

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



EFFECTO DE BACTERIÓFAGOS EXPRESANDO MOLÉCULAS EN CONTRA DE *Xylella fastidiosa* EN DOS VARIEDADES DE VID: CABERNET SAUVIGNON Y RED GLOBE.

TESIS QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

SHARON ELISA MARIA SILVA VALDÉS

Ensenada, Baja California, Diciembre de 2012.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

EFFECTO DE BACTERIOFAGOS EXPRESANDO MOLÉCULAS EN CONTRA DE
Xylella fastidiosa EN DOS VARIEDADES DE VID:
CABERNET SAUVIGNON Y RED GLOBE

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA:

SHARON ELISA MARÍA SILVA VALDÉS

APROBADO POR:



DR. JOSÉ LUIS STEPHANO HORNEADO
DIRECTOR DE TESIS



DRA. AMELIA PORTILLO LÓPEZ
SINODAL



DRA. RUFINA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ
SINODAL

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de *X. fastidiosa*, y la verificación de las secuencias nucleotídicas de los fagémidos

Tabla II. Tratamiento en plantas de Cabernet Sauvignon infectadas con *X. fastidiosa*, con diversos fagos, con diferentes tiempos de infección y aplicación de dosis. Las dosis fueron con 7 días de separación

Tabla III. Fechas de aplicación de los distintos tratamientos de fagos Helper, scFv, scFv-CP1 y scFv-CB en la variedad Cabernet Sauvignon, y de extracción de muestras, primera y segunda

Tabla IV. Tratamiento en plantas de Red Globe infectadas con *X. fastidiosa*, con diversos fagos, con diferentes tiempos de infección y aplicación de dosis. Las dosis fueron con 10 días de separación

Tabla V. Fechas de aplicación de los distintos tratamientos de fagos Helper, scFv, scFv-CP1 y scFv-CB en la variedad Red Globe

Tabla VI. Eliminación de *X. fastidiosa* en plantas de Cabernet Sauvignon en fase Preinfección, tratadas y muestreadas con los diversos fagos en año 2006, y remuestreadas en 2007

Tabla VII. Eliminación de *X. fastidiosa* en plantas de Cabernet sauvignon en fase Postinfección, tratadas y muestreadas con los diversos fagos en año 2006, y remuestreadas en 2007

Tabla VIII. Eliminación de *X. fastidiosa* en plantas de Cabernet Sauvignon en fase Postsíntomas, tratadas y muestreadas con los diversos fagos en año 2006, y remuestreadas en 2007

Tabla IX. Eliminación de *X. fastidiosa* en plantas de Red Globe, tratadas con los diversos fagos

Tabla X. Porcentaje de la relación de síntomas en hojas con la presencia de bacterias en peciolo colectados en fase postinfección con plantas de Red Globe por cada tratamiento con los diversos fagos

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Vector fasmídico pComb3x. Vector para despliegue en fagos 3+3

Fig. 2. Esquema del procedimiento del experimento en las plantas de vid.

Fig.3. Alineación de las tres secuencias nucleotídicas y de aminoácidos del scFv, scFv-CP1 y scFv-CB.

Fig. 4. Tratamiento preinfección en plantas de Cabernet Sauvignon con diversos fagos contra *X. fastidiosa*.

Fig. 5. Recuento en plantas de Cabernet Sauvignon, después de 1 año con 15 días con un periodo de dormancia, desde que se trataron antes de la infección con *X. fastidiosa*.

Fig. 6. Diferencias después de 1 año y 8 meses en el rebrote de las plantas de Cabernet sauvignon, tratadas con diferentes fagos en fase Preinfección.

Fig. 7. Plantas de Cabernet sauvignon sin infectar con *X. fastidiosa* tratadas con fagos scFv-CB

Fig. 8. Tratamiento preinfección con diversos fagos contra *X. fastidiosa*, en plantas de Cabernet sauvignon.

Fig. 9. Recuento en plantas de Cabernet sauvignon, después de 1 año con 15 días con un periodo de dormancia,

Fig. 10. Diferencias después de años en el rebrote de las plantas de Cabernet Sauvignon, tratadas con diferentes fagos en fase Postinfección.

Fig. 11. Tratamiento postsíntomas con diversos fagos contra *X. fastidiosa*, en plantas de Cabernet Sauvignon.

Fig. 12. Recuento en plantas de Cabernet Sauvignon tratadas con las diversas construcciones de fagos, pertenecientes a la fase de postsíntomas

Fig.13. Diferencias después de dos años en el rebrote de las plantas de Cabernet Sauvignon, tratadas con diferentes fagos en fase Postsíntomas.

Fig. 14. Tratamiento en fase de preinfección con los diferentes fagos contra *X. fastidiosa* en la variedad Red Globe.

Fig. 15. Distribución de *X. fastidiosa* por nodo en los peciolo de plantas de Red Globe

Fig. 16. Plantas de Red Globe tratadas con diferentes fagos en fase preinfección con *X. fastidiosa*, registradas después de 7 meses de la aplicación del tratamiento

Fig. 17. Tratamiento en fase de postinfección con los diferentes fagos contra *X. fastidiosa* en Red Globe.

Fig.18. Distribución de *X. fastidiosa* por nodo en los peciolo de plantas de Red Globe tratadas con los diversos fagos y no tratadas en postinfección.

Fig. 19. Plantas de Red Globe tratadas con diferentes fagos postinfección con *X. fastidiosa* registradas después de 9 meses.

Fig. 20. Ejemplos de las colectas de las hojas del área de muestreo en cada uno de los tratamientos con los diversos fagos en plantas de Red Globe en fase postinfección.

Fig. 21. Tratamiento en fase de postsíntomas con los diferentes fagos contra *X. fastidiosa* en Red Globe.

Fig. 22. Distribución de *X. fastidiosa* por nodo en los peciols en plantas de Red Globe tratadas con los diversos fagos y no tratadas, en postsíntomas.

ÍNDICE

1. Introducción.....	10
2. Antecedentes.....	13
3. Objetivo.....	16
4. Hipótesis.....	17
5. Metodología.....	18
5.1. Cultivo de <i>X. fastidiosa</i>	18
5.2. Producción y purificación de fagos.....	19
5.3. Secuenciación de fagémidos.....	23
5.4. Cultivo de plantas de vid.....	23
5.5. Infección de plantas de vid.....	24
5.6. Experimentos con Cabernet Sauvignon.....	24
5.7. Experimentos con variedad Red Globe.....	28
5.8. Procesamiento de muestras de peciolo para extracción de savia.....	31
5.9. Análisis estadístico.....	33
6. Resultados.....	34
6.1. Secuenciación de los fagémidos utilizados en contra de <i>X. fastidiosa</i>	34
6. 2. Pruebas en invernadero con los distintos fagos en contra de <i>X. fastidiosa</i> en plantas de vid Cabernet Sauvignon.....	36
6.2.1. Preinfección en Cabernet Sauvignon.....	36
6.2.2. Postinfección en Cabernet Sauvignon.....	44
6.2.3. Postsíntomas en Cabernet Sauvignon.....	50
6.3. Pruebas en invernadero con los distintos fagos en contra de <i>X. fastidiosa</i> en plantas de vid Red Globe.....	55

6.2.1. Preinfección en Red Globe.....	55
6.2.2. Postinfección en Red Globe.....	61
6.2.2.1. Relación de hojas sintomáticas con número de colonias obtenidas en fase postinfección en plantas de vid Red Globe.....	66
6.2.3. Postsíntomas en Red Globe.....	69
7. Discusiones.....	73
8. Conclusiones.....	83
9. Literatura citada.....	84
10. Apendice A.....	89
11. Apendice B.....	93
12. Apendice C.....	95
13. Apendice D.....	97

1. INTRODUCCION

Xylella fastidiosa se ha convertido en un importante patógeno de diversas plantas de interés comercial. Una de las epidemias más graves que ha ocasionado, es la enfermedad de Pierce (EP) de la vid, *Vitis vinifera*. Esta es una amenaza grave para la industria vitivinícola de Baja California, y el resto de las zonas donde se produce vid, como son los estados de Aguascalientes, Coahuila, Chihuahua, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, Sonora y Zacatecas. En E.U.A., se presenta principalmente de manera grave en California y Florida, ocurriendo en todos los estados del sur donde se cultiva vid. Además de la existencia de la cepa de EP, están otras que ocasionan enfermedades en cítricos, como ocurre en Brasil, Argentina, etc., cultivos de café, almendro, alfalfa, durazno, etc., las cuales ocurren en distintos países del continente americano. Todas estas enfermedades son transmitidas por insectos vectores, comunes o introducidos al sitio. Los principales son miembros de la familia Cicallidae, homópteros llamados comúnmente chicharritas, los cuales se alimentan exclusivamente de la savia del xilema. Las bacterias pueden persistir en el aparato bucal del insecto durante toda su vida, pero se pueden perder en el proceso de muda y luego volver a adquirirlas al alimentarse de plantas infectadas (Davis *et al.*, 1977; Wells *et al.*, 1987; Rodrigues da Silva *et al.*, 2001; Hopkins y Purcell, 2002; Costa, *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2008).

X. fastidiosa es una bacteria gram-negativa, habita exclusivamente en los vasos del xilema, donde forma agregados de colonias por medio de la producción de una matriz que forma una biopelícula que permite su adhesión a las paredes de sus hospederos causando la oclusión de los vasos donde fluye la savia de la cual se alimenta (Chatterjee *et al.*, 2008).

Los síntomas que presenta en la vid son la quemadura en el margen de las hojas, que aún verdes se tornan cafés con partes adyacentes de amarillas a rojas, pecíolos sin hojas, crecimiento irregular de tallos con manchas cafés, desarrollo tardío con tallos cloróticos y frutos deshidratados (Agrios, 2005). La susceptibilidad varía entre las variedades de vid, pero en todas causa finalmente la muerte de la planta (Hopkins y Purcell, 2002).

La enfermedad de Pierce se detectó desde 1995 en el municipio de Ensenada, Baja California, por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) por medio de la Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-CNRF, 2011) considera que son productos de cuarentena parcial las estacas, sarmientos y barbados de vid, sin injertar y deben ser producidos en instalaciones certificadas, además de que en los estados donde se produce vid se deberán establecer parcelas “centinelas”, donde se requiere el monitoreo de la presencia de la bacteria y sus insectos vectores. Además, pone en alerta otros cultivos como son el durazno y almendro, entre otros, que pueden enfermar debido a esta bacteria.

Como alternativa para el combate la EP, se utilizaron bacteriófagos VCSM13 que expresan un anticuerpo scFv (por sus siglas en inglés fragmento variable de cadena sencilla) en contra *X. fastidiosa*, que solo o unido a péptidos líticos, Cecropin B (CB) y Cecropin (CP1), se expresaron en fagos filamentosos, VCSM13. Anteriormente, estas cuatro formas de fago mostraron actividad en contra de este patógeno, en experimentos *in vitro*, a tiempos y concentraciones diferentes (Silva-Valdés, 2008). Por tanto, se evaluó la

efectividad de estos fagos bajo condiciones de invernadero, en dos variedades de vid: Cabernet Sauvignon y Red globe, las cuales se infectaron artificialmente. Los tratamientos se aplicaron directamente al sistema vascular.

2. ANTECEDENTES

Los métodos más comunes para combatir al patógeno de la enfermedad de Pierce, son los de la poda o la destrucción de las plantas enfermas. Sin embargo la eliminación de las poblaciones del vector en el área de cultivo es necesaria, pues pueden transmitir la bacteria a un indiscriminado número de plantas (Purcell, 1981; Purcell y Saunders, 1999). Se ha probado que la aplicación de insecticidas ha sido de algún modo efectiva en la reducción de los mismos. El eliminar la hierba hospedera en los sitios de cultivo, ha ayudado a disminuir la presencia de estos dentro de estas áreas (Purcell y Frazier, 1985; Bethke, *et al.*, 2001).

En las regiones de California y Baja California la ocurrencia de la enfermedad es por sitios localizados a manera de parches, y está relacionada con la cercanía a zonas riparias, en donde los insectos frecuentan estos lugares en donde llegan a existir reservorios de *X. fastidiosa* (Hill y Purcell, 1995; Purcell y Saunders, 1999; Hopkins y Purcell, 2002). Dado que en estas regiones se ve limitado el crecimiento de la bacteria debido a los inviernos fríos, el uso adecuado de las zonas de cultivo a estas áreas ha servido para un mejor manejo de la enfermedad (Hopkins y Purcell, 2002; Lieth, *et al.*, 2011).

Se ha probado el uso de avispas parasíticas y entomopatógenos de los vectores en alternancia a los insecticidas, pero históricamente estos no han sido efectivos en contra de las chicharritas.

Otra opción ha sido la elección de variedades menos susceptibles a la enfermedad, en sitios donde ésta ya se ha presentado (Agrios, 2005). En la región de Florida, E.U.A.. donde la enfermedad se propaga a altas tasas, se han generado híbridos resistentes con *Vitis rotundifolia* (Hopkins *et al.*, 1974 en

Hopkins y Purcell, 2002), la cual presenta cierta tolerancia. Sin embargo, las variedades muy susceptibles no presentan defensa a la enfermedad.

En la aplicación de sustancias antimicrobianas introducidas a la planta, el uso de antibióticos como es la oxitetraciclina se ha usado desde hace más de tres décadas para eliminar a *X. fastidiosa* de plantas de vid (Agrios, 2005) y otros más se han probado y han resultado efectivos en inhibir el crecimiento de la bacteria *in vitro*, como son la gentamicina, ampicilina, kanamicina, novobiocina, cloranfenicol y rifampin (Kuzina *et al.*, 2006).

Scorza *et al.* (2001) generaron plantas transgénicas de uva Thompson sin semilla que expresaban varios insertos del gen del péptido lítico Shiva I; aquellas que contenían cuatro insertos de este péptido mostraron, ser las más resistentes al patógeno. No ha sido fácil la aceptación de plantas transgénicas en la vinicultura por parte del público.

Anteriormente se probó *in vitro* un anticuerpo scFv de gallina anti-*X. fastidiosa*, solo o unido al péptido lítico CP1 de 31 residuos, aislado del nemátodo *Ascaris* spp. (Andersson *et al.*, 2003; Brogden *et al.*, 2003), y que fueron expresados en bacteriófagos (fagos) VCSM13 (Silva-Valdés, 2008). Estos experimentos demostraron que estas moléculas expresadas en fagos producían efecto eliminatorio. Los fagos scFv-CP1 eliminaron a una concentración de 3.6×10^5 fagos/célula con 24 horas de incubación. A esta misma concentración el fago scFv tardó más de 48 horas y fago ayudador VCSM13 (Helper) a esta misma concentración después de 48 horas solo inhibió parcialmente a *X. fastidiosa* (Silva-Valdés, 2008). Alternativamente, otro péptido lítico, CB, que demostró tener en experimentos independientes efecto *in vitro* sobre la bacteria (Andersen *et al.*, 2004). Se ligo CB de manera recombinante al mismo scFv y

probado *in vitro* elimino a *X. fastidiosa* a una concentración de 2.6×10^7 en 12 horas. Debido a que todos los componentes fago, scFv y péptido lítico inhiben o eliminan dependientes del tiempo y concentración al patógeno, se propuso su aplicación en plantas enfermas con *X. fastidiosa*. Para este trabajo, se utilizó la cepa Baja (Almeida y Purcell, 2003), aislada del Valle de Guadalupe. En tiempos distintos de infección, se probaron los fagos modificados para combatir a la bacteria, con varias dosis de los mismos. Se utilizó la variedad de vid Cabernet Sauvignon por ser una de las más producidas en la región, así también por ser considerada como susceptible intermedia a la enfermedad y Red Globe se considera muy susceptible a la enfermedad (Hopkins y Purcell, 2002).

Las moléculas como los fragmentos de anticuerpo y los péptidos antimicrobiales expresadas en fagos o en forma soluble aplicados en plantas de vid son una gran ventaja ya que no tienen efecto residual y pueden degradarse después de un tiempo, además este sistema puede ser una alternativa para combatir otras enfermedades causadas por otras cepas de *X. fastidiosa* y otros géneros de bacterias fitopatógenas. Actualmente la aplicación de bacteriófagos en alimentos de consumo humano se considera no peligrosa e inocua ya que no se ha hallado que tengan repercusiones negativas importantes en humanos (Inal, 2003; Hagens y Loessner, 2007). En los Estados Unidos de América recientemente la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) aprobó la aplicación de ciertos bacteriófagos líticos como medida higiénica en alimentos vegetales susceptibles de contaminación por patógenos bacterianos humanos (Hagens y Loessner, 2007).

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de bacteriófagos que expresan moléculas construidas en contra de *X. fastidiosa* en dos variedades de vid cultivadas en invernadero, Cabernet Sauvignon y Red Globe.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto del tratamiento con el bacteriófago que expresa scFv en contra de *X. fastidiosa*, en distintas fases de infección; antes de la infección, después de la infección y después de presentarse los síntomas, en dos variedades de vid.
- Evaluar el efecto del tratamiento con el bacteriófago scFv-CB, en distintas fases de infección, antes de la infección, después de la infección y después de presentarse los síntomas, en dos variedades de vid.
- Evaluar el efecto del tratamiento con el bacteriófago scFv-CP1, en distintas fases de infección, antes de la infección, de la infección y después de presentarse los síntomas, en dos variedades de vid.
- Evaluar el efecto del tratamiento con el bacteriófago VCSM13, sin moléculas foráneas, en distintas fases de infección, antes de la infección, después de la infección y después de presentarse los síntomas, en dos variedades de vid.

4. HIPOTESIS

Las plantas de vid infectadas con *X. fastidiosa*, presentarán reducción o eliminación del número de bacterias, al ser tratadas con las diversas construcciones del bacteriófago expresando las moléculas de anticuerpo scFv anti-*X. fastidiosa*, scFv anti-*X. fastidiosa* unido al péptido CP1, scFv anti-*X. fastidiosa* unido al péptido CB, o bacteriófago solo.

