKill, por la infusión de bacteriófagos dentro de la planta o por algún patógeno (bacterias u hongos) que se haya introducido al momento de colocar los dispositivos. Debido a que este evento se hizo evidente al inicio del otoño es probable que este sistema de defensa guarde alguna relación con la época del año.

6.4.- Estabilidad de los fagos.

Dado que los bacteriófagos requieren estar biológicamente activos para infectar a la bacteria huésped, se utilizó esta propiedad para comparar la estabilidad de los fagos bajo diversos tratamientos y por distintos periodos de tiempo, de acuerdo a la cantidad de colonias de células infectadas. Partiendo de esta cuestión se observó que, bajo las condiciones de nuestro campo experimental, los bacteriófagos M13 son más estables cuando se protegen de la radiación solar que cuando no se protegen. Los fagos protegidos mostraron actividad biológica hasta por diez días al menos; sin embargo, aun con la protección pierden un poco de actividad respecto a los controles. Cuando los fagos no se protegen de la radiación solar, su actividad biológica disminuye notablemente y solo permanecen activos hasta por cinco días, a los diez días ya no se observa actividad.

De estas observaciones se desprende que las aplicaciones de bacteriófagos deben protegerse de la radiación solar. En cuanto al tiempo se sugiere que hay un margen de diez días al menos.

6.5.- Aplicación de bacteriófagos en plantas enfermas

En el análisis cualitativo se observó un ligero desfase entre las plantas tratadas y las no tratadas; sin embargo, esto solo se observó en las primeras etapas de desarrollo post-letargo, en las observaciones subsecuentes ya no se observaron diferencias significativas en desarrollo ni en cantidad de fruto. La contra-parte es que en el grupo de plantas no tratadas hubo 10 plantas muertas por estrés hídrico, no así en el grupo de plantas no tratadas. No se sabe en que proporción fue gracias al tratamiento, pero sugiere que tuvo en efecto positivo.

En el análisis cuantitativo, tomando en cuenta el número de UFC no se observó una diferencia significativa antes y después del tratamiento; mientras que en los controles si hubo una diferencia significativa entre un año y otro.

Con base a la absorbancia en ELISA si hubo diferencias significativas; sin embargo también las hubo en los controles. Además, no es posible determinar la proporción de bacterias (antígeno) vivas y muertas.

El conjunto de resultados parecen indicar de que el tratamiento de bacteriófagos evitó el progreso de la enfermedad, esto con base en los siguientes argumentos: **1)** el hecho de que no se vean diferencias significativas entre UFC (antes y después del tratamiento) sugiere que las plantas se mantienen en estado estable, es decir, la enfermedad no progresa ni disminuye; no así con las plantas control (sin tratar), en cuyo caso las diferencias significativas sugieren un avance de la enfermedad y por tanto la carga de bacterias vivas es menor (Newman, *et al.* 2003; Wong y Hyder), similar a lo que sucede en el trabajo de Hopkins (2005), donde se observa estabilidad de síntomas pero no progresión al utilizar un

tratamiento de bacterias benéficas. **2)** 10 plantas (15.6%) en el grupo de controles murieron con síntomas de estrés hídrico, en cambio en el grupo de plantas tratadas ninguna murió. No se sabe con precisión si murieron a causa de la enfermedad de Pierce, pero es muy probable. **3)** En muchos casos, la sintomatología de las plantas control fue más severa que en las plantas tratadas. Por lo tanto, para futuros experimentos se recomienda aplicar de manera sistemática un rango de concentraciones más amplio para aproximarnos a la dosis ideal que controle la enfermedad de Pierce.

Una segunda hipótesis es que el tratamiento no haya funcionado, dado que no se observaron diferencias significativas en número de colonias antes y después del tratamiento. Sin embargo esta hipótesis no explica la reducción drástica en UFC en el grupo de plantas control.

En el análisis por ELISA se observan diferencias significativas en ambos grupos (entre 2008 y 2010) en la misma proporción. No se sabe la causa ya que el muestreo se realizó en la misma época (agosto) con el fin de evitar la fluctuación estacional de títulos bacterianos (EPPO. 2004). Se sabe que la cantidad de bacterias es variable y aleatoria dentro de la misma planta (Newman *et al.* 2003), sin embargo es curioso que bajan en la misma proporción. Además, las lecturas de ELISA nos dan una estimación de bacterias totales, es decir, vivas y muertas.

Con base en los resultados aquí presentados, resulta complicado hacer un juicio contundente sobre la efectividad del tratamiento, esto por las siguientes razones: 1) Existen muchas variables al utilizar plantas naturalmente infectadas en campo. Feil *et al* (2002) documentaron que plantas infectadas en diferentes épocas

y sitios de la planta responden diferente a la enfermedad, algunas enferman crónicamente y otras solo por la temporada en curso; con este argumento se puede suponer que algunas plantas pueden incluso curarse naturalmente de la enfermedad. 2) La distribución del patógeno dentro de la planta es irregular y desconocida, algunos vasos del xilema pueden estar repletos de bacterias u obstruidos por las gomas mientras que vasos contiguos estar casi libres de *X. fastidiosa* (Newman *et al.* 2003). 3) Existen otras enfermedades o patógenos que pueden mimetizar los síntomas o incluso obstruir el efecto del tratamiento; tal es el caso del hongo *Eutypa lata*, causante de la enfermedad del brazo muerto. 4) La combinación aleatoria de estos factores hace que cada planta responda distinto ante la enfermedad de Pierce y ante el tratamiento de bacteriófagos, lo que hace difícil agrupar las plantas. Sin embargo, para futuros experimentos podría hacerse un esfuerzo por agrupar de acuerdo a sintomatología general y/o carga bacteriana (Hopkins, 2005; Nadkarni *et al.* 2002) en un muestreo masivo de cada planta.

En experimentos realizados en invernadero con vid variedad Red Globe (Silva-Valdes, no publicado) se encontró que la aplicación de fagos es efectiva como tratamiento al poco tiempo de haber sido infectada la vid (post-infección), no así cuando ya se encontraba en un estado de síntomas muy avanzado (post-síntomas). Algunas de nuestras plantas tratadas pudieron haber estado en una fase equivalente a post-síntomas y es por eso que no se vio un efecto del tratamiento.

Este trabajo representa apenas la base para otros estudios orientados a una aplicación de bacteriófagos líticos en plantas de uva. Se sabe que en experimentos

in vitro una concentración de 3.6×10^5 fagos/célula eliminan a *X. fastidiosa* en un tiempo de 24 a 28 horas (Silva-Valdes, 2006). Es de importancia determinar esta información para las aplicaciones en plantas de campo. Donde además habrá que tomar en cuenta el tamaño de la planta, el grado de enfermedad y la concentración de bacterias dentro del sistema vascular. También es importante determinar si la concentración de bacteriófagos tiene relevancia. Además se hace la sugerencia de probar con otros fagos construidos en el laboratorio y no utilizados para los experimentos en campo aquí mostrados; bien sea distintos fagos por separado o mezcla de estos.

Cabe aclarar que parte de los experimentos (sección 5.1 a 5.3) aquí expuestos se realizaron en plantas sanas, solamente la inyección de fagos (sección 5.5) se realizó en plantas enfermas (diagnosticadas por cultivo en placa y ELISA); es así que cabe la posibilidad de que algunos de los resultados expuestos en aquellas secciones (5.1 a 5.3) pueda variar para las plantas enfermas, debido a la obstrucción del xilema o el deterioro de la planta a causa de la enfermedad.

Como se hizo mención en la sección 6.2, es determinante la observación de otras enfermedades o patógenos en las plantas a tratar. Un viñedo que, además de *X. fastidiosa*, se encuentre enfermo a causa otros patógenos no solo confundirá en el diagnóstico sino que además no asegurará un buen rendimiento en el tratamiento con bacteriófagos líticos scFv-CP1 o CB. Para fines de estudio, es conveniente utilizar un viñedo cuidado y realizar un buen diagnóstico integral previo a la aplicación de bacteriófagos.

A pesar de que la aplicación de bacteriófagos implica perforar en el tronco de la planta; si la colocación de la válvula arborplug o el dispositivo se hacen correctamente las plantas no serán afectadas en gran medida. Evidencia de esto son los primeros experimentos en campo (enero de 2008, datos no mostrados), ya que las plantas presentan actualmente un gran vigor y una producción desmesurada de uva. Con esto se descarta una gran afectación por el daño mecánico durante la penetración en el tronco.

7.0.- Conclusiones.