5. METODOLOGIA

5.1. Cultivo de *X. fastidiosa*

La cepa *X. fastidiosa* Baja fue crecida a partir de un criopreservado almacenado a -80°C en medio de cultivo PW (Davis, *et al*, 1981) con glicerol al 20% (Apéndice B). Esta cepa proviene de muestras de plantas de vid enfermas de la zona de Valle de Guadalupe que se aislaron en el laboratorio de A. Purcell en la Universidad de California en Berkeley, E.U.A.. Para los experimentos de infección con plantas, los cultivos de *X. fastidiosa* se iniciaban de estas reservas, se descongelaban, se tomaban 10 μ l y se sembraban por gota escurrida; en un extremo de la caja se ponía la gota del cultivo y se extendían a lo largo del medio sólido. Las colonias resultantes se sembraron tomando colonias con la punta de un palillo de madera estéril en tubos de 50 ml con 10 ml de medio líquido PW (Apéndice B), y se incubaron a 28°C por 10 días. Se determinó la concentración de células por mililitro, por absorbancia a 600 nm, considerando que 0.1 de densidad óptica (Absorbancia) son 1×10^8 células por mililitro.

La autenticidad de la bacteria fue corroborada utilizando los primers específicos RST31 y RST33 (Minsavage *et al.*, 1994), que amplifican la región del genoma 726,358-727,078 de *X. fastidiosa* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). La mezcla de la reacción de PCR fue la siguiente; en una reacción de 50 μ l se mezclaron con vortex 25 μ l de Master Mix ABgene[®], 1 μ l de cebador delantero RST31 (50 pmoles), 1 μ l de cebador reverso RST33 (50 pmoles) (Tabla I) y 23 μ l de agua libre de nucleasas. Se mezcló con vortex y se agregó una porción de la colonia de bacterias tomada con la punta de un palillo de madera estéril, se volvió a

mezclar con vortex. Los parámetros fueron un tiempo inicial de 3 minutos a 94° C, con 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 55° C y 2 min a 72° C.

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de *X. fastidiosa*, y la verificación de las secuencias nucleotídicas de los fagémidos

Cebador	Secuencia del Cebador	Función que realiza
RST31*	5'-GCGTTAATTTTCGAAGTGATTGCGATTGC-3'	Sitio 727,051-727,078 dentro del genoma de <i>X. fastidiosa</i>
RST33*	5'-CACCATTTCGTATCCCGGTG-3'	Sitio 726,358-726,376 dentro del genoma de <i>X. fastidiosa</i>
Ompseq ⁺	5'-AAGACAGCTATCGCGATTGCAG 3'	Sentido del sitio dentro del vector pComb3X para secuenciar el fragmento de interés scFv y adiciones
Gback ⁺	5'-GCCCCCTTATTAGCGTTGCCATC 3'	Antisentido del sitio dentro del vector pComb3X para secuenciar el fragmento de interés scFv y adiciones

*Minsavage *et al.* 1994

⁺Barbas, *et al.*, 2001

5..2. Producción y purificación de fagos

El scFv que reconoce a la bacteria *X. fastidiosa* se seleccionó y expresó en fagos por la técnica de despliegue en fagos (Barbas, *et al.* 2001)), a partir de genes de gallina (Datos no publicados) en contra de la cepa STL, la cual causa la enfermedad de Pierce en la vid (Almeida y Purcell, 2003). Este a su vez se ligó al péptido lítico cecropin P1 (CP1) (Silva-Valdés, 2008). De la misma

manera se produjo el scFv unido al péptido lítico Cecropin B (CB) (Datos no publicados). La técnica de despliegue en fagos utiliza el vector pComb3x (Figura 1) el cual lleva la secuencia del gen de la proteína pIII de la cápside del fago M13. Los fragmentos de interés son ligados a este vector plasmídico junto a este gen para que se exprese a su vez en la superficie del fago. Se transforman células de *E. coli* XL1Blue con esta construcción y se infectan con el fago VCSM13 (Helper) para produzcan partículas de fagos que expresan las moléculas de interés en la superficie.

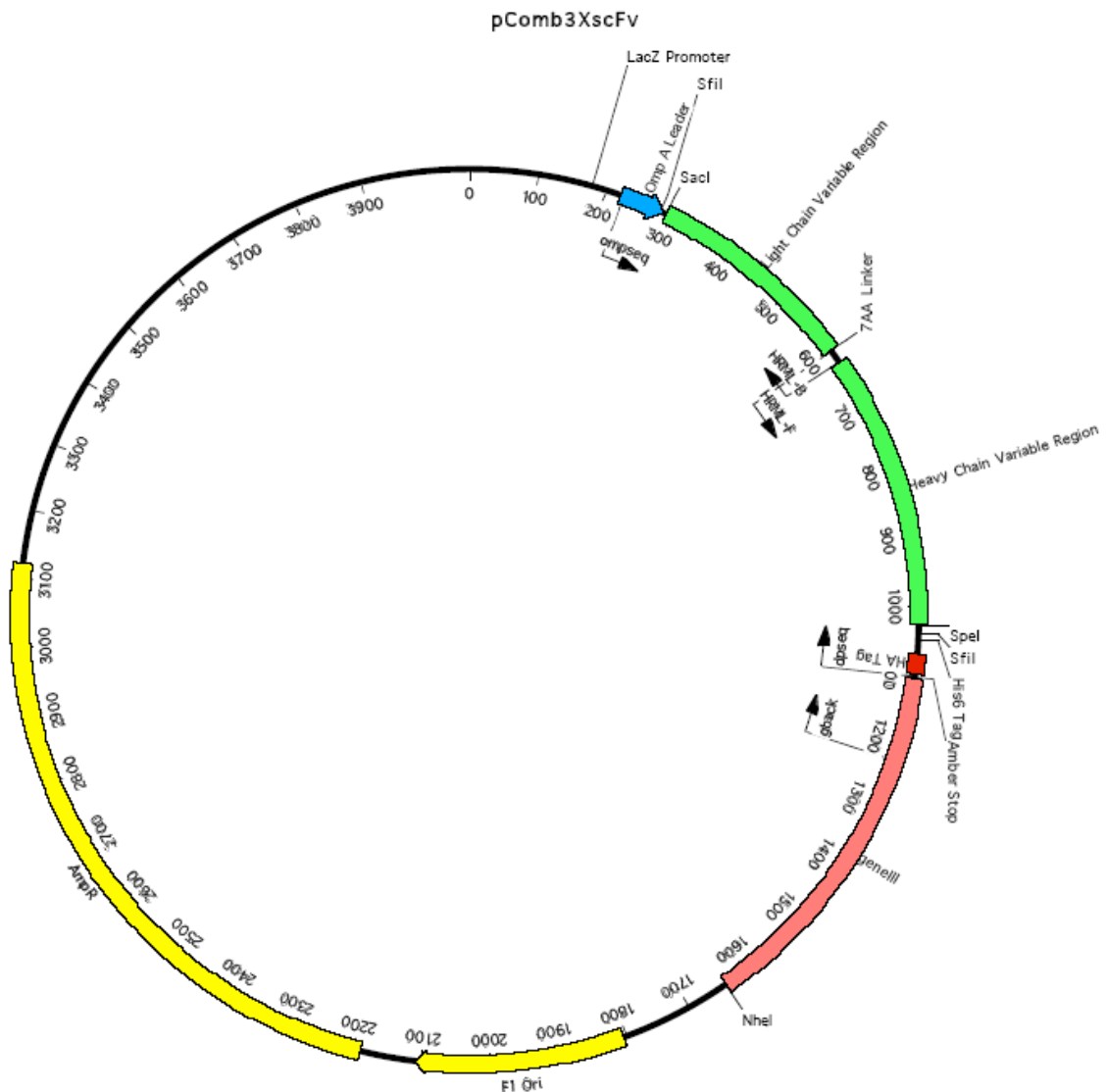


Fig. 1. Vector fasmídico pComb3x. Vector para despliegue en fagos 3+3: que significa que la proteína foránea no se despliega en todas las proteínas pIII. Diseñado para expresar fragmentos de anticuerpos (scFv) y otras proteínas sobre la superficie de fagos filamentosos o para la expresión como proteínas solubles. Los scFv están fusionados con el dominio C-terminal a la proteína de cubierta menor (pIII). El scFv es dirigido al periplasma por el péptido señal *ompA*. Dos asimétricos sitios de restricción de la enzima *Sfi* I permiten la clonación direccional del scFv en un solo paso. El codón ámbar ha sido insertado entre el sitio 3' de restricción *Sfi* I y el 5' del *gen III*. Esto permite la expresión de la proteína soluble (con un inductor de LacZ) en cepas de *E. coli* no supresoras (por ejemplo TOP10F'), sin tener que eliminar el fragmento del *gen III*. La marca de 6x histidinas (HIS) ha sido insertada en el sitio C-terminal del fragmento de interés para la purificación de la proteína. Una marca del decapeptido de hemaglutinina de influenza YPYDVPDYAS (HA) ha sido insertada al final del extremo 3' de la marca HIS para detección usando anticuerpo anti-HA (Barbas *et al.*, 2001).

Para iniciar el cultivo de cada uno de los bacteriófagos, se resuspendieron 1×10^6 células de *E. coli* XL1Blue conteniendo los plásmidos pComb3x de cada correspondiente construcción, que pueden provenir de un criopreservado previamente cuantificado, en 5 ml de medio de cultivo SB y se incubaron 1 hora a 37°C. Se agregaron 10 ml de medio SB (Apéndice B) con carbencilina (20 µg/ml concentración final) y tetraciclina (10 µg/ml concentración final). Una hora después se agregó 4.5 µl de carbencilina (100 mg/ml). Se agregó una hora después 2 ml de fago ayudador VCSM13 (Helper), y luego de 15 minutos de incubación se transfirió todo a un frasco de 500 ml con 183 ml de SB, 92.5 µl de carbencilina y 370 µl de tetraciclina. Se incubó el cultivo por 2 horas más. Se agregó 280 µl del antibiótico kanamicina (50 mg/ml). Se dejó incubando a 37°C a máxima agitación por 12 horas.

Los fagos producidos en 200 ml de cultivo, después de 12 horas de cultivo, se centrifugaron a 3000 x g en rotor de columpio (Sorvall RC 5B PLUS) por 15 min a 4 °C. Al sobrenadante transferido en un frasco de 500 ml se le añadió 50 ml de polietilenglicol 5x (PEG-8000 al 20 %) frío y se dejó incubando por 30 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 15,000 x g en rotor de columpio (Sorvall RC 5B PLUS) por 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y los tubos que lo contenían se invirtieron en papel secante, dejando secar el paquete del fondo del tubo al aire por 10 min. El paquete se resuspendió en 2 ml de TBS-BSA 1%, para luego ser centrifugado a 16,000 x g a 4° C. Este sobrenadante que contenía los fagos se pasó por un filtro de 0.22 µm y se almacenó a 4 °C. Se cuantificaron los fagos con la fórmula: absorbancia a 269 nm x 6×10^{16} / número de nucleótidos de genoma (vector + inserto). Los volúmenes de los fagos eluidos variaron en cada lote producido. Para cada

aplicación, los fagos fueron mantenidos a 4 °C y los viales cubiertos con papel aluminio antes de ser introducidos en las plantas.

5.3. Secuenciación de fagémidos

Para corroborar el correcto marco de lectura de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de interés introducidos para cada uno de los fagémidos construidos, se secuenciaron por el equipo robotizado de la empresa Eton Bioscience Inc. (www.etonbio.com) en San Diego, California, EE.UU. El análisis de la secuencia nucleotídica a partir de las regiones ompseq y gback (Tabla I) del vector pComb3x, se hizo usando el programa Sequencher (Gene Code Corporation).

5.4. Cultivo de plantas de vid

Los sarmientos utilizados provenían de plantas de cultivos sanos libres de la enfermedad de Pierce y otras enfermedades comunes a la vid, las cuales fueron proporcionadas por un productor local. Se enraizó un sarmiento por maceta de 1 galón utilizando como sustrato peat moss Pro-mix Flex (Premier Tech Horticulture) con 5 % de fertilizante 15.15.15 en capsulas de liberación lenta. Los sarmientos de aproximadamente 20 cm para Cabernet Sauvignon y 30 cm para Red Globe, fueron cortados aproximadamente 0.5 cm de la base, se sumergieron en agua corriente y luego en hormona en polvo ácido 3-índole-butirico (Fax® Raizone+-Plus) para después plantarse en las macetas. Cuando creció más de un tallo por esqueje, se cortaba y se sellaba el sitio con brea especial para árbol, para homogenizar la forma y el tamaño de las plantas. El invernadero donde se realizaron estos experimentos, se encuentra en las instalaciones de la Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja

California, Campus Ensenada. Las plantas permanecieron en las instalaciones del invernadero a partir de marzo de 2006 a junio de 2008, después de este periodo fue destruido todo el material vegetal por incineración.

5.5. Infección de plantas de vid

Después de 5 meses desde que se plantaron los sarmientos, en el cuarto internudo del tallo de cada planta, tanto en Cabernet Sauvignon como en Red Globe, se colocó una gota de 10 µl con micropipeta, con 1×10^6 células de *X. fastidiosa* de la cepa Baja en medio PW, utilizando una aguja de jeringa de insulina se pinchaba el tallo hasta que la gota era absorbida.

5.6. Experimentos con Cabernet Sauvignon

Se diseñó el experimento en tres fases, según se infectó con la bacteria *X. fastidiosa*: preinfección, postinfección y postsíntomas. Se produjeron para estos experimentos los cuatro tipos de fagos, scFv-CB, scFv-CP1, scFv, y fago Helper, que se aplicaron a 6 plantas utilizando una misma concentración en cada uno de los tratamientos. Como control se incluyeron 6 plantas control infectadas sin tratamiento y 6 controles con *X. fastidiosa*. También se incluyó un control de 4 plantas en fase de preinfección, que no fueron infectadas, y que se trataron con los fagos scFv-CB.

Se utilizó una cantidad igual de fagos en todas las dosis, de 2.6×10^{13} (Tabla II). Los volúmenes variaron según la producción de cada uno de las clonas con el fagémidos correspondiente (Apéndice C).

En la fase de preinfección se hicieron dos aplicaciones de los tratamientos con fagos correspondientes, con un intervalo de una semana entre cada de estas, y otra semana para después aplicar la infección.

En la fase postinfección se infectó con la bacteria y una semana después se dieron 6 dosis de los tratamientos con fagos, con intervalos de una semana entre cada aplicación.

La fase postsíntomas consistió en la infección con *X. fastidiosa*, y después de tres meses se dieron 6 aplicaciones con intervalos de una semana entre cada aplicación.

Las dosis siempre se aplicaron en el cuarto internudo, contando desde donde nació el tallo nuevo del sarmiento. Se marcó con cinta verde especial para plantas, el punto de la infección en cada una de las plantas.

La tabla III, muestra las fechas de aplicación de los tratamientos. Al siguiente año, las plantas fueron de nuevo muestreadas. Se escogieron para el muestreo aquellos peciolo que mostraban síntomas, o según el caso, donde hubo crecimiento de peciolo. De nuevo se dejó pasar otro año (2008) y se registraron con fotografías en el mes de abril.

Tabla II. Tratamiento en plantas de Cabernet Sauvignon infectadas con *X. fastidiosa*, con diversos fagos, con diferentes tiempos de infección y aplicación de dosis. Las dosis fueron con 7 días de separación

Fase	Bacterias totales	Fago	Fagos aplicados (fagos totales), por cada dosis	n iniciales	n finales	Tiempo total (días)	Tiempo de residencia de fagos (días)
Preinfección	1×10^6	Sin fago	---	6	5	120	0
	1×10^6	scFv-CB	2.3×10^{13}	6	6	135	-15
	1×10^6	scFv-CP1	2.3×10^{13}	6	6	135	-15
	1×10^6	scFv	2.3×10^{13}	6	6	135	-15
	1×10^6	Helper	2.3×10^{13}	6	6	135	-15
Postinfección	1×10^6	Sin fago	---	6	6	150	0
	1×10^6	scFv-CB	2.3×10^{13}	6	6	150	90
	1×10^6	scFv-CP1	2.3×10^{13}	6	6	150	90
	1×10^6	scFv	2.3×10^{13}	6	6	150	90
	1×10^6	Helper	2.3×10^{13}	6	6	150	90
Postsíntomas	1×10^6	Sin fago	---	6	6	160	0
	1×10^6	scFv-CB	2.3×10^{13}	6	4	160	60
	1×10^6	scFv-CP1	2.3×10^{13}	6	3	160	60
	1×10^6	scFv	2.3×10^{13}	6	3	160	60
	1×10^6	Helper	2.3×10^{13}	6	3	160	60

Tabla III. Fechas de aplicación de los distintos tratamientos de fagos Helper, scFv, scFv-CP1 y scFv-CB en la variedad Cabernet Sauvignon, y de extracción de muestras, primera y segunda

Fase	Preinfección	Postinfección	Postsíntomas
<u>Infección</u>	06-Ago-06	02-Ago-06	02-Ago-06
<u>Aplicación de Tratamiento</u>	28-Jul-06	11-Ago-06	10-Nov-06
	05-Ago-06	18-Ago-06	17-Nov-06
		25-Ago-06	24-Nov-06
		01-Sep-06	01-Dic-06
		08-Sep-06	08-Dic-06
		15-Sep-06	15-Dic-06
<u>1er Muestreo</u>	3-Nov-06	12-Nov-06	22-Dic-06
<u>Conteos</u>	14-nov-06	22 al 30-Nov-06	2 al 9 Ene-07
<u>2do Muestreo</u>	21 al 24-Ago-07	21 al 24-Ago-07	21 al 24-Ago-07
<u>Conteo</u>	11 al 14-sep-07	11 al 14-sep-07	11 al 14-sep-07
<u>Observación de plantas</u>	20-mar-08	20-mar-08	20-mar-08

5.7. Experimentos con variedad Red Globe

Se probaron los tratamientos de los cuatro fagos con la variedad Red Globe, con los mismos tiempos de infección de las fases descritas arriba: preinfección, postinfección y postsíntomas. La infección se realizó de igual manera en el cuarto internudo. La aplicación de la dosis fue diferente de la anterior, realizándose alrededor del cuarto internudo en cada tratamiento de la siguiente manera: se realizó con una separación de 10 días alternando un sitio arriba y un sitio abajo del nudo. El número de plantas se incrementó del experimento anterior a $n=12$ por tratamiento (tabla IV). La tabla V, muestra los distintos tiempos de aplicación de los tratamientos por fase, hasta la extracción de muestras de savia para el análisis de bacterias.