- Se recomienda utilizar el sistema QUIKjet para los casos en que se aplicará poco volumen ya que este entra de manera inmediata.
- Los sistemas Tree IV y dispositivo XyllaKill se pueden utilizar en los casos en que se desea poner más volumen de tratamiento y que no sea tan relevante el tiempo que tarde en difundir este hacia el xilema.
- El volumen de tratamiento es importante, pues entre mayor sea este hay más posibilidades de que se distribuya por toda la planta, incluyendo brotes y peciolos.
- A partir del punto de inyección, el tratamiento viaja en sentido acropétalo y basipétalo.
- Debido a que no hubo evidencia de comunicación entre vasos (contiguos) del xilema, se deben hacer varias inyecciones en el tronco en arreglo espiral.
- Entre mayo y julio es la época adecuada para realizar las aplicaciones.
- Los fagos permanecen estables por 10 días (al menos) en el Valle de Guadalupe cuando se les protege de la radiación solar, y por 5 días (al menos) cuando no se les protege de la radiación.
- Hubo diferencias significativas en la aparición de brotes, entre plantas tratadas con fagos y no tratadas, también hubo diferencias en el número de colonias y por ELISA, aunque estas no fueron estadísticamente significativas.

8.- Literatura Citada

- Almeida, R.P.P., y A.H. Purcell. 2003. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera:Cicadellidae). *Entomology* 96(2): 264-271.
- Balogh, B. 2006. Characterization and use of bacteriophages associated with citrus bacterial pathogens for disease control. PhD thesis. Univ. FL: Gainesville.
- Banks, D., R. Albibi, J. Chen, O. Lamikanra, R.L. Jarret, y B.J. Smith. 1999. Specific detection of *Xylella fastidiosa* Pierce's Disease strains. *Microbiology* 39:85-88.
- Barbas, C.F., D.R. Burton, J.M. Scott, G.J. Silverman (editores). 2001. Phage Display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos de América.
- Berisha, B., Y.D. Chen, G.Y. Zhang, B.Y. Xu, T.A. Chen. 1998. Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:427-33.
- Bergamin, Filho A, Kimati H. 1981. Estudos sobre um bacteriofago isolado de *Xanthomonas campestris*. II. seu emprego no controle de *X. campestrise X. vesicatoria*. *Sum. Phytopathol.* 7:35-43.
- Bextine, B.R., y T.A. Miller, 2004. Comparison of whole-tissue and xylem fluid collection techniques to detect *Xylella fastidiosa* in grapevine and oleander. *Phytopathology* 88:600-604.
- Blua, M.J., P.A. Phillips, y R.A. Redak. 1999. A new sharpshooter threatens both crops and ornamentals. *Calif. Agric.* 53:22-25
- Boyd, R.J., A.C. Hildebrandt, y O.N. Allen. 1971. Retardation of crown gall enlargement after bacteriophage treatment. *Plant Dis. Rep.* 55:145-48.
- Brodbeck B.V., R.F. Mizell, Andersen PC. 1993. Physiological and behavioral adaptations of three species of leafhoppers in response to the dilute nutrient content of xylem fluid. *J. Insect Physiol.* 39:73-81
- Chatelet D.S., MA Matthews, T.L. Rost. 2006. Xylem structure and connectivity in grapevine (*Vitis vinifera*) shoots provides a passive mechanism for the spread of bacteria in grape plants. *Annals of Botany.* 98:483-494.
- Chatterjee, S., R.P.P. Almeida, y S. Lindow. 2008. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:243-271.
- Civerolo, E.L., y H.L. Keil. 1969. Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology* 59:1966-67.
- Clark, J.R., J.B. March. 2006. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in biotechnology* 24:212-218.
- Davis, M.J. 1991. Fastidious bacteria of plant vascular tissues and their invertebrate vectors, en *The prokaryotes*, A Handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications. A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, M.W. Harder, y K.H. Schleifer. New York, Springer-Verlag. 4:40264029.
- Davis, M.J., A.H. Purcell, y S.V. Thomson. 1978. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science* 199:75:77.
- Delgadillo, J. 1992. Florística y ecología de Baja California. Universidad Autónoma de Baja California, Serie Textos. Mexicali, Baja California. ISBN 9686260765

- Echánove, J.A., J.L. Stephano. 2009. Escalamiento en la producción de sustancias anti-*Xylella* para control de la enfermedad de Pierce (no publicado)
- EPPO. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Bulletin 34, 155-157
- Feil, H., W.S. Feil y A.H. Purcell. 2002. Effect of date of inoculation on the within-plant movement of *Xylella fastidiosa* and persistence of Pierce's disease within field grapevines. *Phytopathology*. 93: 244-251.
- French, W.J., E.W. Kitajima. 1978. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. *Plant Dis. Rep.* 62:1035-38.
- Gill, J.J., S.T. Abedon, 2003. Bacteriophage ecology and plants. APSnet
- Goheen, A.C., B.C. Raju, S.K. Lowe, G. Nyland. 1979. Pierce's disease of grapevines in Central America. *Plant Dis. Rep.* 63:788-92.
- Gonzalez, CF., C.J. Enderle, E.J. Summer. 2008. Bacteriophage and bacteriocins of *Xylella fastidiosa*: potential biocontrol agents. Proceedings, 2008 Pierce's Disease Research Symposium. California Department of Food and Agriculture, Sacramento, CA. 160-163.
- Hellman, E.W. 2003. Grapevine structure and function. En: Oregon viticulture. E.W. Hellman (ed) Oregon State University Press. Corvallis, OR.
- Hill, B.L. y A.H. Purcell. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology* 85:1368-1372.
- Hopkins, D.L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27:271-290.
- Hopkins, D.L. 2005. Biological control of Pierce's disease In the vineyard with strains of *Xylella fastidiosa* benign to grapevine. *Plant Disease*. 89: 1348-1352
- Ignoffo, C.M., C. Garcia. 1992. Combinations of environmental factors and simulated sunlight affecting activity of inclusion bodies of the heliothis (lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrosis virus. *Environ. Entomol.* 21:210-13. (Abstract)
- Ignoffo, C.M., W.C. Rice, y A.H. McIntosh. 1989. Inactivation of nonoccluded and occluded baculoviruses and baculovirus-DNA exposed to simulated sunlight. *Environ. Entomol.* 18:177-83.
- Jones, J.B., L.E. Jackson, B. Balogh, A. Obradovic, F.B. Iriarte, y M.T. Momol. 2007. Bacteriophages for plant disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:245-262.
- Kuo, T., L. Cheng, C. Yang, y S. Yang. 1971. Bacterial leaf blight of rice plant IV. Effect of bacteriophage on the infectivity of *Xanthomonas oryzae*. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 12:1-9.
- Su, C. C., Leu L. S. 1995. Distribution of Pear Leaf Scorch and monthly isolation of its causal organism, *Xylella fastidiosa* from infected trees. *Plant Pathology* 4:30-33.
- Lorch, A. 1999. Bacteriophages: an alternative to antibiotics?. *Biotechnology and development monitor*. No 39, p 14-17
- McGaha, L.A., B. Jackson, B. Bextine, D. McCullough y L. Morano. 2007. Potential Plant Reservoirs for *Xylella fastidiosa* in South Texas. *Am. J. Enol. Vitic.* 58:3
- Manulis, S., D. Zutra, F. Kleitman, O. Dror, I. David. 1998. Distribution of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of blossom blight in the autumn. *Phytoparasitica* 26:223-30. (Abstract)