Tabla IV. Tratamiento en plantas de Red Globe infectadas con *X. fastidiosa*, con diversos fagos, con diferentes tiempos de infección y aplicación de dosis. Las dosis fueron con 10 días de separación

Fase	Bacterias totales	Fago	Dosis de fago aplicada (fagos totales)	n iniciales	n finales	Tiempo total en (días)	Tiempo de residencia de fagos (días)
Preinfección	1×10^6	Sin fago	---	12	12	115	0
	1×10^6	scFv-CB	2.3×10^{13}	12	12	115	-30
	1×10^6	scFv-CP1	2.3×10^{13}	12	6	115	-30
	1×10^6	scFv	2.3×10^{13}	12	10	115	-30
	1×10^6	Helper	2.3×10^{13}	12	10	115	-30
Postinfección	1×10^6	Sin fago	---	12	12	85	75
	1×10^6	scFv-CB	2.3×10^{13}	12	10	85	75
	1×10^6	scFv-CP1	2.3×10^{13}	12	12	85	75
	1×10^6	scFv	2.3×10^{13}	12	11	85	75
	1×10^6	Helper	2.3×10^{13}	12	10	85	75
Postsíntomas	1×10^6	Sin fago	---	12	12	170	75
	1×10^6	scFv-CB	2.3×10^{13}	12	12	170	75
	1×10^6	scFv-CP1	2.3×10^{13}	12	10	170	75
	1×10^6	scFv	2.3×10^{13}	12	11	170	75
	1×10^6	Helper	2.3×10^{13}	12	10	170	75

Tabla V. Fechas de aplicación de los distintos tratamientos de fagos Helper, scFv, scFv-CP1 y scFv-CB en la variedad Red Globe

Fase	Preinfección	Postinfección	Postsíntomas
<u>Infección</u>	27-sep-07	04-jul-07	04-jul-07
<u>Aplicación del Tratamiento</u>	24-ago-07	14-jul-07	11-oct-07
	02-sep-07	26-jul-07	23-oct-07
		06-ago-07	07-nov-07
		16-ago-07	16-nov-07
		27-ago-07	13-dic-07
		06-sep07	
<u>Extracción de muestras</u>	19 -nov-07	27 al 30-sep-07	15-dic-07
<u>Conteo de muestras</u>	29-nov-07	10-oct-07	23-dic-07
<u>Observación de plantas</u>	24-abr-08	24-abr-08	24-abr-08

5.8. Procesamiento de muestras de peciolo para extracción de savia

En Cabernet Sauvignon, el primer año, se tomaron los peciolos entre el 5to y 8vo nudo de cada planta, arriba del punto de infección que fue el 4to internudo, y con un número entre 6 y 7 por planta. Al total de los peciolos colectados se les extrajo la savia como una sola extracción por planta. En el segundo año, los peciolos eran tomados de sitios arriba y abajo del punto de infección en donde hubo rebrote de peciolos y que preferentemente mostraban los síntomas típicos de la enfermedad. Esta vez, los nudos muestreados, eran etiquetados por número desde el crecimiento del sarmiento o tallo original.

En Red Globe los peciolos se individualizaron por planta y se les etiquetó un código según el número de nudo correspondiente, siendo el primer nudo el de la base del tallo. Se realizó lo más homogéneo posible, pero se prefirieron aquellos que tenían síntomas típicos de la enfermedad. Cada peciolo se pesó antes y después de la extracción y se analizaron en promedio 8 por planta.

Para los dos casos de experimento con las dos variedades de vid, se consideró lo siguiente (Fig. 2):

- Hojas cerca del tallo principal
- Hojas sintomáticas; excepto en cabernet Sauvignon, solo se tomaron los peciolos de los nudos 5to, 6to, y 7mo, excepcionalmente el 8vo.
- Patrón de colecta similar en todas las plantas según la variedad de vid.

En el experimento con Red Globe, en fase de postinfección, se fotografiaron las hojas de los peciolos, para evaluar el estado de la enfermedad con respecto al grado de infección.

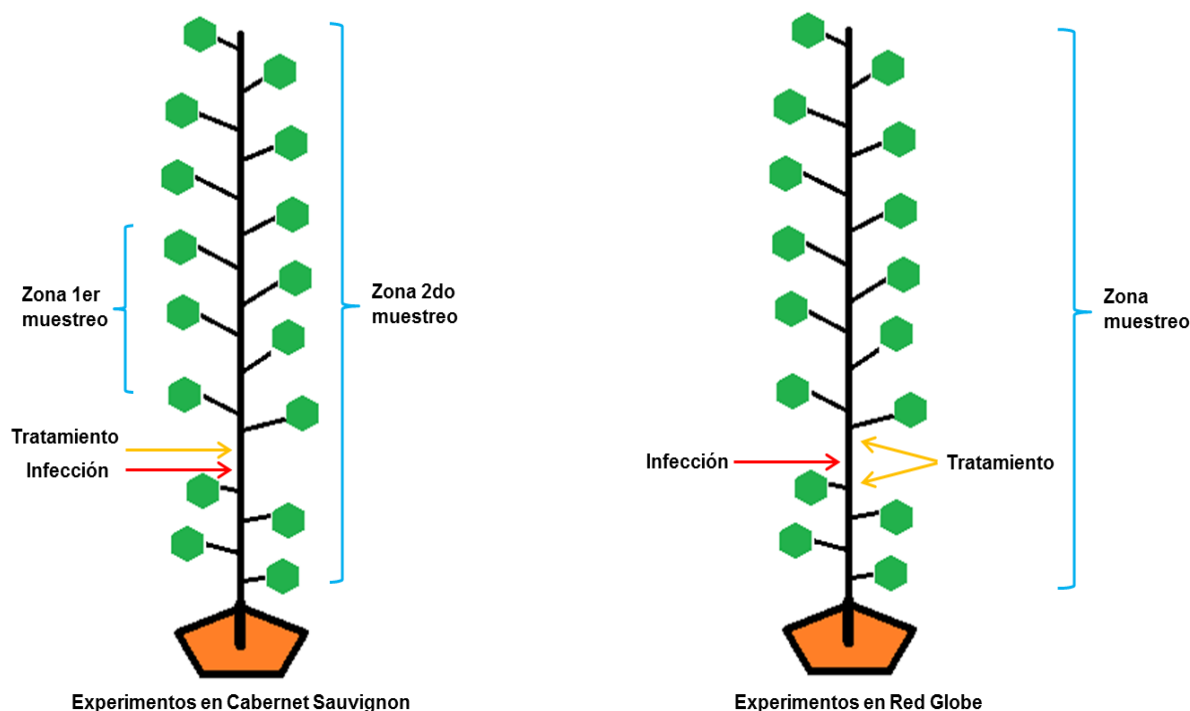


Fig. 2. Esquema del procedimiento del experimento en las plantas de vid. Las flechas rojas indican el sitio de infección con *X. fastidiosa*. Flechas en amarillo indican el lugar de aplicación de los tratamientos con los diversos fagos, según la fase de infección; preinfección, postinfección y postsíntomas. En la variedad Cabernet Sauvignon, el primer año se realizó el muestreo arriba del cuarto nudo, tomando los peciolo de los nudos 5, 6, y 7, realizando una única extracción por planta. En el segundo muestreo, en Cabernet Sauvignon, se realizó a lo largo de toda la planta, donde fuera posible; esta vez fueron extraídos de manera individual. En Red Globe, la colecta se realizó a largo de toda la planta, con extracción individualizada por cada peciolo.

La extracción se llevó a cabo en todos los casos de la siguiente manera: cada muestra de peciolo (s) se colocó en un tubo cónico de 50 ml. Por cada tubo, se lavaron para remover partículas grandes con 40 ml de agua corriente y una gota de Tween 20, se revolvió de manera suave y se dejó por un minuto, se retiró por decantación. En la siguiente lavada, se añadió 40 ml de cloro al 20% y una gota de Tween 20, se revolvió y se dejó por un minuto. Después se añadió 40 ml de alcohol al 70%, se revolvió y se dejó por un minuto.

Las muestras fueron llevadas después a un área estéril y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Se dejaron secar en placas de Petri conteniendo un disco de papel secante estéril, cerca de 5 minutos después, se hizo un corte muy delgado para quitar el tejido seco de cada extremo de los peciolo, después se exprimió la savia sobre una placa con el extremo no filoso de una navaja, una vez esto se resuspendió la extracción en 100 μ l de PBS 1x a pH 7.4.

En Cabernet Sauvignon se sembró todo el resuspendido obtenido de los 100 μ l en medio de cultivo sólido PD2 (Davis, *et al*, 1980) (Apéndice B), repartido en 4 gotas en un extremo de la placa, para después dejarlas correr, de manera que quedara expandida para poder ser cuantificada.

En Red Globe el resuspendido original de cada peciolo que se colectó, fue sembrado primero como extracto concentrado y luego en una dilución 1:10 de este. De cada uno se tomaron dos gotas escurridas de 25 μ l y se sembraron en medio sólido PD2. Al final el tejido del peciolo se pesó para restar el obtenido de la extracción; esta resta proporciona el peso obtenido por muestra.

Después de diez días de cultivo a 28 °C, se cuantificó el número de colonias resultantes de las placas, por medio de un contador manual.

5.9. Análisis estadístico

Para el caso de datos no paramétricos con pruebas de normalidad con valores de $P \geq 0.05$, se analizaron por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. Se utilizó el método de ANOVA cuando fueron datos paramétricos. El programa utilizado fue Mini Tab 15.

6. RESULTADOS

6.1. Secuencias de los fagémidos utilizados en contra de *X. fastidiosa*

Se comparó la secuencia nucleotídica y de aminoácidos del scFv producido en fagos en contra de la bacteria *X. fastidiosa*, que ya ha sido anteriormente descrita, con las secuencias que corresponden a las moléculas scFv-CP1 y scFv-CB (Fig. 3), si bien ya se habían corroborado para los ensayos *in vitro*, se analizaron para estos experimentos. La parte correspondiente al fragmento de anticuerpo que es 716 pb y de 239 aa, es exactamente igual en las tres secuencias analizadas. En la secuencia de scFv-CP1, la parte correspondiente al péptido Cecropin P1 se mantiene igual, con 34 pb, con un total de 750 pb. En la secuencia de scFv-CB no se encontró la secuencia esperada para la parte que corresponde a la molécula de Cecropin B, se observaron 3 codones stop, antes del primer stop, un fragmento de 17 aa incluye el fragmento de la secuencia de aminoácidos KVFKK que si se presentan en el péptido original. El orden en el que se conformó el vector y se unieron estos dos genes, es primero el fragmento de anticuerpo seguido del péptido correspondiente, para que a su vez se exprese del sitio C-terminal del péptido lítico al sitio N-terminal de la proteína pIII del fago VCSM13 (Helper).

scFv #1	CGGCCGTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCTAGCAAACCCAGGAGAAACGGTCAACATCACCTGCTCAGGCAGTGGT
scFv	A V T Q P S S V S A N P G E T V N I T C S G S G
scFv-CP1	-----
scFv-CB	-----
scFv #73	GGCAACCACTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCACCTGGCAGTGCCCTGTTACTCTGATCTATGACAACACCAAC
scFv	G N H Y G W Y Q Q K S P G S A P V T L I Y D N T N
scFv-CP1	-----
scFv-CB	-----
scFv #149	AGACCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCCGAGTCCGGCTCCACAGGCACATTGACCATCACTGGGGTC
scFv	R P S D I P S R F S G S E S G S T G T L T I T G V
scFv-CP1	-----
scFv-CB	-----
scFv #224	CAAGTCGACGACGAGGCTGTCTATTACTGTGGGAGCTGGGAAAGCAACAATAATCCTGGTATATTGGGGCC
scFv	Q V D D E A V Y Y C G S W E S N N N P G I F G A
scFv-CP1	-----
scFv-CB	-----
scFv #295	GGGACAGCCCTGACCGTCCTAGGTCAGTCCTCTAGATCTTCCACCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCT
scFv	G T A L T V L G Q S S R S S T V T L D E S G G G L
scFv-CP1	-----
scFv-CB	-----
scFv #370	CAGACGCCCGGAGGAGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTTGACTTCAGTGACCGTGGCATGCACT
scFv	Q T P G G G L S L V C K A S G F D F S D R G M H W
scFv-CP1	-----
scFv-CB	-----
scFv #445	GGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCGCAGGCATTAACTCATAGTGAGACAGGATATGGG
scFv	V R Q A P G K G L E Y V A G I N T H S E T G Y G
scFv-CP1	-----
scFv-CB	-----
scFv #517	GCAGTGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGTACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCT
scFv	A V V K G R A T I S R D N G Q S T V R L Q L N N L
scFv-CP1	-----
scFv-CB	-----
scFv #592	CAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAATGCTGATCGTGGTTATGATGGAGACGAGATCGACG
scFv	R A E D T G T Y Y C A K N A D R G Y D G D E I D A
scFv-CP1	-----
scFv-CB	-----
scFv #667	CATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCCACTAGTGGCCAGGC
scFv	W G H G T E V I V S S T S G Q
scFv-CP1	CATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCCACTAGTAGCTGCCTCAGCAAAACCGCCAAGAACTTGAGAAC
scFv-CP1	W G H G T E V I V S S T S S C L S K T A K K L E N
scFv-CB	CATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTGCGCCCTTAT
scFv-CB	W G H G T E V I V S S T S N G R Q C A G I R P Y
scFv-CP1	TCTGCAAGAAACGCATCTCTGAAGGCATTGCTATCGCGATACAGGGTGGCCCGCGCGAGGCCAGGC
scFv-CP1 #742	S A K K R I S E G I A I A I Q G G P R A G Q
scFv-CB #738	GGGAAAGTCTTCAAGAAATGAAAAATGGGTGCGCAACATTGCAAAACCGTATTGTCAAGGCTGGACCAA
scFv-CB	G K V F K K . K N G S Q H S K P Y C Q G W T K
scFv-CB #807	GCGATCGCGGTTTTAGGCGAAGCCAAAGCGCTAGGCCAGGC
scFv-CB #815	R S R F . A K P K R . A R

Fig.3. Alineación de las tres secuencias nucleotídicas y de aminoácidos del scFv, scFv-CP1 y scFv-CB. La flecha negra indica donde termina el scFv y comienzan las de los péptidos ligados. La flecha gris indica el primer “stop” de la secuencia de scFv-CB. La parte subrayada en negro corresponde a la secuencia exacta del CP1, y la gris a la única parte similar de la secuencia de CB original. Líneas punteadas indican las partes donde son iguales las secuencias, y los puntos indican los codones “stop”.

6.2. Pruebas en invernadero con los distintos fagos en contra de *X. fastidiosa* en plantas de vid Cabernet Sauvignon

El lote de bacterias con el cual se inocularon las plantas de la fase preinfección, fue diferente de aquel que se sirvió de inóculo para las fases de postinfección y postsíntomas. Una muestra de cada uno de los dos lotes de cultivo, se sembraron el mismo día de su infección en plantas, en medio de cultivo sólido PD2, para corroborar que fueran viables (datos no mostrados). El crecimiento de los dos lotes después de 10 días fue el esperado; crecieron abundantemente sin evidencia de contaminación.

6.2.1. Preinfección en Cabernet Sauvignon

En la fase preinfección (Tabla VI), después de tres meses de que se infectaron las plantas, se extrajo la savia y se obtuvo el número de ufc por peciolo, en promedio en las plantas controles infectadas sin tratar, 1113 ufc/peciolo, y las que fueron tratadas con los fagos, 2.8 para scFv-CB, 139.8 para scFv-CP1, 11.3 para scFv, y 0.4 para fago ayudador. Con un valor de $p = 0.435$, mostro no ser significativo. Los resultados de las plantas controles en ufc/peciolo variaron entre sí (Apéndice A), de ahí que no fueran significativos, aunque la colecta de los peciols en la planta fue homogénea. Sin embargo, en los tratamientos con fagos Helper y scFv-CB, no hay tanta variación entre una y otra planta (Apéndice A) por lo que en promedio el número de ufc totales y entre peciols por planta (Fig. 4) es reducido con respecto al control en más de un 90%.

Estos datos muestran que hay un efecto de tipo preventivo, ya que con tan solo dos dosis aplicadas, con intervalos de una semana, y con un día después para

que los fagos se encuentren con el patógeno en el xilema, y tres meses después se colectó y se observó la reducción en el número de colonias extraídas comparadas con el control (ver fechas en Tabla III).