- Matsuzaki, S., M. Rashel, J. Uchiyama, S. Sakurai, T. Ujihara, M. Kuroda, M. Ikeuchi, T. Tani, M. Fujieda, H. Wakiguchi, S. Imai. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* 11:211-219
- Meng, Y., Y. Li, CD Galvani, G. Hao, JN Turner, TJ Burr, HC Hoch. 2005. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *Journal of Bacteriology.* 187:5560-5567
- Michael Großl a, Sabine Harrison a, Isabella Kamla,b, Ernst Kenndler. Characterisation of natural polysaccharides (plant gums) used as binding media for artistic and historic works by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1077 (2005) 80–89
- Nadkarni, M.A., F.E. Martin, N.A. Jaques y N. Hunter. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primer set. *Microbiology.* 148: 257-266.
- Newman, K.L., R.P.P. Almeida, A.H. Purcell y S.E. Lindow. 2003. Use of a Green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Appl. Env. Microbiology.* 69: 7319-7327.
- Nomé, S.F., R.M. Haelterman, D.M. Docampo. 1992. Escaldadura de las hojas del almendro in Argentina. *Fitopatol. Bras.* 17:57–60.
- Purcell, A.H. 1997. *Xylella fastidiosa*, a regional problem or a global threat? *J. Plant Pathol.* 79: 99-105.
- Purcell, A.H. y A.H. Finlay. 1979. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's Disease bacterium by sharpshooter leafhopper. *Phytopathology* 69:393-395.
- Purcell, A.H. y D.L. Hopkins. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:131-151.
- Redak, R.A., A.H. Purcell, J.R.S. Lopes, M.J. Blua, R.F. Mizell III, y P.C. Andersen. 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annu. Rev. Entomol.* 49:243-270.
- Rodrigues, J.L.M., M.E. Silva-Stenico, J.E. Gomes, J.R.S. Lopes, y S.M. Tsai. 2003. Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and gyrB sequences. *Applied and environmental microbiology* 69:4249-4255.
- SAGARPA. 2009. Programa de trabajo de la campaña enfermedad de Pierce, a operar con recursos del componente de sanidad e inocuidad del programa soporte 2009.
- SAGARPA. 2011. Programa de trabajo de la campaña contra enfermedad de Pierce a operar con recursos del componente de sanidades del programa de prevención y manejo de riesgos 2011 en el estado de baja california
- Schade, A. L. & Caroline, L. (1944b). The preparation of a polyvalent dysentery bacteriophage in a dry and stable form. III. Stability of the dried bacteriophage towards heat, humidity, age and acidity. *J. Bacteriol.* 48, 243–251.
- Scholander, P.A., W.E. Love, y J.W. Kanwisher. 1955. The rise of sap in tall grapevines. *Plant Physiol* 30: 93-104.
- Showalter AE (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci* 58: 1399–1417

- Silva-Valdés, S.E.M. 2008. Eliminación *in vitro* de *Xylella fastidiosa* utilizando bacteriófagos, fragmentos de anticuerpos y péptido líticos. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Baja California. México. Pags. 108
- Sperry J.S., N.M. Holbrook, M.H. Zimmermann, y M.T. Tyree. 1987. Spring filling of xylem vessels in wild grapevine. *Plant Physiol.* 83:414-417.
- Batta-Lona, P., B. Cortina, Meredith C. Gould, J.L. Stephano. 2002. Como desplegar anticuerpos de gallina en fagos (manual de laboratorio).
- Stevenson, J.F., Matthews M.A., Greve L.C., Labavitch J.M., y Rost T.L. 2004. Grapevine susceptibility to Pierce's disease II. The progression of anatomical symptoms. *American Journal of enology and viticulture* 55:238-245. (Abstract).
- Tariq, M.A., S. Oswalt, P. Blincoe, y T. Esser. 2002. Proceedings, 2002 Pierce's Disease Research Symposium. California Department of Food and Agriculture, Sacramento, CA. 177 pp.
- Thayer, P.L., y R.E. Stall. 1961. A survey of *Xanthomonas vesicatoria* resistance to streptomycin. *Proc. Fla. Hortic. Soc.* 75:163-65.
- Wong, F., N. Hyder. Sampling for *Xylella fastidiosa* the cause of bacterial leaf scorch. Proyecto: combating the threat of the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* using genome-based methods linked to national and international monitoring. U.C. Riverside, USDA-CREES (ponencia en congreso)
- Zaccardelli, M., A. Saccardi, E. Gambin, U. Mazzucchi. 1992. *Xanthomonas campestris* sp. *pruni* bacteriophages on peach trees and their potential use for biological control. *Phytopathol. Mediterr.* 31:133-40

Anexo 1

Instrucciones para colocar los sistemas Arborjet (Quikjet, Tree IV, Viper)

- Seleccionar las zonas en las que se colocaran los Arborplugs para inyectar el tratamiento. (Cuidar que no sean segmentos muertos ni que comuniquen a ramas muertas)
- Con taladro en mano hacer un agujero por cada Arborplug a colocar. Usar la broca de $\frac{9}{32}$ para Arborplug #3 ó la broca de $\frac{3}{8}$ para Arborplug #4. El agujero debe tener un profundidad de $\frac{5}{8}$ a 2 pulgadas, dependiendo del grosor del tronco.
(Utilizar brocas con bastante filo, de lo contrario se daña mucho el tejido)
- Con la herramienta “set tool” y martillo colocar el Arborplug a la profundidad adecuada. Si se coloca muy profundo se hace daño innecesario, si se coloca muy superficial puede fugar el tratamiento que se aplique. Debe quedar al ras de la superficie, Figura A1-1.
- Armar el sistema de acuerdo a las instrucciones particulares del equipo.
- En el caso del Quikjet y el sistema Viper, basta con purgar y llenar las líneas con el tratamiento. Enseguida introducir la aguja dentro del Arborplug y comenzar a dosificar el tratamiento. Empujar manualmente el mango (Quikjet) o apretar el gatillo (Viper).
- Con el Tree IV, se deben cerrar las 5 válvulas. Conectar la bomba de presión a la válvula de los reservorios y generar presión al máximo. Abrir la válvula principal (reservorio) y después, lentamente, las otras 4 (líneas) para ir purgando y llenando de tratamiento las líneas. Conectar las agujas en los Arborplugs y abrir completamente las válvulas. Dejar el sistema conectado hasta que se vacié el reservorio o se haya dosificado el volumen deseado.
- En cualquiera de los tres sistemas, es importante que no entre aire por las líneas pues esto puede disminuir la entrada del tratamiento. Además el embolismo en xilema es dañino en la planta.
- Retirar los sistemas y limpiarlos de acuerdo al instructivo.
- Los Arborplugs se quedan introducidos en el tronco.
- La información detallada sobre el equipo, instalación y guía de problemas está disponible en la página web de la compañía:

http://www.arborjet.com/index.php/how_to_use/equipment_instructions/

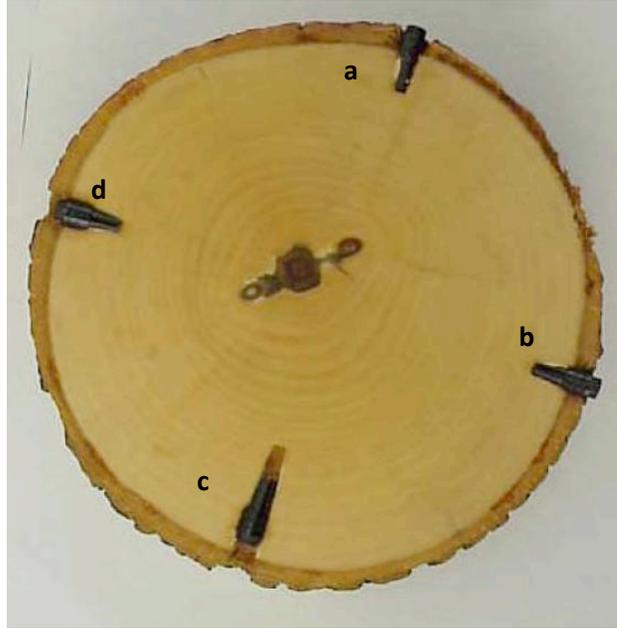


Figura A1-1: Forma de colocar los Arborplugs en el tronco. (a) y (b) Están muy superficiales y puede fugar el tratamiento. (c) Está muy profundo, es daño innecesario. (d) Es correcto, el arborplug queda dentro del borde interno del tronco (imagen tomada del Manual de Arborjet)



Figura A1-2: Manera de introducir las agujas dentro de la válvula Arborplug, una vez insertado en el tronco. (a) Aguja y sistema Quikjet o Viper. (b) Aguja y válvula del sistema Tree IV.

Anexo 2

Extracción y cultivo de *Xylella fastidiosa* en medio sólido

Método de cultivo en Placa PD2

Preparación y esterilización externa del material vegetal

1. De las muestras extraídas del campo, cortar los peciolo de las hojas y colocarlos en un tubo falconde 50 ml con el lado vegetal expuesto hacia el fondo del recipiente.
2. Pesar los peciolo de cada planta, para tener su valor en gramos.
3. A continuación, lavar el material con agua corriente y una gota de Tween 20 por cada 50 ml, mezclarsuavemente por 1 minuto y tirar el sobrenadante.
4. Después agregar la solución de Cloro al 20% y nuevamente una gota de Tween 20, volver a mezclarsuavemente por 1 minuto y tirar el sobrenadante.
5. Luego añadir Alcohol al 70% y tapar el tubo, e inmediatamente después llevar las muestras al interiorde la campana de flujo laminar o a un área estéril como puede ser entre mecheros.
6. Ya en la campana de flujo laminar con ayuda de un recipiente de desechos, decantar el alcohol y

enjuagar con agua estéril destilada, después colocar el peciolo en papel secante estéril.