Tabla VI. Eliminación de *X. fastidiosa* en plantas de Cabernet Sauvignon en fase Preinfección, tratadas y muestreadas con los diversos fagos en año 2006, y remuestreadas en 2007

Año	Fago	n	Promedio UFC/pecíolo	Des. Estándar	Prueba estadística <i>p</i> <(0.05)	Eliminación (%)
2006	Sin fago	5	1113.1	2417.6	Kruskal- Wallis 0.435	
	scFv-CB	6	2.8	6		99.8
	scFv-CP1	6	139.8	257		87.4
	scFv	6	11.3	17.8		99.0
	Helper	6	0.4	0.2		100.0
2007	Sin fago	2	1000.5	406.5	ANOVA unidireccional 0.029	
	scFv-CB	6	292	274.8		69
	scFv-CP1	6	826.1	1061.8		24
	scFv	6	2548.5	1871.7		-144
	Helper	6	505.5	1238.2		49

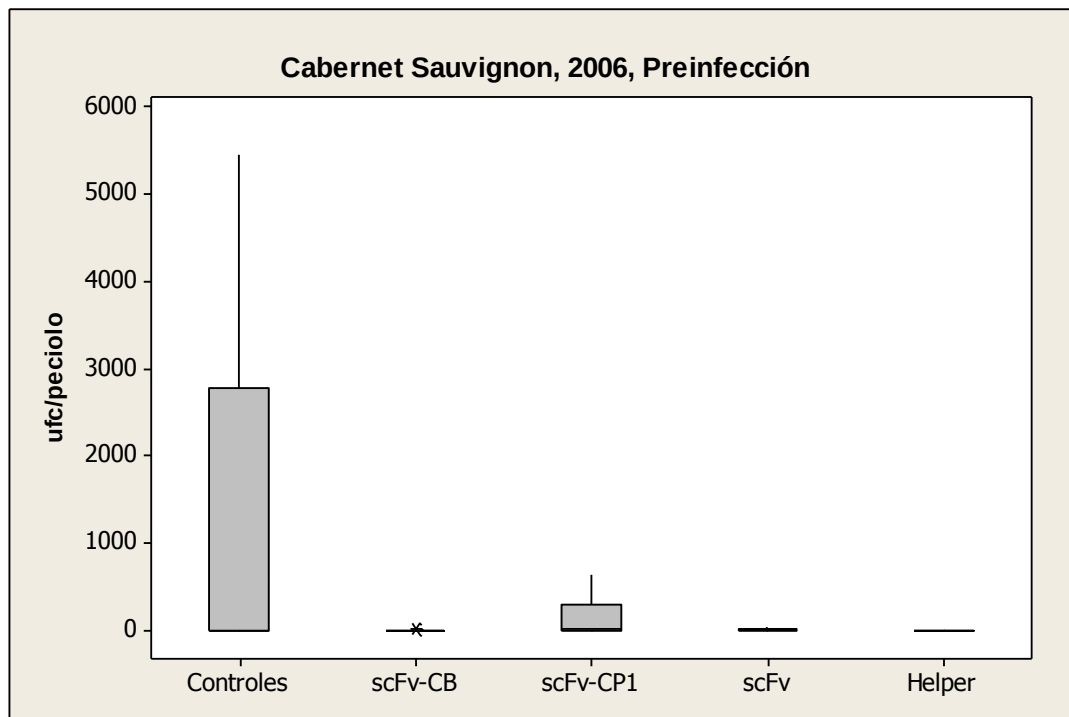


Fig. 4. Tratamiento preinfección en plantas de Cabernet Sauvignon con diversos fagos contra *X. fastidiosa*. Dos dosificaciones de 2.6×10^{13} fagos por tratamiento, con una semana de separación, y un día antes de la inoculación de 1×10^6 células del patógeno, realizado en el cuarto nudo de cada planta. Tres meses después, en noviembre, se observaron los resultados de la extracción de la savia de peciolo. Todos los tratamientos muestran una reducción mayor del 87%. El muestreo se realizó en los peciolo de 3 nudos arriba del punto de tratamiento e infección. Las barras representan las medianas obtenidas de las colonias resultantes, sembradas en medio solido PD2, se contaron después de 10 días de cultivo a 28 °C. ($p=0.435$).

Un año y 15 días después desde que efectuó el tratamiento de preinfección (Tabla III), se realizó extracción individualizada de peciolo por nudo (ver metodología) no homogénea al azar, pues en las plantas ya no se encontraron rebrotes en los nudos del anterior muestreo.

Al igual que en el anterior muestreo, scFv-CB y Helper, mantuvieron los números bajos de ufc/peciolo con respecto al control (Tabla IV, comparar fago Helper y scFv-CB 2006 con 2007). Lo que nos indica que a un año después de un periodo de dormancia los niveles bajos de bacterias se mantienen con respecto a las plantas control infectadas sin tratar (Fig. 5). El aumento en el número de colonias al año siguiente por cada planta, supone el aplicar más cantidad y/o número de dosis una vez que regresa la actividad de la planta.

Cabernet Sauvignon, Recuento 2007, Preinfección, ufc/peciolo/planta

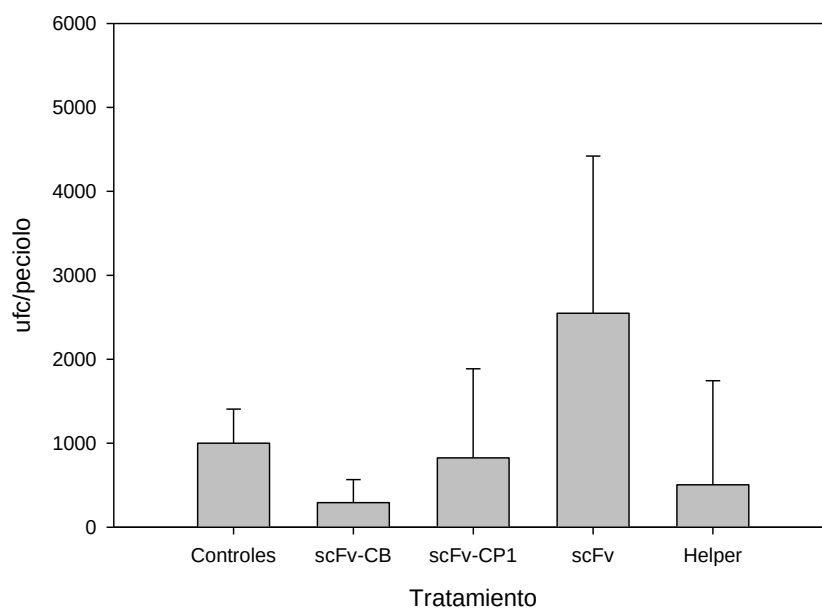


Fig. 5. Recuento en plantas de Cabernet Sauvignon, después de 1 año con 15 días con un periodo de dormancia, desde que se trataron en preinfección con *X. fastidiosa*. Todas las plantas pudieron ser colectadas, excepto para las plantas control (n=2), ya que el resto no volvió a rebrotar hojas. El mejor caso que se observó, fue scFv-CB, con 70% de eliminación, seguido del fago Helper, con 50% de eliminación. Con fago scFv-CP1 fue de 24% eliminación y con fago scFv tuvo un aumento del 44% con respecto al control. Las barras representan las medianas obtenidas de las colonias resultantes de la extracción de la savia de peciolo, se sembraron en medio sólido PD2, y se contaron después de 10 días de cultivo a 28 °C. ($p=0.029$).

La apariencia de las plantas de Cabernet Sauvignon tratadas con la estrategia de preinfección, después de 17 meses desde que inicio el tratamiento (Fig. 6), en 28 de julio de 2006, a abril de 2008, cuando reanudaron su crecimiento después del invierno, se observa que las únicas plantas que rebrotaron de manera similar al control (A) fue el tratamiento con fago Helper (F). En las plantas sin tratar la infección resulto mortal para todas las plantas (B). En cambio en los otros grupos de tratamiento (C, D y E), los rebrotes cuando se presentaron, fueron en sitios alejados del tallo original, en la zona del que fuera el sarmiento, lo que indica que en tratamiento con Helper se pudo obtener mejoría en la zona donde existía infección.

Se analizó otro grupo control en el que plantas sin infectar con *X. fastidiosa*, fueron tratadas con el fago scFv-CB (Fig. 7); estas no presentaron el daño que pudiera haberse causado por la aplicación del tratamiento con aguja, que podría haberse reflejado en el crecimiento en zonas bajas o apicales alrededor del tallo principal; por el contrario, creció similar al control sin infectar ni tratar (comparar Fig. 4A con la Fig. 6).

Aunque no se observaron diferencias significativas en los tratamientos de esta fase, los experimentos sugieren que aquellas tratadas con fago Helper mostraron la mejor opción en la reducción del número de colonias extraídas y apariencia de las plantas 1 año y 8 meses después.

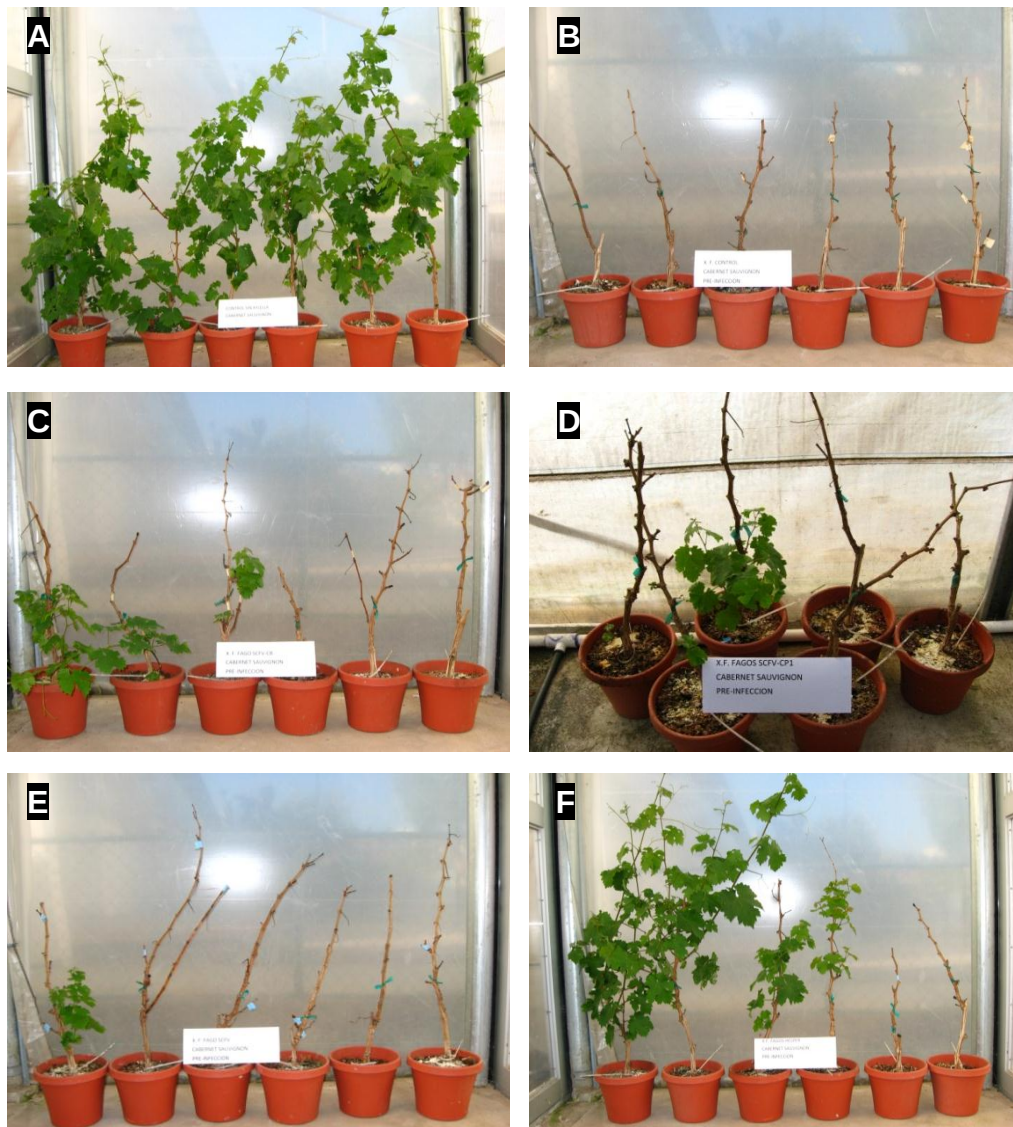


Fig. 6. Diferencias después de 1 año y 8 meses en el rebrote de las plantas de Cabernet Sauvignon, tratadas con diferentes fagos en fase Preinfección. Las plantas control infectadas con *X. fastidiosa* sin tratar, ya no sobrevivieron (B). Las plantas tratadas con el fago Helper (F) que sobrevivieron crecieron de modo muy similar al control sin infectar (A). En plantas tratadas con el fago scFv-CB (C), el crecimiento fue en la zona basal alejado de la zona de infección, al igual que en las plantas tratadas con scFv-CP1 (D) y scFv (E). Ordenadas de izquierda a derecha según el mayor crecimiento y aparición de tallos laterales cercanos al tallo principal.



Fig. 7. Plantas de Cabernet Sauvignon sin infectar con *X. fastidiosa* tratadas con fagos scFv-CB, con la aplicación de 2 dosis separadas por 7 días con 2.6×10^{13} fagos. Después del primer año fueron podadas en invierno. Registradas después de dos años de haberse tratado, presentaron rebrotes en sitios arriba inmediatos al punto de inyección.

6.2.2. Postinfección en Cabernet Sauvignon

En la fase postinfección (Tabla VII) los controles mostraron 325.7 ufc por peciolo promedio por planta, y los tratamientos, 244.7 para scFv-CB, 68.4 para scF-CP1, 1465.3 para scFv, y 751.8 para fago ayudador. Las pruebas estadísticas mostraron no diferencias significativas ($p= 0.260$). Solo scFv-CP1 muestra casi un 80 % de reducción con respecto a las plantas control. En el tratamiento scFv-CB se observó una reducción de 25%. En cambio hubo un incremento en los tratamientos de scFv y Helper. A pesar de que el tamaño de muestra es pequeño, se presentan evidencias de reducción (Apéndice A), pero no hay explicación para el aumento en los otros tratamientos (Fig. 8). No se comprobó el efecto del tratamiento inmediato a la infección, ya que se hizo el muestreo dos meses después de haber finalizado la aplicación de las 6 dosis después de la infección (Tabla III).

Se observa que la tendencia al siguiente año, es al aumento del número de colonias, sin embargo se observa que scFv-CB mantuvo un número en ufc similar al año anterior (Fig. 9). El análisis estadístico por la prueba de ANOVA dio $p= 0.119$, no significativa. Los números fueron más altos que el control, en todos los casos de tratamiento aplicados, si bien se conservaron todas las plantas ($n=6$) y se colectaron muestras de peciolos en un número similar.

Tabla VII. Eliminación de *X. fastidiosa* en plantas de Cabernet Sauvignon en fase Postinfección, tratadas y muestreadas con los diversos fagos en año 2006, y remuestreadas en 2007

Año	Fago	n	Promedio UFC/peciolo	Des. Estándar	Prueba estadística <i>p</i> <(0.05)	Eliminación (%)
2006	Sin fago	6	325.7	371	Kruskal-Wallis 0.260	
	scFv-CB	6	244.7	245.7		24.8
	scFv-CP1	6	68.4	125		78.9
	scFv	6	1465.3	3581.4		-349
	Helper	6	751.8	1712		-119
2007	Sin fago	6	36.3	88.9	ANOVA unidireccional 0.119	
	scFv-CB	6	251.6	262.7		-593
	scFv-CP1	6	2927	3631.6		-7956
	scFv	6	2662.5	3268.9		-7228
	Helper	6	1428	1712		-3830

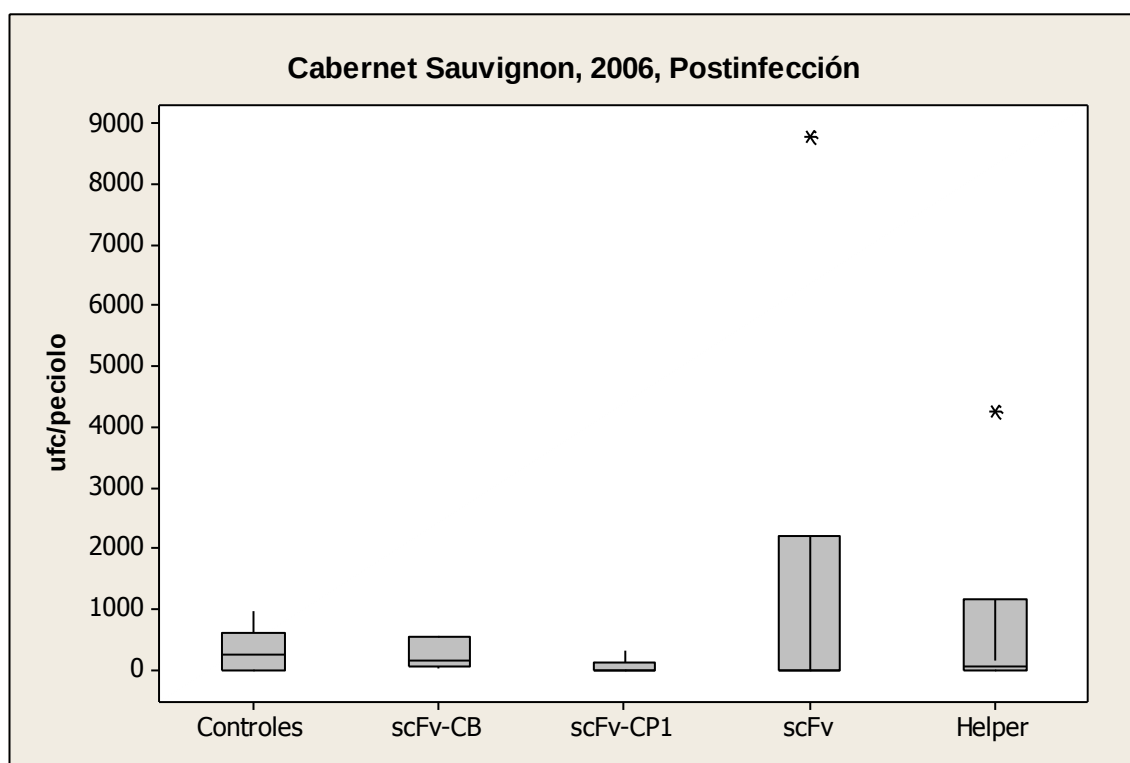


Fig. 8. Tratamiento preinfección con diversos fagos contra *X. fastidiosa*, en plantas de Cabernet Sauvignon. Después de la infección con 1×10^6 células, con la aplicación de 6 dosis de 2.6×10^{13} fagos, con intervalos de una semana, y muestreadas dos meses después. El único tratamiento en el que se observa reducción es scFv-CP1, con un 80%, seguido scFv-CB, con un 25%. Por el contrario se observa aumento de presencia de bacterias en los otros tratamientos, scFv y Helper. Las barras representan las medianas obtenidas de las colonias resultantes de la extracción de la savia de pecíolos, sembradas en medio sólido PD2, y se contadas después de 10 días de cultivo a 28 °C. Las barras representan las medianas de cada tratamiento ($p=0.260$).