Maceramiento del material vegetal y extracción de la bacteria.

7. Una vez que el peciolo se encuentra sin humedad, pasarlo a una caja de petri deplástico, cortar el extremo más grueso (el que estaba unido al tallo) y empezar aexprimir con la ayuda de la pinza sujetando la navaja, con la parte contraria al filo de lanavaja, hacia el lado recién cortado.
8. Una vez extraído el líquido interior del peciolo, resuspender en 100µl de TBS, y tomar el líquido conuna micropipeta, y colocarlo en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. Rotular el tubo con el código delpeciolo.
9. En otro tubo eppendorf realizar una dilución de 1:10 (10µl de muestra + 90µl TBS 1X).
10. Aun en la campana de flujo laminar, rotular las cajas PD2 con el código de la planta correspondiente.Primeramente colocar una gota de 25 µl de control negativo (TBS), ydespués colocar 25µl de la muestra concentrada y diluida.
11. Una vez que las tres gotas están en su lugar, inclinar la caja Petri hacia abajo para escurrir las gotas a lo largo de la caja.
12. Una vez que la gota se absorbe en el medio, colocarla boca-abajo a una temperatura de 28-30 °C.

Regularmente el crecimiento de la bacteria es de 7 a 10 días.

Anexo 3

Cuantificación de *Xylella fastidiosa* por ELISA Maceramiento del material vegetal y extracción de la bacteria.

1. Utilizar un bisturí o navaja estéril por cada planta. De las hojas recolectadas, cortar cuidadosamente las venas de las hojas afectadas con la enfermedad.
2. Pesar aproximadamente de 0.2 a 0.5 gramos de tejido vegetal cortado. Cuando es demasiada la cantidad de muestra por pozo, se puede reducir la sensibilidad de la prueba.
3. Agregar buffer de extracción al tejido cortado, en una proporción de 1:10 (g:ml). Por ejemplo, si el peso es de .300 gr, agregar 3ml de buffer de extracción.
4. Macerar los trozos de vena/hoja con mortero y pistilo, hasta lograr extraer el interior donde las bacterias están depositadas.

Kit "PathoScreen Xf" de Agdia

5. En la placa de ELISA, repartir 100 µl de muestra en cada pozo por triplicado (300µl por planta). En los pozos correspondientes a los controles colocar 100 µl del control positivo, y 100 µl del buffer de extracción para control negativo.
6. Incubar la placa en una caja húmeda por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (40C).
7. Preparar la Enzima conjugada*

Nota: Para preparar el diluyente de la enzima conjugada, mezclar el componente MRS con PBST 1X en una proporción 1:4. Para estimar el volumen necesario, prepara 1 ml por cada 8 pozos a usar, o 10 ml por cada 96 pozos. Por cada pozo se utilizan 100 µl de enzima conjugada.

Diluir la enzima conjugada 1:100, por ejemplo, por cada mililitro a utilizar, primero debes colocar 1 ml del diluyente, luego agregar 10 µl de enzima conjugada. Después es importante mezclar la enzima muy bien.

***NOTA: Siempre preparar enzima conjugada dentro de los 10 minutos antes de utilizarla.**

8. Para lavar la placa, hazla girar rápidamente sobre un recipiente de desechos, ten cuidado de no mezclar el contenido de los pozos.
9. Rellenar todos los pozos al tope con PBST 1X, e inmediatamente después girar la placa para vaciarlos pozos de nuevo. Repetir de 4 a 8 veces.
10. Después de lavar, mantener la parte superior de la placa hacia abajo sobre papel para remover las gotas restantes del buffer de lavado.
11. Agregar la enzima conjugada. Repartir 100 µl de la enzima conjugada por pozo.
12. Incubar la placa en una caja húmeda por 2 horas a temperatura ambiente.
13. Como anteriormente, lavar la placa de 4 a 8 veces con PBST 1X.
14. Añadir 100 µl de sustrato TMB en cada pozo. El sustrato debe refrigerarse cuando no está en uso.
15. Incubar la placa en caja húmeda por 20 minutos.
16. Evaluar los resultados

Examinar los pozos observando o midiendo la densidad óptica de las muestras en un lector de placa a 405nm. En los pozos que desarrollan color azul, son resultados positivos. En los pozos que no desarrollan color significativo, indican resultados negativos. Los resultados son válidos solamente cuando los controles dan resultados positivo y negativo.

Anexo 4

Protocolo de fijación para microscopía electrónica de barrido

- Fijación en Glutraldehido (2%) en buffer de cacodilato de sodio (0.1 M, pH 7.2) por 1-2 horas.
- Lavar 3 veces (15 min c/u) con buffer de cacodilato de sodio (0.1 M, pH 7.2)
- Post fijación con tetraóxido de osmio (1%) en buffer de cacodilato de sodio (0.1 M, pH 7.2) por 1-2 horas.
- Lavar 3 veces (15 min c/u) con buffer de cacodilato de sodio (0.1 M, pH 7.2)
- Deshidratación con alcoholes seriados, 10 minutos c/u:

35%; 50%; 70%; 80%; 95%; 100%; 100%

- Desecado al punto crítico.
- Montar en los soportes para el microscopio.
- Hacer el recubrimiento metálico con oro.
- Realizar el escaneo.

Reactivos:

- **Buffer de cacodilato de sodio, 0.1 M, pH 7.2** ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
Preparar una solución stock de cacodilato de sodio (0.2 M) en agua destilada (4.28g en 100 mL). Ajustar el pH con HCl (0.2 M). Guardar a 4°C hasta su uso. Para preparar la solución de trabajo, solo agregar un equivalente de agua destilada para ajustar la molaridad a 0.1.
Nota: debe manejarse con cuidado y evitar cualquier contacto. Este compuesto contiene arsénico.
- **Glutraldehido (2%) en buffer de cacodilato de sodio (0.1M, pH 7.2)**
A partir del stock de glutraldehido al 8%, agregar 25 mL por cada 75 mL de buffer de cacodilato de sodio para obtener la solución de trabajo al 2%. Esta solución debe utilizarse recién preparada.
Nota: el glutraldehido debe manejarse en campana de extracción ya que es extremadamente tóxico.
- **Tetraóxido de osmio (1%) en buffer de cacodilato de sodio (0.1M, pH 7.2)**
A partir del stock de tetraóxido de osmio al 4%, agregar 25 mL por cada 75 mL de buffer de cacodilato de sodio para obtener la solución de trabajo al 1%. Esta solución debe utilizarse recién preparada.
Nota: el tetraóxido de osmio debe manejarse en campana de extracción ya que es extremadamente tóxico.
- **Alcoholes seriados (35%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%)**
A partir de etanol absoluto diluir con agua destilada hasta obtener la concentración (porcentaje) deseado. Por ejemplo: para preparar etanol al 35% diluir 35 mL de etanol absoluto en 65 mL de agua destilada. Guardar a 4°C para evitar que se evapore el etanol.

Anexo 5

Datos de áreas teñidas en cada sistema

A_T = Área Total

A_M = Área Marcada

$\%_M$ = Porcentaje de Área Marcada

\bar{X} = Promedio

Quikjet (1 aplicación/planta)			
	A_T	A_M	$\%_M$
1	n/d	0	0
2	31.14	n/d	n/d
3			
4	44.28	1.14	2.58
5	38.28	0.85	2.23
6	28.28	0.85	3.03
7	19.71	1.42	7.24
8	22.85	1.14	5
9	19.14	1.42	7.46
10	19.42	1.14	5.88
11	21.42	1.71	8
12	25.8	1.42	0.56
13	20.57	1.14	5.55
14	23.42	2.00	8.53
15	18.85	1.71	9.09
16	22.85	1.42	6.25
17	18	n/d	n/d
18	18.57	1.14	6.15
19	20	1.42	7.14
20	16.28	1.71	10.52
21	17.42	0.85	4.91
22	20.28	1.71	8.45
23	18.57	1.14	6.15
24			
25	19.71	1.42	7.24
26	20.85	1.14	5.47
27	29.14	0.85	2.94
X=	32.64	1.31	5.92

Quikjet (4 aplicaciones/planta)			
	A_T	A_M	$\%_M$
1	29.71	0	0
2	21.71	0.57	2.63
3	13.71	0.57	4.16
4	13.42	1.71	12.76
5	13.42	1.71	12.76
6	11.14	2.57	23.07
7	11.42	4	35
8	12.28	2.85	23.25
9	11.42	2.85	25
10	9.71	2.57	26.47
11	11.42	2.85	25
12	14.57	3.42	23.52
13	10	2.57	25.71
14	10.85	3.14	28.94
15	12.85	2.85	22.22
16	11.14	2.28	20.51
17	12.85	2	15.55
18	12.28	1.71	13.95
19	12.85	2	15.55
20	14.85	1.42	9.61
21	19.42	2.28	11.76
22	21.14	0	0
X=	14.19	2.09	18.87