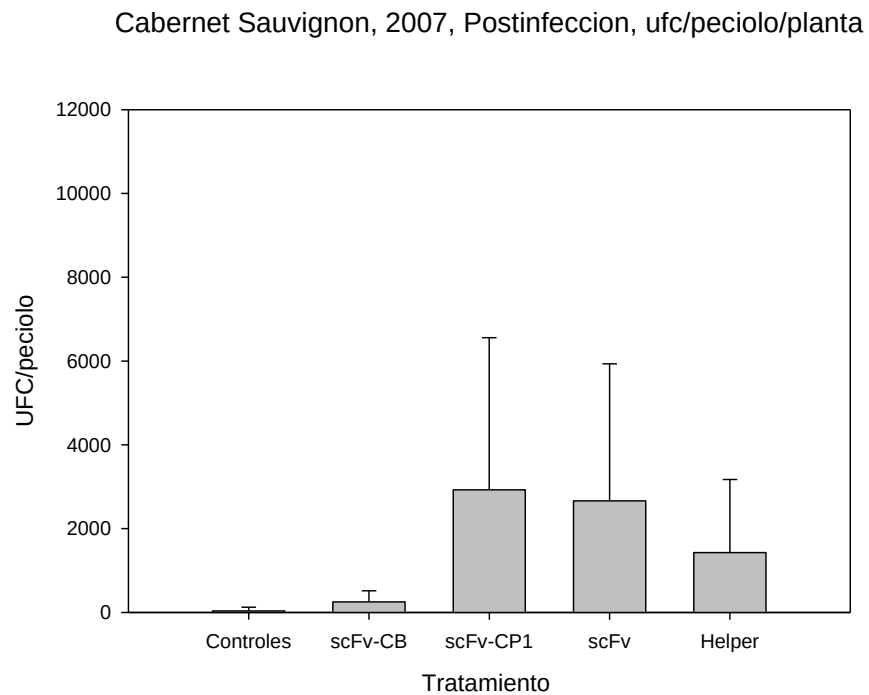


Fig. 9. Recuento en plantas de Cabernet Sauvignon, después de 1 año con 15 días con un periodo de dormancia, desde que inicio el tratamiento en postinfección con *X. fastidiosa*. Se observó aumento en todos los tratamientos con respecto al control. Las barras representan las medias obtenidas de las colonias resultantes de la extracción de la savia de pecíolos, sembradas en medio sólido PD2, y contadas después de 10 días de cultivo a 28 °C. ($p=0.119$).

Para el caso de la fase postinfección (Fig. 10), se observó rebrote en 4 de 6 plantas del tratamiento scFv-CB (C), de las cuales ocurrió en zonas del tallo original, este grupo tuvo la menos ocurrencia de bacterias en el año anterior (comparar con fig. 8 y 9). Le sigue el tratamiento scFv-CP1 (D), en las que el rebrote ocurrió también en el tallo original en 3 de 6 plantas. En el caso del fago Helper (F), el rebrote fue en las zonas basales. En el tratamiento scFv (E) todas las plantas murieron, lo que coincide con el promedio alto de bacterias presentes en el análisis del año anterior (Fig. 9). El control infectado sin tratar (B) presento poco desarrollo de rebrote en el tallo basal en 2 de 6 plantas, el resto murió. Aunque hubo muy baja presencia de bacterias en el análisis anterior, pudo quizá deberse a que los muestreos solo se hicieron en la zona cercana de las inyecciones, entre 2 a 3 nudos alrededor del cuarto nudo, y en el caso de los otros controles coincidió con un muestreo en partes en zonas más arriba y abajo, donde las bacterias estaban sobreviviendo a medida en que se están muriendo en otras partes.

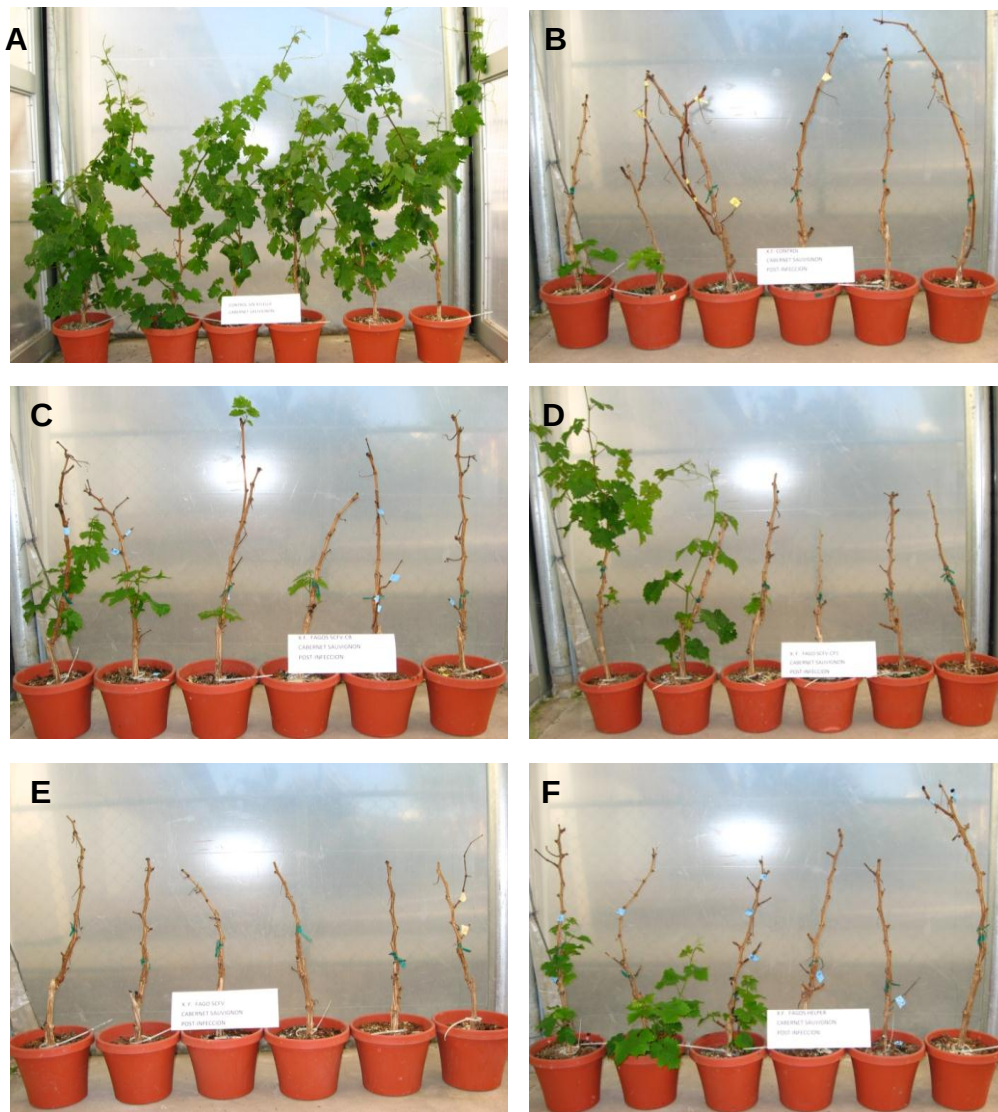


Fig. 10. Diferencias después de años en el rebrote de las plantas de Cabernet Sauvignon, tratadas con diferentes fagos en fase Postinfección. Solo en los tratamientos de scFv-CB (C) y scFv-CP1 (D), hubo aparición de retoños en la zona del tallo alrededor del punto de infección y aplicación de los tratamientos. En las tratadas con fago Helper (F) aparecen en zonas basales. Con el tratamiento de fagos scFv (E) no hubo sobrevivientes. El control sin tratar (B), tuvo poco crecimiento en zonas basales en dos plantas. Ordenadas de izquierda a derecha según el mayor crecimiento y aparición de tallos laterales cercanos al tallo principal.

6.2.3. Postsíntomas en Cabernet Sauvignon

En la fase postsíntomas, el promedio del número ufc por peciolo por planta fue de 1587.7 en plantas control infectadas sin tratar, 5.2 en CB, 1337.7 en CP1, 278.3 en scFv, y 139.4 en fago ayudador (Tabla VIII). El resultado de la prueba de kruskal-Wallis fue $p=0.013$, por lo que los datos mostraron ser significativos. Los porcentajes de eliminación fueron para scFv-CB 99%, Helper 91%, y scFv 82%, teniendo valores por debajo del promedio de plantas control infectadas sin tratar (Fig. 11), en el caso de scFv-CP1 con 12% de eliminación fue más similar al control, no mostrando evidencia de diferencias. Al momento del muestreo el tamaño de muestra se redujo en scFv-CB a $n=4$, en scFv-CP1 $n=3$, en scFv $n=3$, y en fago Helper $n=3$, las plantas no tenían peciolo después del punto de infección y en ocasiones tampoco debajo de este. Al momento de terminar el tratamiento, en diciembre (Tabla III), debido a la reducción de la actividad de las plantas, la introducción del tratamiento a estas fue más lento, y se forzó sometiendo a que sufrieran daño en el tejido del tallo.

Después de 8 meses desde primer muestreo, los datos obtenidos del remuestreo de este grupo de tratamientos, no fueron significativos, $p=0.257$, $H=5.31$. Sin embargo se observa reducción en promedio de ufc/peciolo/planta (Fig. 12), por debajo del promedio en todos los tratamientos con respecto al control, excepto con scFv. Lo que refuerza la reducción observada en 2006 (Fig. 9), en que los tratamientos en general se mantuvieron por debajo del control.

Al segundo año después del último tratamiento con fago scFv, 5 de 6 plantas rebrotaron. Se observó 50% de rebrote en los tratamientos con fago scFv-CB,

scFv-CP1 y Helper. En los controles infectados sin tratar, una sola planta sobrevivió con un brote pequeño. (Fig. 13B).

Tabla VIII. Eliminación de *X. fastidiosa* en plantas de Cabernet Sauvignon en fase Postsíntomas, tratadas y muestreadas con los diversos fagos en año 2006, y remuestreadas en 2007

Año	Fago	n	Promedio UFC/pecíolo	Des. Estándar	Prueba estadística $p < (0.05)$	Eliminación (%)
2006	Sin fago	6	1587.7	2433.1	Kruskal-Wallis 0.013	
	scFv-CB	4	5.2	10.44		99.67
	scFv-CP1	3	1337.7	726.6		12.5
	scFv	3	278.3	166.2		82.5
	Helper	3	139.4	233.6		91.2
2007	Sin fago	6	4719	3220.1	Kruskal-Wallis 0.243	
	scFv-CB	5	1331	2198		71.8
	scFv-CP1	6	1505	2402.9		68.1
	scFv	6	3001.8	3262		36.4
	Helper	6	1243	1737.6		73.6

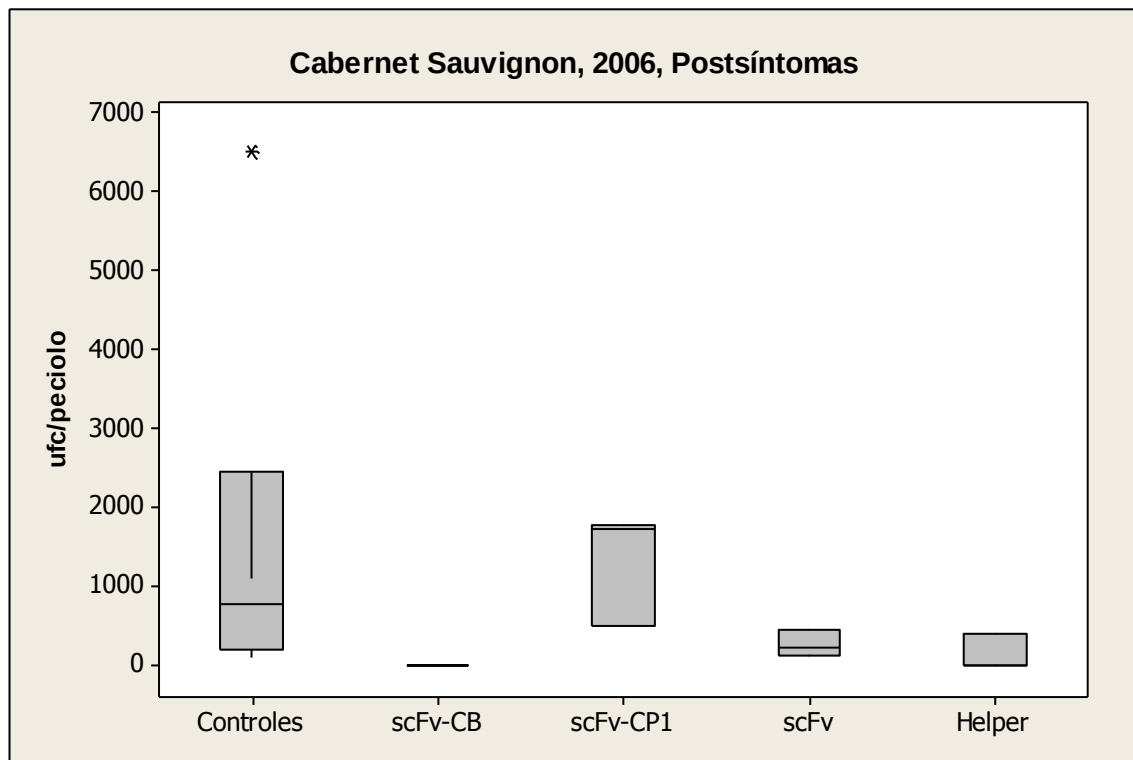


Fig. 11. Tratamiento postsíntomas con diversos fagos contra *X. fastidiosa*, en plantas de Cabernet Sauvignon. Después de la infección con 1×10^6 células, se permitió la proliferación del patógeno en las plantas por tres meses, y después se aplicaron 6 dosis de 2.6×10^{13} fagos con intervalos de una semana. Una semana después de la última dosis, se efectuó el muestreo. Los fagos scFv-CB, scFv, y Helper, fueron efectivos en eliminar la presencia de la bacteria, con respecto a los controles infectados sin tratar. Las barras representan las medianas de las colonias resultantes de la extracción de la savia de pecíolos, sembradas en medio solido PD2, y contadas después de 10 días de cultivo a 28 °C. ($p=0.013$).

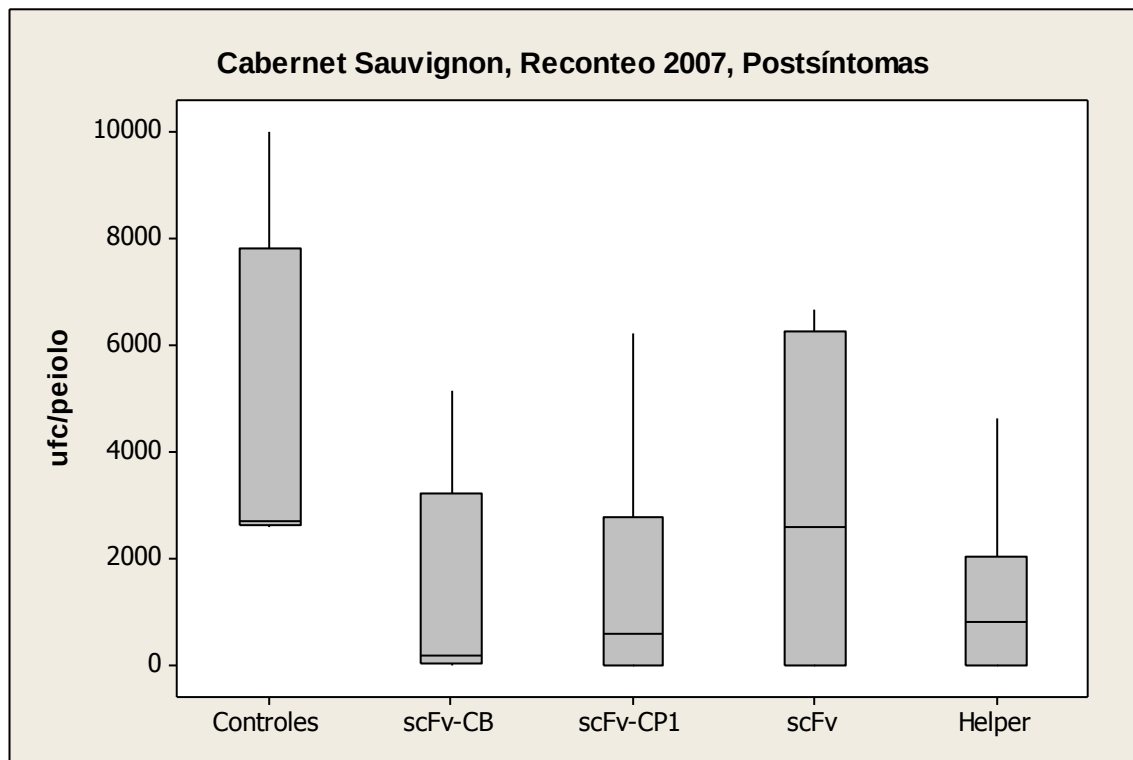


Fig. 12. Recuento en plantas de Cabernet Sauvignon tratadas con las diversas construcciones de fagos, pertenecientes a la fase de postsíntomas, después de 9 meses desde que se terminó el tratamiento. Las barras representan las medianas de las colonias resultantes de la extracción de la savia de peciolo, sembradas en medio sólido PD2, y contadas después de 10 días de cultivo a 28 °C. ($p=0.243$).

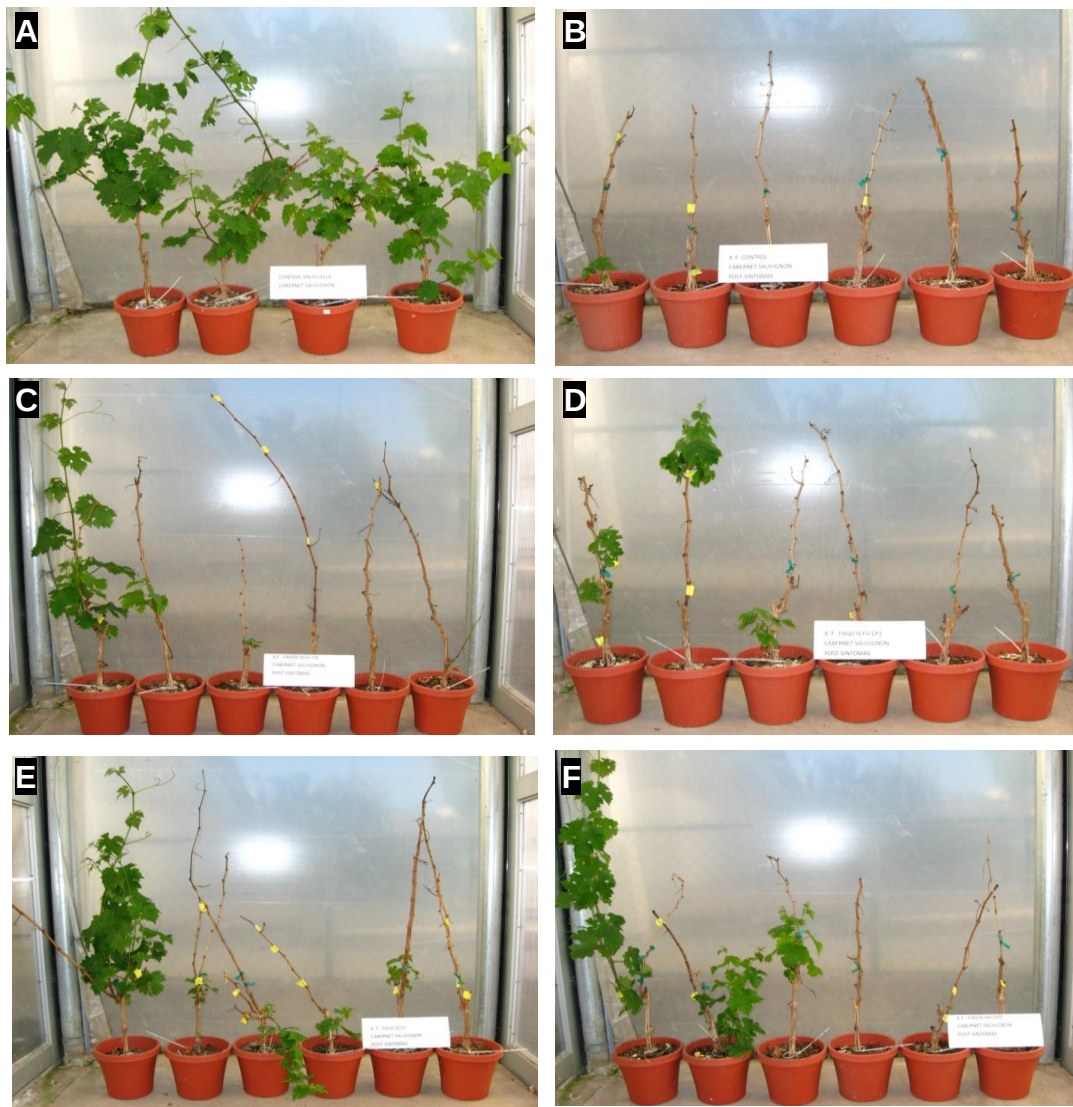


Fig.13. Diferencias después de dos años en el rebrote de las plantas de Cabernet Sauvignon, tratadas con diferentes fagos en fase Postsíntomas. (A) controles sin infectar ni tratar. (B) Infectadas con *X. fastidiosa*. Infectadas con *X. fastidiosa* y tratadas con los (C) fagos scFv-CB, (D) fagos scFv-CP1, y fagos scFv (E), y (F) fagos Helper. Se observó por lo menos en la mitad de las plantas que hay rebrote en general con mayor vigor que el control sin infectar. Ordenadas de izquierda a derecha según el mayor crecimiento y aparición de tallos laterales cercanos al tallo principal.

6.2. Pruebas en invernadero con los distintos fagos en contra de *X. fastidiosa* en plantas de vid Red Globe

6.2.1.Preinfección en Red Globe

En fase de preinfección hubo reducción del número de colonias en todos los tratamientos, y presento diferencias significativas ($p=0.005$), (Tabla IX). En plantas infectadas no tratadas el promedio fue de 36 ufc por mg de muestra $n=12$, de las cuales en 3 plantas no se obtuvo colecta de bacterias. El tratamiento con el fago scFv, presento un promedio 1 ufc/mg, con $n=9$ en las que en 7 plantas no fue colectada ninguna colonia. Con el fago Helper ($n=6$), el promedio fue de 1 ufc/mg, con 7 plantas en las que no hubo presencia de colonias. Para el caso de los fagos scFv-CB, $n=12$, el resultado fue de 0 ufc/mg y para scFv-CP1, $n=6$, 0.0075 ufc/mg (Fig. 14) (Apéndice A).

Tabla IX. Eliminación de *X. fastidiosa* en plantas de Red Globe, tratadas con los diversos fagos

Fase	Fago	Pecíolos Totales	UFC Totales	mg totales	UFC/ mg/planta	Des. Est. n.	Prueba estadística p (<0.05)	Valor estadístico (H)	Eliminación (%)
Preinfección	Sin fago	113	285,012	8.9	36	55	Kruskal-Wallis 0.005	14.96	
	scFv-CB	114	0	7.4	0	0			100
	scFv-CP1	51	36	2.5	0	0			98
	scFv	98	4,160	8.9	1	2.4			97
	Helper	101	38,522	6.1	1	3.3			97
Postinfección	Sin fago	103	1,109,914	6.9	185	247	Kruskal-Wallis 0.009	13.46	
	scFv-CB	94	419,922	8.1	60	80			67
	scFv-CP1	110	956,316	9.2	122	140			34
	scFv	86	457,648	5.4	97	242			47
	Helper	92	38,522	6.1	8	23.5			98
Postsíntomas	Sin fago	87	511,638	3.5	223	446	Kruskal-Wallis 0.900	1.06	
	scFv-CB	87	302,392	4.9	96	273			57
	scFv-CP1	73	141,060	4.2	77	125			66
	scFv	64	259,712	2.9	102	207			54
	Helper	69	469,580	3.7	104	265			54

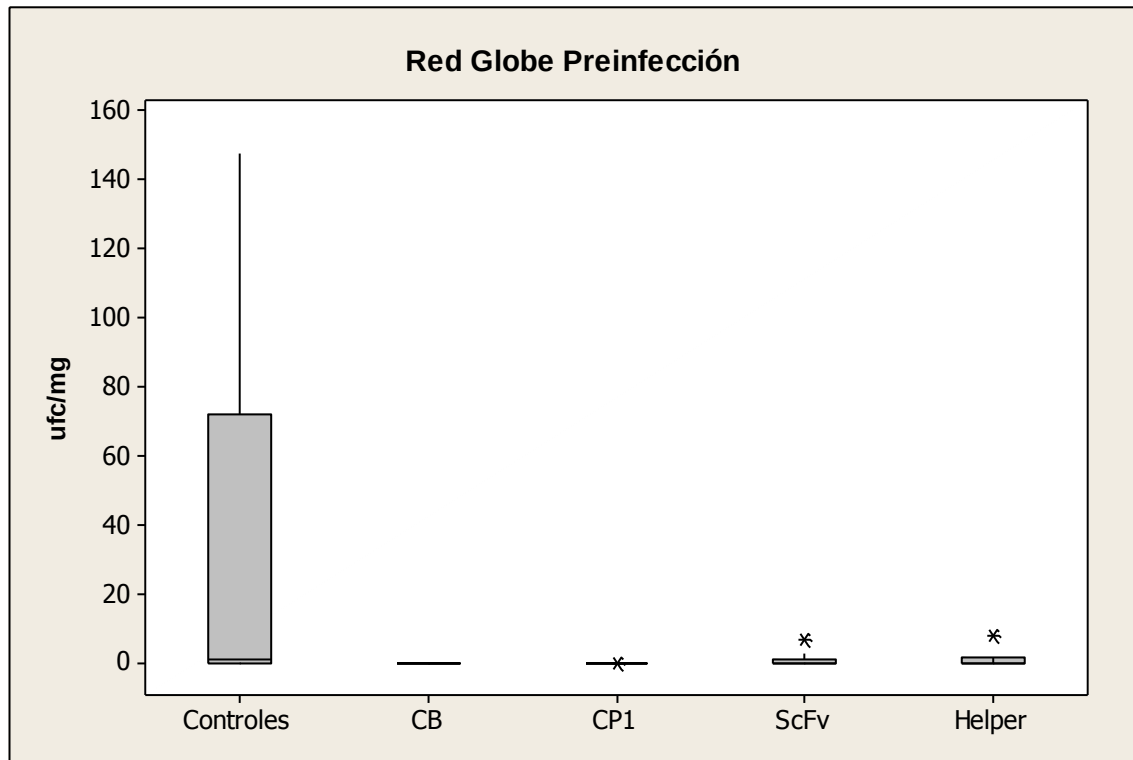


Fig. 14. Tratamiento en fase de preinfección con los diferentes fagos contra *X. fastidiosa* en la variedad Red Globe. Las plantas fueron tratadas con dos dosis de 2.6×10^{13} fagos, excepto el control, seguido de la infección con 1×10^6 células, con un intervalo de 10 días entre cada aplicación. Dos meses después se efectuó la extracción de savia de peciolo, y fue sembrada en medio sólido PD2. No se encontraron colonias con los fagos scFv-CB (n=12). Con fagos scFv-CP1 (n=6) tampoco tuvo proliferación del patógeno. Con fagos Helper y scFv siguieron en niveles bajos a diferencia del control. Las barras representan las medianas del número de ufc por mg por planta. Colonias contadas después de 10 días de cultivo a 28 °C. ($p=0.005$).

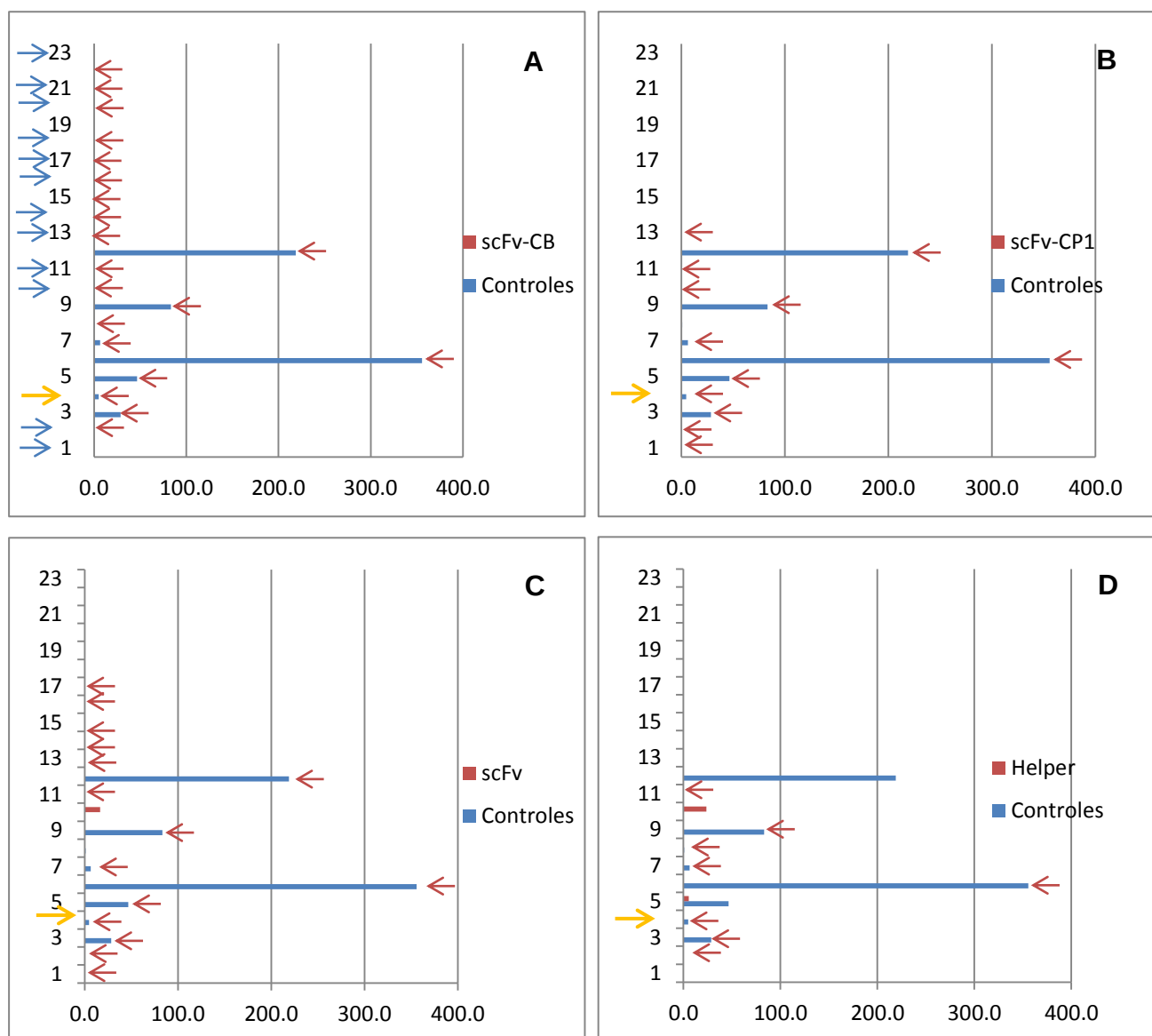


Fig. 15. Distribución de *X. fastidiosa* por nudo en los peciolo de plantas de Red Globe tratadas con los diversos fagos y no tratadas, en preinfección. En el eje de las y se muestra el número de nudo desde la base de la planta, y en el eje de las x, el promedio del número de ufc/mg de bacterias. La colecta de las plantas controles infectadas sin tratar fue del nudo 1 al 23 (en azul). La colecta en las plantas con tratamiento fue con (A) scFv-CB, desde el nudo 2 al 22, donde no se colectó ninguna bacteria en n=12 plantas, (B) scFv-CP1, del nudo 1 al 13, de n=6 colectadas solo el 8vo nudo en una planta presente bacterias 0.3 ufc/mg, (C) scFv, del nudo 3 al 17, y las bacterias que se observaron fue en n=2 plantas, (D) Helper, del nudo 1 al 11 con n=6 plantas y solo en una se colectaron bacterias. Las flechas en rojo indican cuando no colectó ninguna bacteria en ese sitio, 0 ufc/mg, flechas azules indican donde fue 0 ufc/mg de bacterias en controles infectados sin tratar. La flecha amarilla indica el sitio donde se infectó con las bacterias en el 4to internudo, con 10^6 células, y el sitio del tratamiento con dos dosis previas a la infección de 2.6×10^{13} fagos, separadas por 10 días entre cada una y 10 antes de la infección.

Se observó que la distribución de la ocurrencia de bacterias en los pecioloos según el nudo donde se colecto (Fig. 15) fue que en plantas infectadas sin tratar hubo presencia del patogeno de manera constante desde el nudo 3 hasta el 9, el muestreo fue hasta el nudo 12 y un nudo debajo del punto de infección. En el tratamiento con fagos scFv-CP1 (B) la ocurrencia de bacterias fue en el 8vo nudo de una sola planta, el resto fue 0 arriba y abajo. En tratamiento con fagos scFv (C) se observaron bacterias en pecioloos en solo 2 plantas, en el 10mo nudo. En tratamiento con fagos Helper (D) la ocurrencia de bacterias fue en pecioloos de 2 nudos en una sola planta.

Siete meses después del muestreo, se registró con fotografías el estado externo de las plantas, a finales del mes de abril, cuando aún no son visibles los síntomas de la enfermedad de Pierce. Las plantas (Fig. 16) con los tratamientos scFv-CB (C), scFv-CP1 (D) y sobretudo Helper (F) rebrotaron de manera muy similar al control sin infectar ni tratar (A), con crecimiento de tallos nuevos en zonas más apicales y a veces muy profuso con un tamaño de hojas similar, a diferencia de las infectadas con *X. fastidiosa* sin tratar (B), con rebrotes mayormente en zonas debajo del punto de infección, y un tamaño de hojas irregular, y en ocasiones nulo crecimiento (B). Estas diferencias con respecto al control sin tratar, refuerza los resultados obtenidos de la extracción de pecioloos del año anterior. Esto coincide con el experimento anterior en Cabernet Sauvignon, que la aplicación de los fagos en preinfección, cercano al punto de la introducción del patógeno, reduce el establecimiento de este en la planta. Los fagos scFv-CB y scFv-CP1 son fuertes candidatos para ser utilizados en plantas jóvenes, antes de la temporada donde hay más peligro de una infección.