Tree IV (4 aplicaciones/planta)			
	A_T	A_M	%_M
1	n/d	n/d	n/d
2			
3			
4	20	0.28	1.42
5	n/d	n/d	n/d
6	n/d	n/d	n/d
7	n/d	n/d	n/d
8	12	2.85	23.80
9	14	3.14	22.44
10	n/d	n/d	n/d
11	16.28	n/d	n/d
12	12.85	2.85	22.22
13	11.71	2	17.07
14	14.28	2	14
15	15.42	2.28	14.81
16	11.14	2	17.94
17	12.57	1.71	13.63
18	11.42	1.42	12.5
19	11.14	1.42	12.82
20	12.28	2.28	18.60
A	18.57	0.57	3.07
B	15.14	2.57	16.98
C	15.71	1.71	10.90
D	14.57	2.57	17.64
X=	13.92	1.98	14.23

Disp.Xyllakill directo (1/planta)			
	A_T	A_M	%_M
1,2	19.14	2.57	13.43
3	14.57	1.42	9.80
4	12.57	1.42	11.36
5	13.42	1.14	8.51
6	11.71	0.85	7.31
7	12	1.14	9.52
8	10.57	1.71	16.21
9	10	1.14	11.42
10	13.42	1.14	8.51
X=	13.04	1.39	10.70

Disp.Xyllakill directo (4/planta)			
	A_T	A_M	%_M
1	38.28	16.85	44.02
2	26.28	11.71	44.56
3	18.57	7.71	41.53
4	15.71	6.57	41.81
5	15.71	6.28	40
6	14	6.28	44.89
7	17.42	8	45.90
8	14.57	6	41.17
9	13.42	5.42	40.42
10	15.71	6.85	43.63
11	15.42	5.14	33.33
12	16.85	6	35.59
13	15.71	5.71	36.36
14	15.14	6	39.62
15	16	5.42	33.92
16	16.85	7.42	44.06
17	22.57	8.28	36.70
X=	18.13	7.39	40.77

Disp.XyllaKill + Arborplug (1 aplicación/planta)			
	A_T	A_M	%_M
1,2	7.71	0.85	11.11
3	14	1.14	8.16
4	39.71	4.28	10.79
5	33.14	4	12.06
6	21.42	2.85	13.33
6.5	20.28	2.85	14.08
7	17.71	2.57	14.51
8	15.42	2.28	14.81
9	15.42	1.71	11.11
10	17.71	2	11.29
11	18.28	2.57	14.06
12	18.57	2.57	13.84
12.5	19.42	2.57	13.23
13	20.57	2	9.72
14	19.14	2.57	13.43
15	20.28	1.14	5.63
16	24	2.85	11.90
17	25.42	2.57	10.11
X=	20.46	2.41	11.79

Disp. XyllaKill + Arborplug (4 aplicaciones/planta)			
	A_T	A_M	%_M
1	23.71	7.14	30.12
2			
3			
4			
5	16	5.71	35.71
6	16	6	37.5
7	17.14	7.14	41.66
8	14.28	6.28	44
9	15.71	5.71	36.36
10	15.14	5.71	37.73
11	12.85	5.42	42.22
12	17.14	2.85	16.66
13	13.14	6.28	47.82
14	15.42	7.42	48.14
15	14	6.57	46.93
16	18	6	33.33
17	14.57	4.85	33.33
18	18.85	4.85	25.75
19	27.14	6.57	24.21
X=	16.52	5.93	35.91

Anexo 6

Datos de inyección de plantas

2008

Enero				Febrero				Marzo				Abril			
						2.5	0	0	2	5.5	4.75		4	4	3
						2	0.5	0	1.25	2	2.25		2.5	2.5	2.5
						1.5	0.5	0	1.5	2.25	1.1		0	3	1
						3.75	1	0	2.75	2	3		4	4	2.25
						1	.5	0	4	1	1.3		1.75	3.5	2.5
						2	.25	0	1.75	0.75	2.25		3.75	1.75	3.5
						2.12	0.45	0	2.2	2.25	2.45		2.6	3.12	2.45

Mayo				Junio				Julio				Agosto			
5.75	4.25		4.6	5											
2.25	4.25		3.3	2.5											
4.5	2.25		2.25	2.25											
4	3.25		3.75	4.25											
4	2.75		3.1	3.5											
3	2		2.6	3.25											
3.01	3.12		3.29	3.45											

Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre			
		4.5	4.5	4.5	2.5	2.75		0.5	4	4.25	2.25		4.25	2.25	1.5
		1.25	1.8	2.5	2.5	2.5		1.25	3	2.75	2.75		3.75	0	2.8
		5	4.1	3.25	2.75	3		2.25	2.5	3.5	2.4		3	2.25	4.75
		4.5	4.25	4	7.25	3.25		5.3	4.5	2.4	2.5		2.75	2.25	1.35
		3.25	2.5	1.75	2.75	2.75		3	3.5	2.75	1		3.25	2.75	1.5
		3.5	3	2.5	2.75	1		0	3.5	2.4	2		2.25	1.5	3.5
		3.66	3.37	3.08	3.2	2.54		2.05	3.5	3	2.15		3.2	1.66	2.56

2009

Enero				Febrero				Marzo				Abril				
	1.6	1.75	0	2.75		3.5	4.5	0.75	3	3.75	2	3.5	5	4.5	2.5	
	2.7	2.75	2.6	1.75		2.5	1.3	1.5	2.3	4	3.5	2.5	4	2.3	3.3	
	3	1.25	1.8	3.8		3.5	3.25	1.5	1.3	3.75	2.5	2	3.3	3.5	3	
	1.5	1.75	1.5	1.8		1.5	3	1	4.5	3	3	2.3	3	3	2.7	
	2.2	3	3.3	2.25		2.3	2.5	2.25	0	3	3	2.5	5	2	3.7	
	2.6	1.8	2	1		2.5	2.5	2	1.5	3.5	4	2	2.75	2.75	2.5	
	2.3	2.05	1.86	2.22		2.63	2.84	1.57	2.1	3.5	3	2.4	3.84	3	2.95	

Mayo				Junio				Julio				Agosto				
3.2	4		3.25		2.25	1.5	4.5	3.5	3	2.5	2.3		2.25	2.25		1.75
2.6	2		2.35		4.25	5.5	2.75	5	2	5.5	2.7		2.6	2.5		2.75
3.5	4		3.5		2.4	9	2.75	3	1.75	4	3.25		2.25	1.25		2.25
2.1	1.5		2.75		2.5	3	5.5	5	3.5	1.75	2.25		2.3	2.5		1.75
3.6	3.5		2.5		4	1	5	5	3	5	2		2	2		0
2.7	3		2.5		2.5	4	3.75	5	4.5	2.75	2.75		2.5	2.4		2
2.97	3		2.8		2.98	4	4.04	4.41	2.95	3.58	2.54		2.34			

Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre				
3.1		2.8	2.3		4	3.5		3		4		2.75	3.5	3.3	2.8	
3		3.1	2.75		3.5	3.1		2.75		2		5.5	2.3	3.75	4.1	
1.75		2.25	3.1		2.25	3.1		4		6		2.75	5	4.3	3.3	
3.25		2.8	1.8		4	3		2		1.5		0	1.7	0.75	1	
2.5		1.5	2.5		3	4		5		5		2.25	5	3.6	3.6	
2.7		2.5	3		3	3.5		4		2.5		3.25	3.25	2.8	3.6	
2.72		2.52	2.6			3.37							3.4	3.1	3.1	

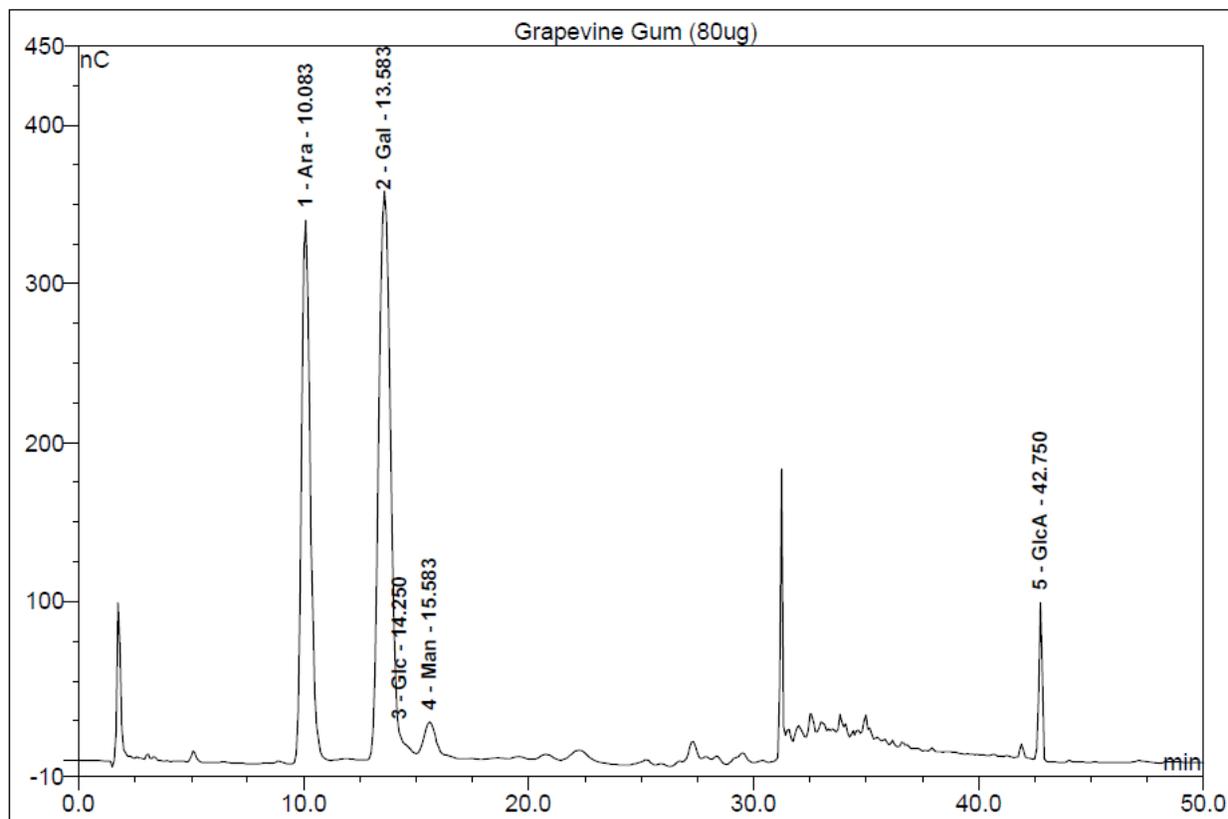
Anexo 7

Relación entre diámetro de planta y volumen inyectado

volumen	diámetro		volumen	Diámetro		Volumen	Diámetro		Volumen	Diámetro
0	13		2	16		2.5	14		3.5	17
0	14.5		2	15		2.6	18		3.5	17.5
0	17		2	17		2.75	12		3.5	14.5
0	18		2	20		2.75	16.5		3.5	15
0.5	15		2.15	15		2.75	15		3.5	17
0.75	18		2.25	14		2.75	16.5		3.5	16
1	16		2.25	14.5		2.75	20.5		3.5	18.5
1	14		2.25	19.5		2.75	16		3.75	14.5
1	18		2.25	13.5		2.75	15.5		4	16
1	16		2.25	17		2.75	16.5		4	14.5
1.25	19.5		2.25	20		2.75	16		4	16.5
1.25	21		2.25	24		2.75	18		4	14.5
1.3	18		2.25	19.5		2.75	18.5		4	13
1.35	17.5		2.25	14		2.8	16.5		4	14.5
1.5	14		2.25	15.5		3	13.5		4.25	14.5
1.5	17		2.3	16		3	14.5		4.25	16
1.5	18		2.3	16		3	17		4.25	16.3
1.5	15		2.4	15		3	19.3		4.25	15
1.5	15.3		2.4	17.5		3	16.3		4.5	14.5
1.5	16.5		2.4	11.5		3	18.5		4.5	16.5
1.5	15		2.5	12		3	16.5		4.5	19.5
1.5	18		2.5	16		3	15.5		4.5	18.5
1.75	14		2.5	15		3	15		4.5	16.5
1.75	19		2.5	17		3.25	14.5		4.75	16.5
1.75	16		2.5	19.5		3.25	15		5	16.5
1.75	17.5		2.5	16.5		3.25	14		5.3	14.5
1.75	19		2.5	17.3		3.25	14		5.75	14.5
1.8	13.5		2.5	15		3.25	15		7.25	16
1.8	15		2.5	17.5		3.3	16.3			
1.8	19		2.5	17		3.3	19			
2	14.5		2.5	14		3.5	16.5			
			2.5	16		3.5	14			

Anexo 8

Análisis proximal

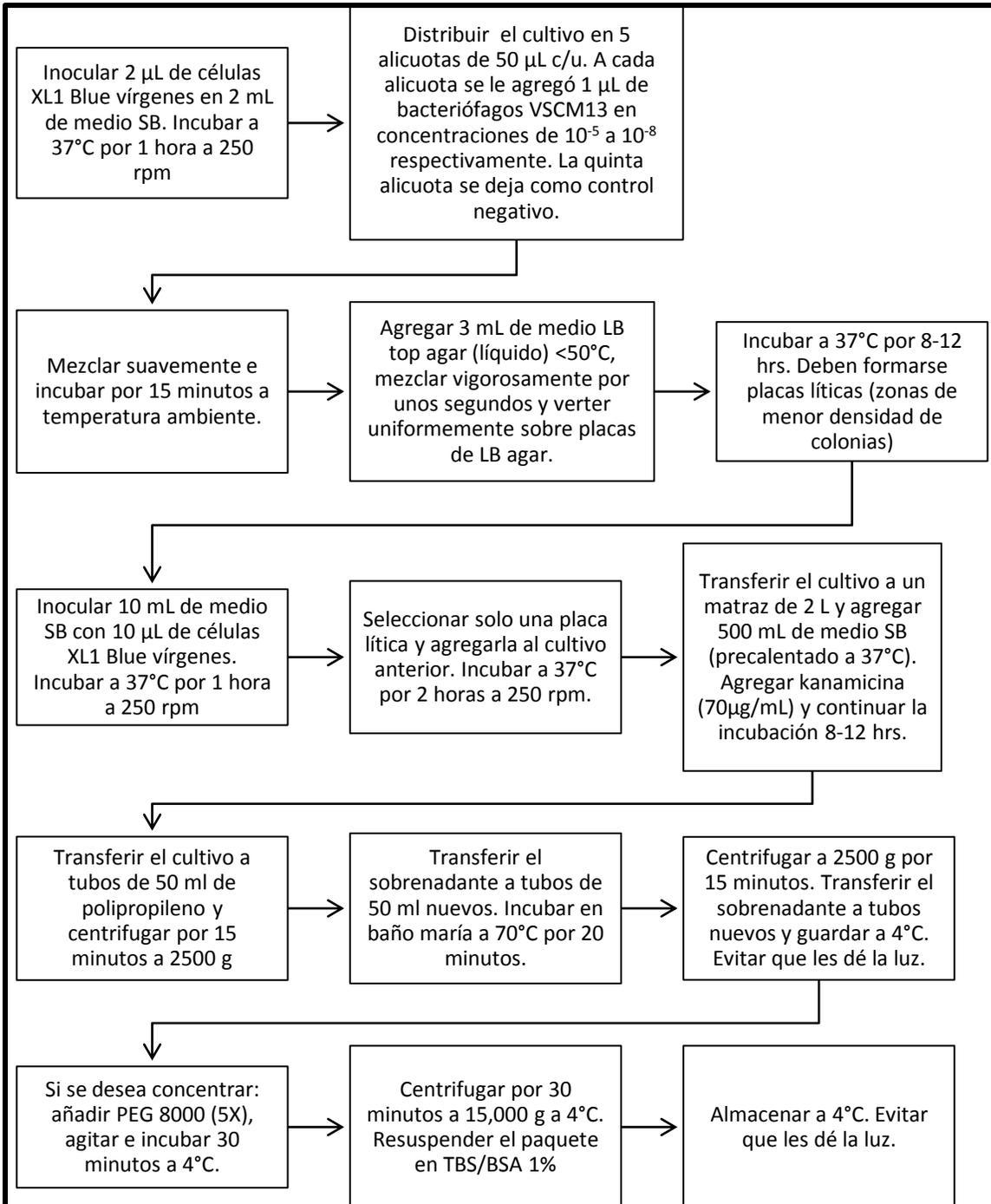


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height nC	Area nC*min	Rel.Area %	Amount nM	Type
1	10.08	Ara	341.333	155.183	39.02	27.797	BMB*
2	13.58	Gal	355.600	210.729	52.98	19.011	BM *
3	14.25	Glc	13.611	3.114	0.78	0.195	MB**^
4	15.58	Man	20.680	11.983	3.01	2.924	BMB*
5	42.75	GlcA	98.934	16.715	4.20	2.722	BMB*
Total:			830.157	397.725	100.00	52.649	