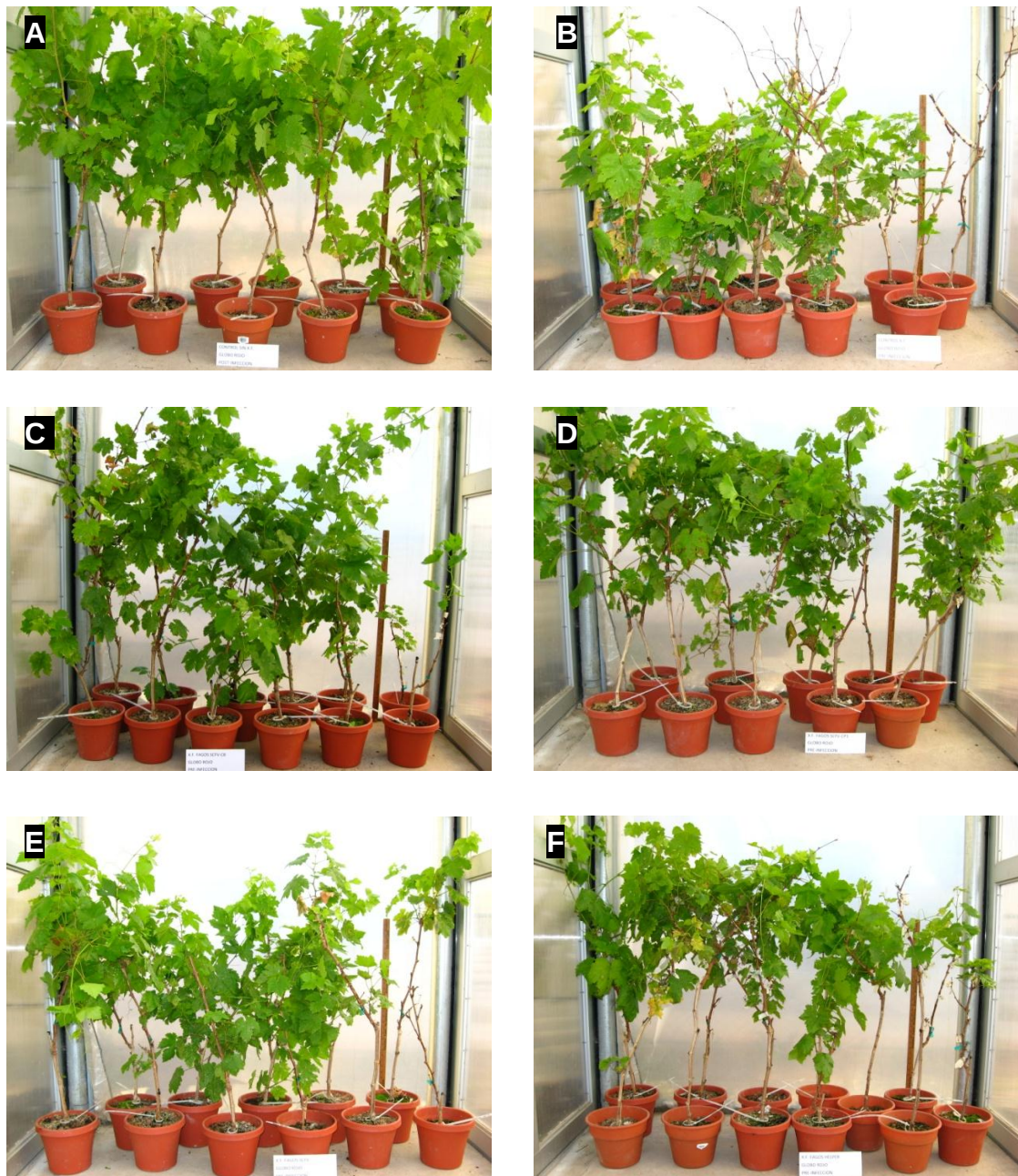


Fig. 16. Plantas de Red Globe tratadas con diferentes fagos en fase preinfección con *X. fastidiosa*, registradas después de 7 meses de la aplicación del tratamiento. Se observa que a diferencia de las plantas infectadas no tratadas (B) con crecimiento irregular en zonas alejadas del punto de infección, aquellas con los tratamientos de scFv-CB (C), scFv-CP1 (D) y Helper (F) fueron más similares al control sin infectar (A). Con tratamiento scFv (E) siguió en menor recuperación. Ordenadas de izquierda a derecha según el mayor crecimiento y aparición de tallos laterales cercanos al tallo principal.

6.2.2. Postinfección en Red Globe

En la fase postinfección hubo diferencias significativas en los tratamientos aplicados ($p=0.009$) (Tabla IX). Con un promedio de 185 ufc/mg en plantas infectadas sin tratar, con $n=11$ y una planta de la cual no se obtuvo bacterias, el tratamiento en el que se observó menor presencia en el número de colonias de *X. fastidiosa* fueron el tratamiento con fago Helper con 8 ufc/mg, con $n=10$ en las que en 7 plantas hubo cero presencia de bacterias, seguido del tratamiento scFv-CB con 60 ufc/mg, $n=10$ con 3 plantas que no presentaron bacterias, el fago scFv con 120 ufc/mg, con $n=11$ de las cuales 6 plantas no presentaron bacterias, y el fago scFv-CP1 con 97 ufc/mg, $n=12$ con solo 2 plantas sin presentar bacterias, (Fig. 17) (Ver Apéndice A).

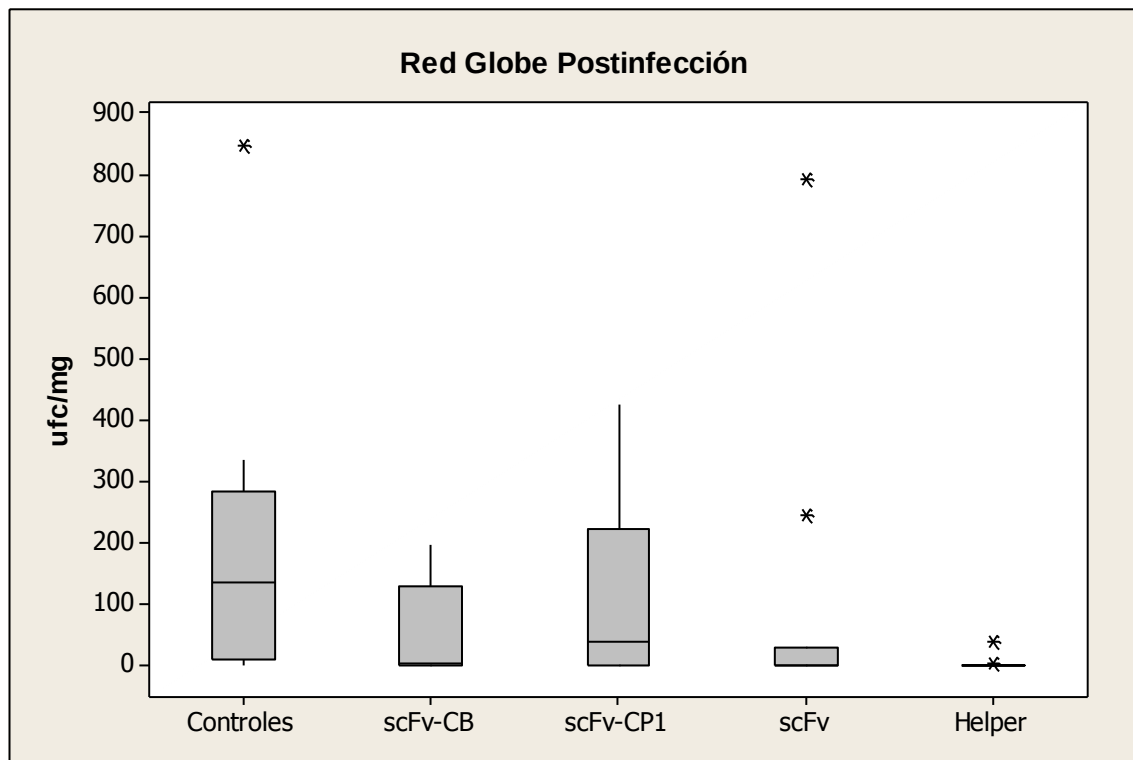


Fig. 17. Tratamiento en fase de postinfección con los diferentes fagos contra *X. fastidiosa* en Red Globe. Plantas infectadas con 1×10^6 bacterias, y 10 días después tratadas con 2.6×10^{13} fagos, con intervalos de 10 días entre cada dosis. De 21 a 24 días después se realizó el muestreo de la extracción de la savia de peciolo. El tratamiento con fago Helper presentó un 98 % de eliminación, seguido de scFv-CB con 67%, scFv con 47%, y scFv-CP1 con 34%. Las barras representan el número de ufc por mg por planta. Los extractos se sembraron en medio sólido PD2, y las colonias se contaron después de 10 días de cultivo a 28 °C. ($p=0.009$).

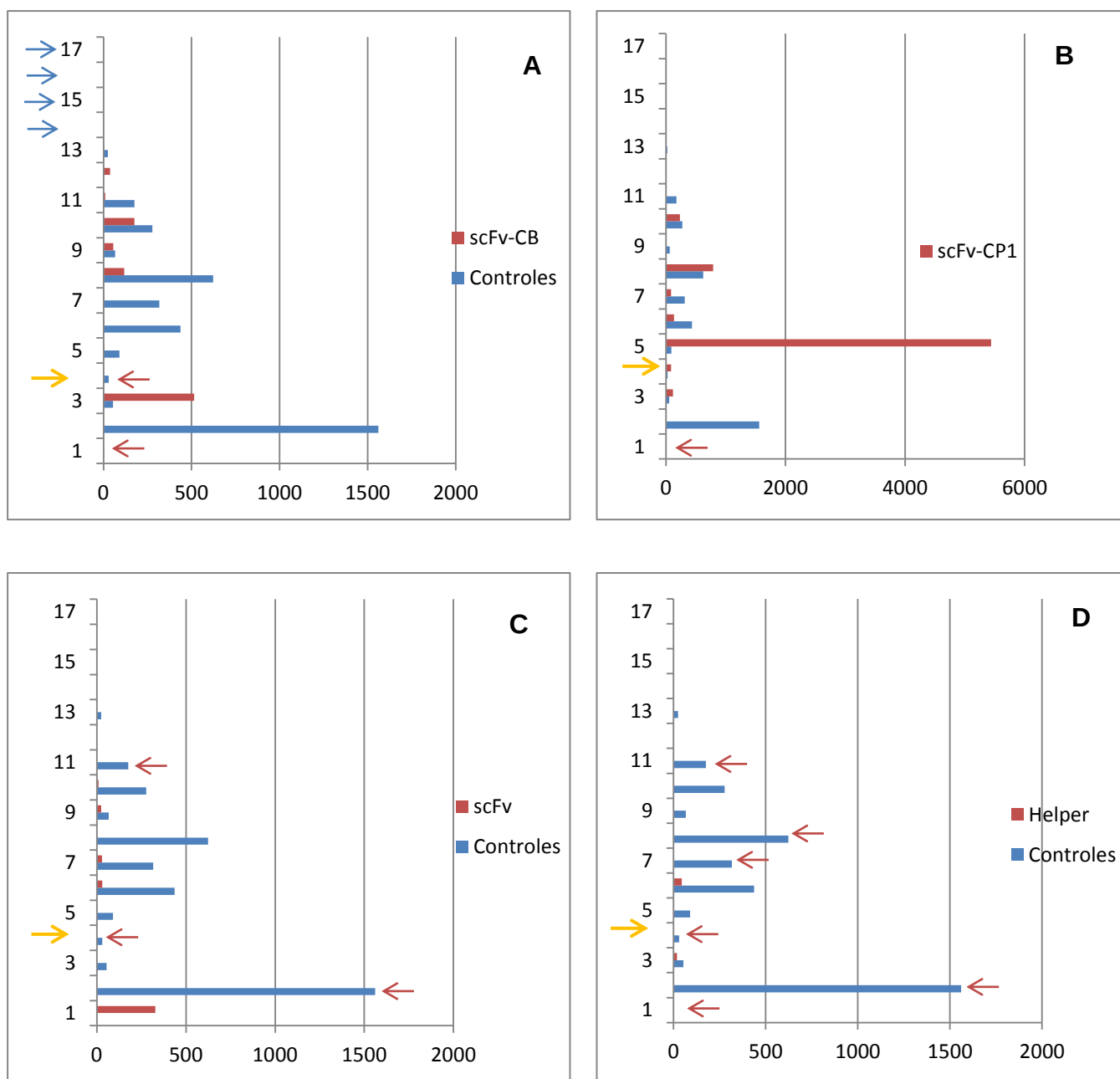


Fig.18. Distribución de *X. fastidiosa* por nudo en los peciols de plantas de Red Globe tratadas con los diversos fagos y no tratadas en postinfección. En el eje de las y se muestra el número de nudo desde la base de la planta, y en el eje de las x, el promedio del número de ufc/mg de bacterias. La colecta de las plantas controles infectadas sin tratar fue del nudo 1 al 17. La colecta en las plantas con tratamiento fue con (A) scFv-CB, desde el nudo 1 al 12, (B) scFv-CP1, del nudo 1 al 10, (C) scFv, del nudo 1 al 11, (D) Helper, del nudo 1 al 11. Las flechas en rojo indican cuando no colecto ninguna bacteria en ese sitio, 0 ufc/mg, flechas azules indican donde fue 0 ufc/mg de bacterias en controles infectados sin tratar. La flecha amarilla indica el sitio donde se infectó con las bacterias en el 4to internudo, con 10^6 células, y el sitio del tratamiento con seis dosis posteriores a la infección de 2.6×10^{13} fagos, separadas por 10 días entre cada una.

En el análisis de los pecioloos según el número de nudo (Fig. 18), la presencia de las bacterias fue mayormente en los 6 nudos arriba del sitio de infección y tratamiento en las plantas control infectadas sin tratar. En las plantas tratadas con fagos scFv-CB (A), las bacterias se ven disminuidas en estos sitios, mas no por debajo de estos. Con fagos scFv-CP1 (B) la proliferación que se observó, fue en sitios 3 nudos arriba del punto de infección. Con fagos scFv (C), ocurrieron más números en la zona debajo del punto de infección, y se observa que en los 6 nudos arriba de este es donde menos números se encontraron, lo que lo hace un buen candidato para tratamiento. Con fagos Helper se presentaron los números más bajos arriba y debajo que en los otros tratamientos y fue el que más sitios tuvo con 0 ufc en los sitios analizados (D).

En los tratamientos postinfección, analizadas 9 meses después desde que inicio las infección, la sobrevivencia de las plantas vario en cada uno de los tratamientos (Fig. 19). El tratamiento Helper (F) tuvo el menor número de muertas, 2, con 8 sobrevivientes, de las cuales 6 presentaron un crecimiento profuso al igual que los controles. En aquellas tratadas con fagos scFv-CB (C), n=10 con 5 vivas, las cuales todas tenían un crecimiento profuso como en las plantas control sin infectar. No así fue el caso con el tratamiento con fagos scFv (E), n=12 con 7 vivas, en el que el crecimiento se dio de manera irregular, y con el tratamiento con fagos scFv-CP1, n=12 con solo 3 vivas. En las plantas infectadas sin tratar hubo rebrote de solo 6 de las 12 plantas originales, el cual se observó que era de manera irregular, con hojas pequeñas, en sitios alejados al punto de infección.



Fig. 19. Plantas de Red Globe tratadas con diferentes fagos postinfección con *X. fastidiosa* registradas después de 9 meses. El tratamiento Helper (F) tuvo 2 plantas sin rebrotar, con 8 que lo hicieron muy similar al control. En aquellas tratadas con fagos scFv-CB (C), $n=10$ y 5 con rebrote, las cuales todas tenían un crecimiento profuso como en las plantas control sin infectar. No así fue el caso con el tratamiento con fagos scFv (E), $n=12$ con 7 plantas con rebrote, y con el tratamiento con fagos scFv-CP1, $n=12$ con solo 3 con rebrote, en los que el crecimiento se dio de manera irregular, Ordenadas de izquierda a derecha según el mayor crecimiento y aparición de tallos laterales cercanos al tallo principal.

6.2.2.1.Relación de hojas sintomáticas con número de colonias obtenidas en fase postinfección en plantas de vid Red Globe

Se observó mayor presencia de hojas sintomáticas en los peciolo de los cuales se extrajo bacterias en plantas infectadas sin tratamiento (Tabla X). Si bien todas las plantas presentan hojas con síntomas, la severidad presentada en los grupos de tratamiento vario, sin embargo, un mínimo de síntomas se consideró para la clasificación, en los controles de plantas infectadas sin tratar, se observan los más severos (fig. 20E). En un porcentaje de menos del 5.5% ocurren hojas asintomáticas sin bacterias.

En aquellas plantas tratadas con scFv-CB, hay un 40% menos síntomas con respecto al control, y más del 70% no presentaban los peciolo bacterias, con una mayoría de hojas verdes asintomáticas (49.1%). El tratamiento con scFv-CP1 presento solo el 26.3% de las hojas asintomáticas sin bacterias y una mayoría del 41.7% en hojas sintomáticas con bacterias. Con fagos scFv, hubo un mayor porcentaje de hojas sintomáticas sin bacterias (42.3%) más hojas asintomáticas sin bacterias (23.4%), ya que concentro la mayoría de las células patógenas en pocos puntos de la colecta. Con fagos Helper se obtuvo un mínimo de hojas sintomáticas que presentaban bacterias (5.2%), con un total de 7.2% con presencia de bacterias. Es relevante la aparición de hojas que fueron sintomáticas sin bacterias (47.4%), y que se caracterizaron por tener la mínima aparición de la típica quemadura propia de la enfermedad. Los grupos que presentaron más hojas asintomáticas sin bacterias fueron los de los tratamientos con fagos scFv-CB y Helper, le siguen los tratamientos scFv-CP1 y scFv. Los tratamientos que presentaron los porcentajes más altos en hojas

sintomáticas sin bacterias fueron los de los tratamientos con fagos Helper y scFv.

La figura 20 muestra la apariencia típica de las hojas presentada en los muestreos con el ejemplo de una planta por tratamiento. Se observó que en general las plantas tratadas con los fagos Helper (D) eran las más asintomáticas.