Cromatograma de la muestra por HPAEC-PAD

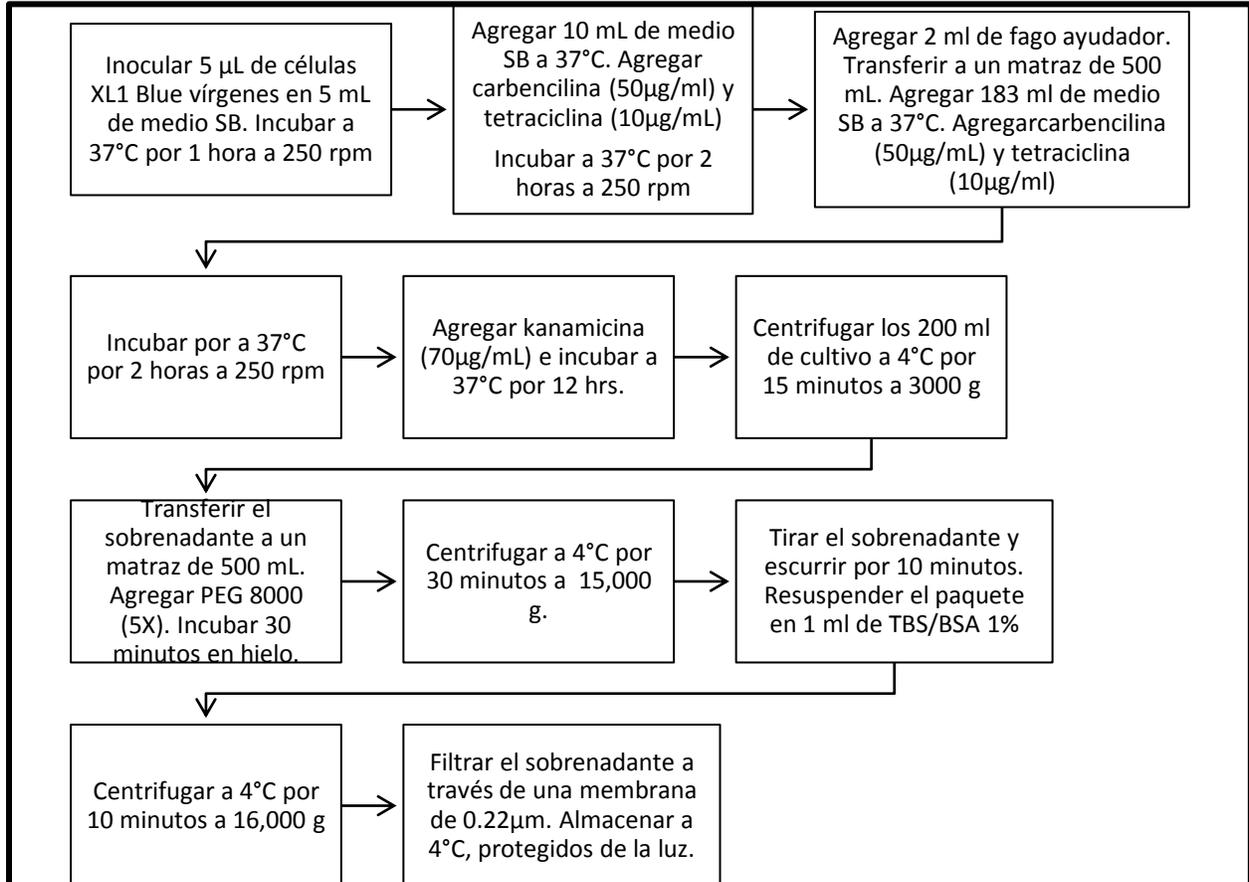
Anexo 9

Protocolo para producción de Fago VCSM13 Helper



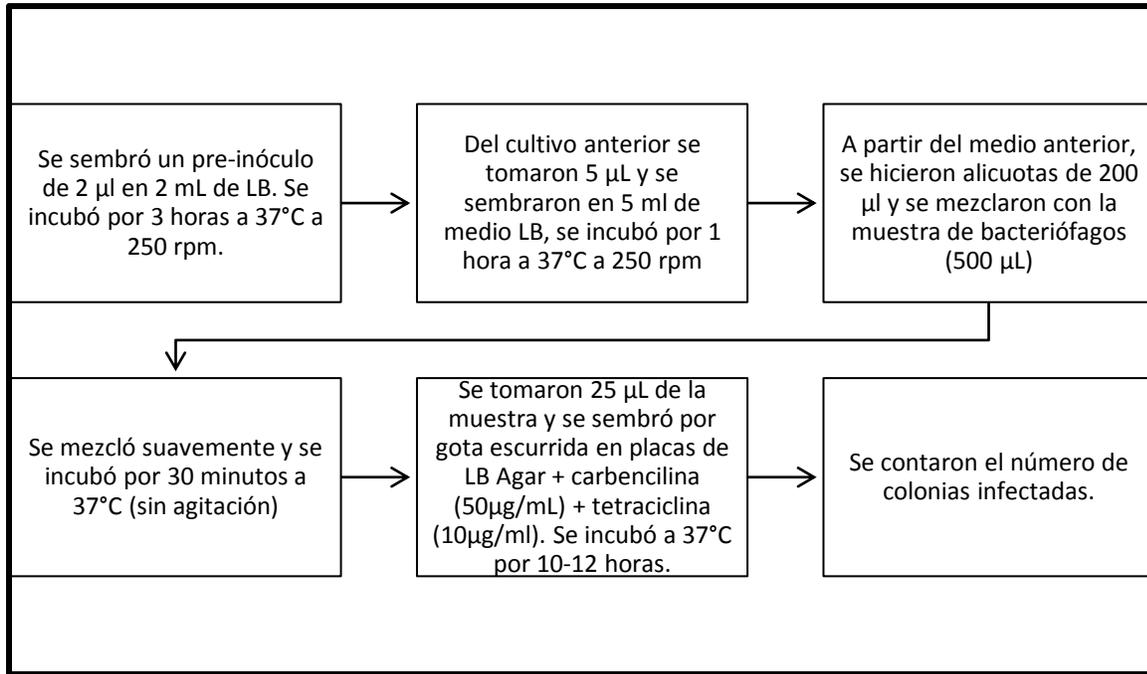
Anexo 10

Protocolo para producción de Fago scFv-CB



Anexo 11

Infección de células con fagos tratados



Apéndice 12

Reactivos y medios utilizados para cultivo de fagos y bacterias.

LB (con o sin Agar)

Para 1 litro disolver lo siguiente en 950 mL de agua destilada:

10 g de triptona

5 g extracto de levadura

10 g NaCl

para LB Agar: 15 g de agar

Previo a la adición del agar, ajustar el pH a 7.0 y aforar a 1 litro

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido

Enfriar a ~55° C y añadir los antibióticos deseados

LB Top Agar

Agregar 0.35 g de Bacto Agar y 1.25 g de medio LB a 50 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave (120°C, 15 psi) por 20 minutos. Guardar a 4°C

SB (Super broth)

Para 1 litro disolver lo siguiente en 900 mL de agua destilada:

30 g triptona

20 g extracto de levadura

10 g de MOPS (3 N-Morfolino) ácido propanosulfónico.

Ajustar pH 7.0 con NaOH

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido.

TBS-BSA 1%

50 mM de Tris-base pH 7.5

150 mM de NaCl

Por cada 100 mL agregar 1 g de Albúmina (BSA)

Esterilizar por filtración (0.22µm). Almacenar a 4° C.

Antibióticos

Tetraciclina: Preparar a 5 mg/mL en etanol
Almacenar a -20°C hasta su uso
La concentración final utilizada es 50 µg/mL

Carbencilina: Preparar a 100 mg/mL en agua desionizada
Almacenar a -20°C hasta su uso
La concentración final utilizada es 50 µg/mL

Kanamicina: Preparar 50 mg/mL en agua desionizada.
Almacenar a -20°C hasta su uso
La concentración final utilizada es 70 µg/mL

5X PEG 8000

Disolver en agua 200 g de Polietilen glicol-8000 (Sigma, No Cat P2139), 150 g de NaCl (2.5 M). Aforar a 1 litro. Mezclar hasta homogenizar. Esterilizar por autoclave (120°C, 15 libras de presión, 15 minutos). Antes de que enfríe (cuidadosamente) agitar el recipiente hasta mezclar bien. No deben quedar 2 fases.

Apéndice 13: Indicadores de cada una de las plantas experimentales.

PLANTA	Sist Apl	Vol Apl	UFP _T	UFC ₂₀₀₈	UFC ₂₀₁₀	UFC ₂₀₀₈ (LOG)	UFC ₂₀₁₀ (LOG)	ELISA ₂₀₀₈	ELISA ₂₀₁₀	Status
-2-5	disp Xyllakill	80	2.50E+14	n/d	0			n/d	0.373	
2-8	Disp Xyllakill/Tree IV	83.5	1.75E+14	1740	n/d	3.241		1.626	0.433	
-4-5	disp Xyllakill	65	1.87E+14	465	1360	2.667	3.134	1.49	1.063	
-4-3	Tree IV/QUIKjet	167.25	1.77E+14	131	11710	2.117	4.069	1.242	0.868	
5-9	Disp Xyllakill/Tree IV	58	2.25E+14	3184	2947	3.503	3.469	1.583	0.273	
5-10	N/T			n/d	0			n/d	0.282	
5-14	PH Viper/QUIKjet	26.5	1.88E+14	136	47	2.134	1.672	1.204	0.251	
5-21	Viper/QUIKjet/Xyllakill	46.75	1.72E+14	35	522	1.544	2.718	1.24	0.977	
-6-25	Disp.XyllaKill	40	1.34E+14	n/d	0			n/d	1.119	
-6-23	N/T			15	n/d	1.176		1.467	0.1	
-6-21	Disp XyllaKill	155	5.36E+14	n/d	0			n/d	0.267	
-6-20	Disp XyllaKill	64	1.34E+14	4	0	0.602		0.885	0.373	
7-5	Disp XyllaKill	85.5	8.62E+11	35,430	900	4.549	2.954	1.786	1.273	
7-6	Disp XyllaKill	0	2.68E+14	27,000	4820	4.431	3.683	1.452	1.404	
-7-26	N/T			3	0	0.477		1.437	0.277	
7-14	N/T			n/d	0			1.454		eliminada
-7-29	N/T			73	6141	1.863	3.788	1.096		
-7-28	N/T			285	5	2.455		1.553		
-7-27	N/T			0	0			0.438	0.376	
-7-25	N/T			382	0	2.582		0.641	0.201	
-7-22	Disp XyllaKill	54.5	1.10E+14	463	1376	2.666	3.139	1.112	0.504	
-7-21	Disp XyllaKill	105.5	4.03E+14	486	n/d	2.687		1.924	0.243	
8-17	N/T				0			n/d	0.273	
8-21	N/T				0				0.201	
8-22	N/T			351	0	2.545		1.483		eliminada

8-24	N/T			2970	0	3.473		1.708	0.611	
-8-18	N/T			1	0			1.434		eliminada
9-9	N/T			215	0	2.332		1.328		seca
9-10	Disp XyllaKill	45.5	3.25E+11	10760	3180	4.032	3.502	1.482	0.276	
9-11	N/T			869	0	2.939		1.481		
9-16	N/T			111	0	2.045		1.336	0.679	
9-17	N/T			144	0	2.158		1.585	0.315	
9-18	N/T			1076	0	3.032		1.418	0.197	
9-29	Disp XyllaKill	0	4.35E+11	150	24110	2.176	4.382	1.639	1.253	
9-30	N/T			681	805	2.833	2.906	1.402	0.401	
-10-40	N/T			83	36	1.919	1.556	1.35	0.248	
-10-28	Disp XyllaKill	47.5	2.72E+11	n/d	0			0.996		eliminada
-10-23	Disp XyllaKill	7.5	2.48E+11	n/d	0			1.257	0.667	
11-26	N/T			3479	8630	3.541	3.936	1.399	0.203	
11-27	N/T			0	0			1.384		seca
11-30	N/T			0	0			0.916	0.255	
11-35	N/T			n/d	0			0.404	0.345	
11-40	N/T			0	0			1.383	0.422	
12-2	N/T			1557	0	3.192		1.145		seca
12-8	N/T			n/d	0			0.514	0.106	
12-33	N/T			14	6	1.146	0.778	1.685	0.226	
12-34	N/T			12	n/d	1.079		0.963	0.476	
12-39	N/T			0	n/d			1.577	0.385	
12-41	N/T			71	120	1.851	2.079	0.937	1.168	
12-42	N/T			132	0	2.121		1.66	0.243	
12-43	Disp Xyllakill/Tree IV	13	2.65E+10	115	99	2.061	1.996	0.735	0.921	
12-44	QUIKjet	20.75		n/d	0			1.833	0.924	
12-49	N/T			n/d	0			1.926	0.351	

-13-44	N/T			835	0	2.922		1.531		seca
-13-27	N/T			0	0			1.337		seca
-13-15	N/T			3	63	0.477	1.799	1.696		seca
-13-12	N/T			299	0	2.476		1.225	0.472	
-13-3	N/T			0	55		1.740	0.725	0.224	
14-2	N/T			492	0	2.692		1.022		
-14-20	N/T			692	106	2.840	2.025	1.542	0.795	
-14-18	N/T			0	0			1.748	0.142	
-14-17	N/T			828	0	2.918		1.255	0.557	
-14-16	N/T			256	79	2.408	1.898	1.587	0.23	
-14-11	N/T			0	0			1.484		seca
15-15	N/T			673	0	2.828		1.177	0.118	
-15-28	N/T			0	0			1.468	0.955	
-15-18	N/T			0	0			0.542	0.256	
16-55	N/T			0	0			1.468	0.593	
-16-39	N/T			45	0	1.653		1.155	0.362	
-16-36	N/T	23.5	4.78E+10	n/d	0			n/d	0.237	
17-13	N/T	10	2.04E+10	90	n/d	1.954		1.488	0.373	
17-16	N/T	???		0	0			1.833	0.958	
-17-27	N/T			132	0	2.121		1.047	0.606	
-17-17	N/T	45	4.17E+11	1	n/d			1.046	0.26	
-17-16	N/T	14.5	2.95E+10	102	0	2.009		1.293	0.753	
18-21	N/T			n/d	0			1.448	0.365	
25-38	N/T			4	0	0.602		0.844	0.269	
26-49	N/T	25	5.08E+10	12	0	1.079		1.674	0.793	
26-35	N/T			n/d	0			1.008		
26-21	N/T	49	1.22E+11	>10,000	0			1.294	0.369	
26-22	N/T	40	8.14E+10	295	0	2.470		1.805	1.113	

26-38	N/T	n/d		1829	0	3.262		1.495		
27-44	Disp XyllaKill	82.5	2.02E+13	515	0	2.712		1.477	0.274	
27-45	Disp XyllaKill	117		n/d	0			1.502	0.74	
27-52	N/T			8	0	0.903		0.807	0.347	
27-82	N/T			19	0	1.279		1.107	0.904	
27-84	N/T			21	0	1.322		1.383	0.246	seca
28-104	Disp XyllaKill	126.5	7.69E+13	3	0	0.477		0.882	0.451	
28-50	Disp XyllaKill	48.5	1.86E+11	157	2320	2.196	3.365	1.822	1.168	
28-33	Disp XyllaKill	46.5	3.12E+14	1455	0	3.163		1.611	1.066	
28-32	Disp XyllaKill	35.5	3.48E+13	1344	3450	3.128	3.538	1.39	1.348	
29-17	N/T			60	0	1.778		1.77		seca
29-26	N/T			1248	0	3.096		1.393	0.332	seca
29-42	Disp XyllaKill	16.5	8.34E+11	80	0	1.903		1.514	0.568	
29-51	Disp XyllaKill	54	3.98E+11	346	0	2.539		1.523	0.25	
30-25	N/T			889	0	2.949		1.251	0.375	
30-70	N/T			n/d	0			0.828		eliminada
-30-12	N/T			0	0			1.475	0.833	
31-62	N/T			51	0	1.708		1.238	0.383	
31-63	N/T			10	0	1.000		1.688	0.34	
31-51	Disp XyllaKill	4	3.74E+10	n/d	0			1.262	0.81	
31-48	Disp XyllaKill	52.5	1.34E+14	1	12850	n/d	4.109	1.111	1.166	
31-17	Disp XyllaKill	0		18	0	1.255		1.794		eliminada
31-36	N/T			24	0	1.380		1.058	0.496	

N/T = No tratada UFP_T = Unidades Formadoras de Placa (Totales) UFC = Unidades Formadoras de Colonia