Tabla X. Porcentaje de la relación de síntomas en hojas con la presencia de bacterias en peciolo colectados en fase postinfección con plantas de Red Globe por cada tratamiento con los diversos fagos

	Con Bacterias (%)		Sin Bacterias (%)	
	Síntomas	Asíntomas	Síntomas	Asíntomas
Controles	62.5	3.9	17.7	15.9
scFv-CB	22.7	5	23.2	49.1
scFv-CP1	41.7	5.4	24.6	26.3
scFv	28.6	2.8	42.3	23.4
Helper	5.2	2	47.4	44.3

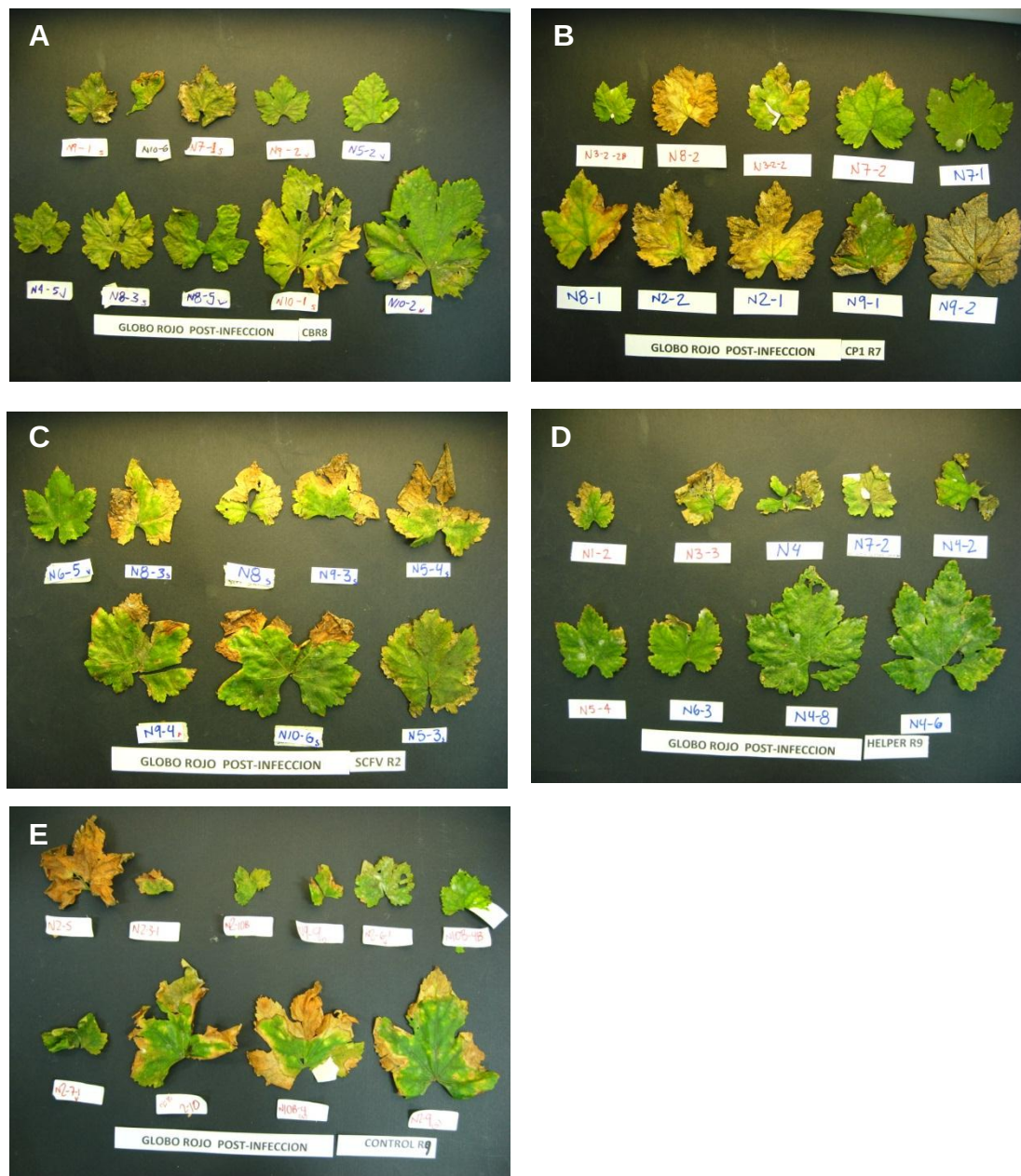


Fig. 20. Ejemplos de las colectas de las hojas del área de muestreo en cada uno de los tratamientos con los diversos fagos en plantas de Red Globe en fase postinfección. Las hojas corresponden a cada uno de los peciolo analizados de una sola planta. Tratamientos con fagos (A) scFv-CB, (B) scFv-CP1, (C) scFv, (D) Helper, y (E) controles infectados sin tratar. Representan la apariencia más común de cada grupo de tratamiento. Los síntomas de la enfermedad de Pierce más severos fueron en plantas infectadas sin tratar, y en aquellas tratadas con fagos Helper fueron los menos severos y los que menos ocurrencia tuvieron. Fotos tomadas en mismo día de la extracción de la savia de los peciolo.

6.2.3. Postsíntomas en Red Globe

En el caso de la fase postsíntomas, los resultados no fueron significativamente diferentes ($p=0.900$). Los controles infectados sin tratar tuvieron un promedio de 223 ufc/mg de muestra, $n=12$, con la mitad de las plantas sin presencia de bacterias. Los tratamientos tuvieron resultados muy similares; para scFv $n=11$, con 5 plantas con 0 colonias, y Helper $n=10$ con 7 plantas con 0 colonias, ambos con un promedio 100 ufc/mg. De manera similar scFv-CB ($n=12$) con 7 plantas con 0 bacterias colectadas y un promedio de 96 ufc/mg, y scFv-CP1 con el promedio más bajo, 77 ufc/mg, $n=10$, y 6 plantas con 0 colonias colectas (Fig. 21). Con respecto al control, se eliminó a la bacteria en un 50%, en general en todos los tratamientos. Estos resultados refuerzan la idea de un tratamiento antes de entrar en periodo de dormancia, con plantas jóvenes que hayan sido infectadas recientemente.

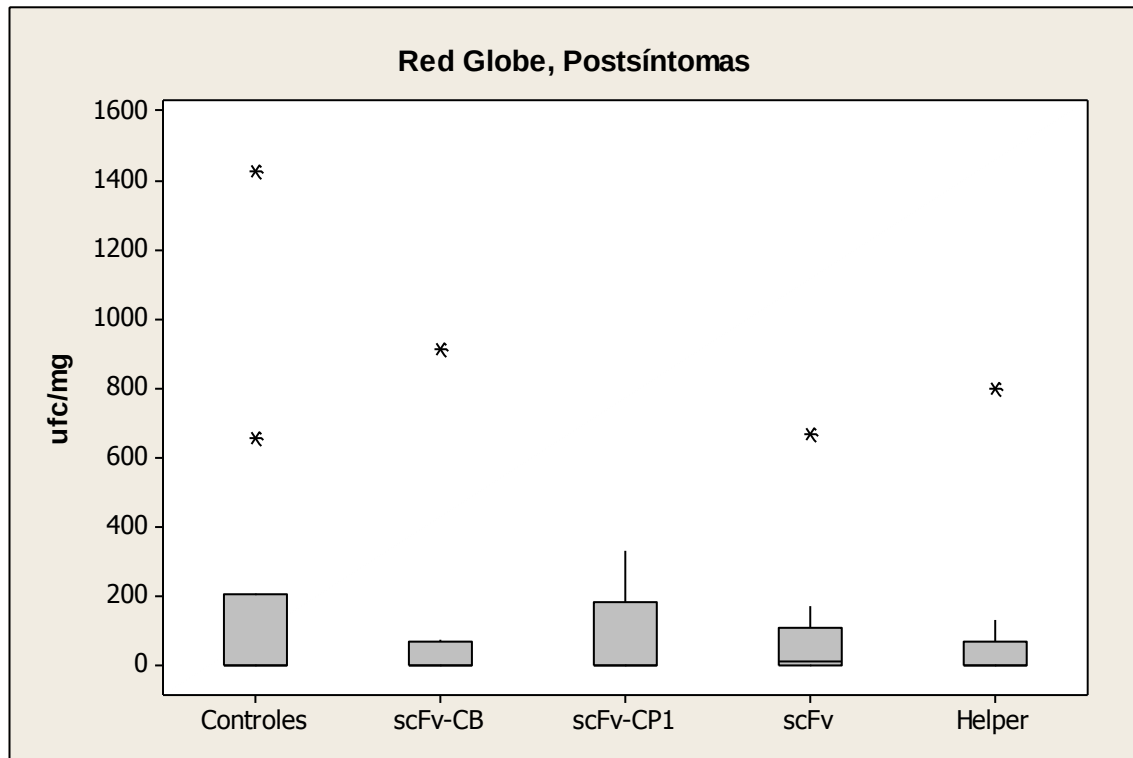


Fig. 21. Tratamiento en fase de postsíntomas con los diferentes fagos contra *X. fastidiosa* en Red Globe. Plantas infectadas con 1×10^6 células del patógeno, que después de 3 meses se trataron con 5 dosis de 2.6×10^{13} fagos. La prueba indica que son muy similares los resultados con los diversos fagos, $p=0.900$. Las barras representan las medianas del número de ufc por mg por planta, que fueron analizadas 8 días después de concluida la aplicación de los fagos. Los extractos se sembraron en medio sólido PD2, y las colonias se contaron después de 10 días de cultivo a 28 °C.

En el análisis de distribución de bacterias en los pecioloos según la altura del nudo (Fig. 22), en los tratamientos scFv-CB (A) no hay presencia de bacterias en 3 nudos arriba del punto de infección y tratamiento. Similarmente con scFv-CP1 (B), no se encontró en 2 nudos arriba y 2 debajo de este punto. scFv-CB no aumenta comparado con el control en los puntos alejados, pero no sucede así con scFv-CP1 que aumenta la presencia nudos arriba. Para el caso del tratamiento con scFv (C), no permitió que proliferaran bacterias 2 nudos arriba del punto de infección, este fue el que tuvo menos ocurrencia por altura de nudo . En el tratamiento con fago Helper (D), se presentaron bacterias 2 nudos arriba e inmediatamente abajo del punto de infección, sin embargo no se hallaron después de estos puntos, excepto en el nudo 13 de una sola planta.

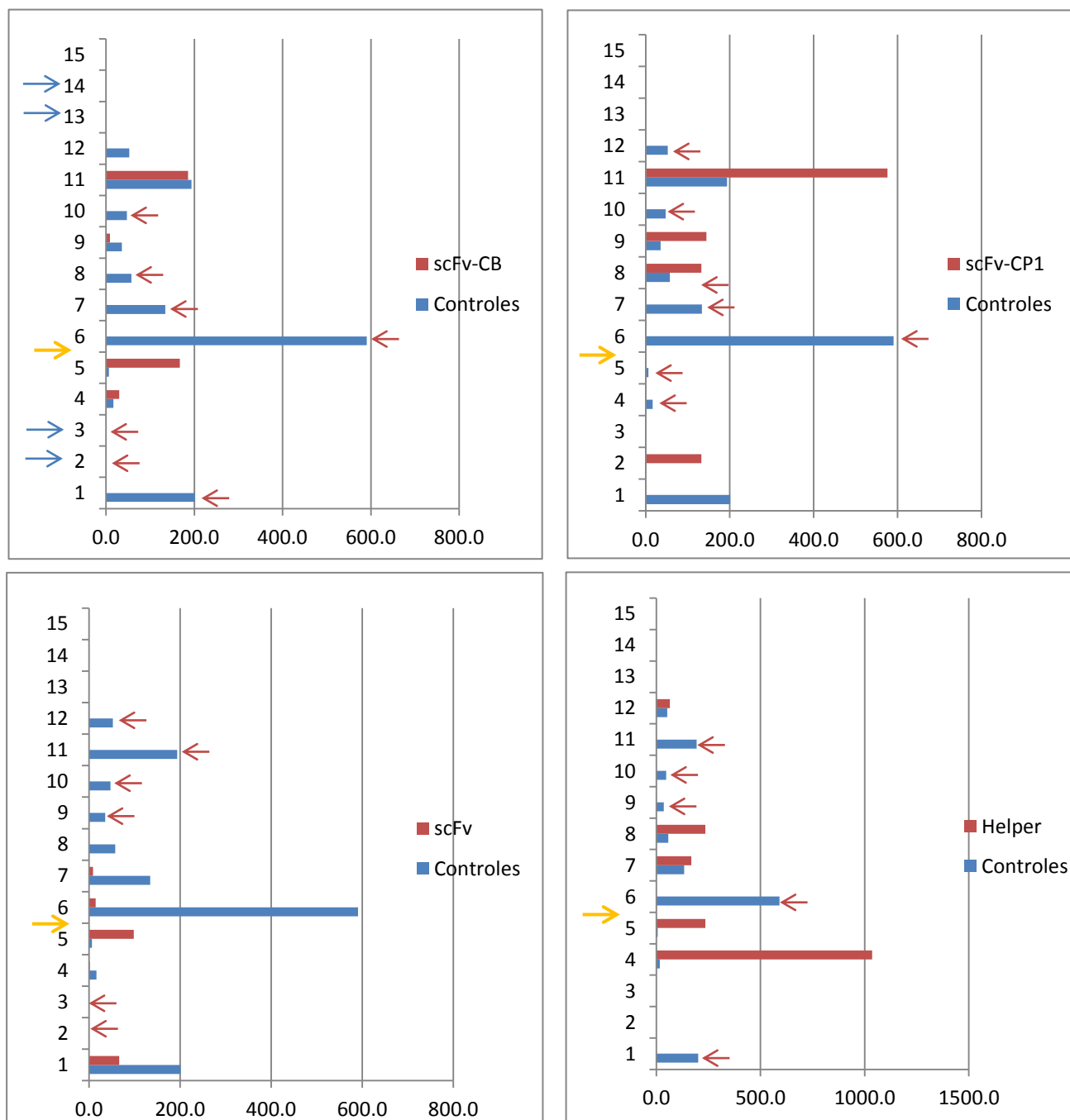


Fig. 22. Distribución de *X. fastidiosa* por nudo en los peciolo en plantas de Red Globe tratadas con los diversos fagos y no tratadas, en postsíntomas. En el eje de las y se muestra el número de nudo desde la base de la planta, y en el eje de las x, el promedio del número de ufc/mg de bacterias. La colecta de las plantas controles infectadas sin tratar fue del nudo -1 al 13. La colecta en las plantas con tratamiento fue con (A) scFv-CB, desde el nudo 1 al 14, (B) scFv-CP1, del nudo -1 al 11, (C) scFv, del nudo -1 al 11, (D) Helper, del nudo -1 al 12. Las flechas en rojo indican cuando no colecto ninguna bacteria en ese sitio, 0 ufc/mg, flechas azules indican donde fue 0 ufc/mg de bacterias en controles infectados sin tratar. La flecha amarilla indica el sitio donde se infectó con las bacterias en el 4to internudo, con 10^6 células, y el sitio del tratamiento con seis dosis de 2.6×10^{13} fagos después de 95 días posteriores a la infección, separadas por 10 días entre cada una.

7. DISCUSIONES

En este estudio se analizó el efecto de bacteriófagos que expresan moléculas en contra de *X. fastidiosa*, en plantas de vid infectadas artificialmente. Estos bacteriófagos fueron probados con anterioridad en experimentos *in vitro*, donde se eliminó a la bacteria a distintas concentraciones y tiempos (Silva-Valdés, 2008).

Se creó un anticuerpo scFv que reconoce al patógeno de la enfermedad de Pierce con alta especificidad, y este se unió a dos péptidos líticos, Cecropin B y P1, por separado, que son eficaces en contra de bacterias gram negativas y con un amplio espectro de reconocimiento de especies (Bodgen, *et al*, 2003). Pruebas realizadas *in vitro* con estas moléculas expresadas en bacteriófagos VCSM13 mostraron tener más efectividad en contra de *X. fastidiosa*. Estos fagos se producen en *E. coli* en grandes cantidades, y tienen la capacidad para poder expresar en la cápside del bacteriófago una gran diversidad de moléculas (Barbas *et al*, 2001).

Se realizaron pruebas con los fagos antes y después de la introducción del patógeno, y después de que se presentaran síntomas cuando la bacteria se ha establecido generando la enfermedad para poder conocer si funcionaría como preventivo, o como curativo en etapas tempranas o cuando la enfermedad es visible presentando síntomas.

La cepa Baja utilizada en estos experimentos, fue elegida por ser aislada de la zona del Valle de Guadalupe, Baja California, México (Guevara-Lugo, J. 2002). No se había utilizado por anterioridad para estudios de control de la enfermedad, solo para aquellos que describen su capacidad patogénica

(Almeida y Purcell, 2003). Un análisis de restricción realizado en nuestro laboratorio dio un patrón igual de fragmentos de pares de bases entre esta cepa y STL (Álvarez-Delgado, 2006). STL es aislada del Valle de Napa, en California, E.U.A., esta fue utilizada para la generación de anticuerpos utilizados en este estudio. Se observó que la cepa Baja produjo rápidamente síntomas de la enfermedad de Pierce en las plantas infectadas de las variedades Cabernet Sauvignon y Red Globe, entre los 60 y 100 días. Se observó también, que al igual que las cepas STL, Temecula y M23, era eliminada por los fagos scFv-CP1 *in vitro* (Silva-Valdés, 2008), y que era reconocida por el anticuerpo scFv anti-*Xylella* producido en este estudio en ensayos de ELISA (datos no mostrados).

No existen muchas alternativas para aplicar en el combate a las enfermedades ocasionadas por *X. fastidiosa*, que sean directos al sistema vascular. Por tanto la aplicación directa al sistema vascular es la más efectiva, debido a problemas que se puedan encontrar con aquellos plaguicidas que pretendan ser aplicados a zonas foliares o radicales (Jones *et al*, 2007). En cuanto a tratamientos con bacteriófagos en contra de fitopatógenos, existen actualmente infinidad de ejemplos, tanto en experimentación, como en uso (Jones *et al*, 2008; Frampton *et al*. 2012), y todos refieren a aquellas enfermedades en áreas foliares o radicales; no hay utilización en la zona vascular, tanto del floema como xilema.

X. fastidiosa es un patógeno difícil de eliminar. Se han probado diversas técnicas y sustancias experimentalmente como en la práctica. Siempre existe el

resurgimiento de temporada a temporada. En tratamientos con antibiótico tetraciclina, en viñedos de Florida, aumento la incidencia de bacterias de un 40% el primer año a 80% el segundo año (Hopkins, 1979). No contempla este sistema la generación de resistencia a un solo blanco. En un estudio se encontró que esta bacteria es capaz de resistir al cobre en colonias formando biopelículas (Rodrigues *et al*, 2008). En este caso se contempla que podría ser este estadio de la vida de la bacteria una barrera que limite el acceso a agentes antimicrobianos (Patel, 2005). Tenemos evidencias que *in vitro* células sésiles son eliminadas al 100% por los fagos utilizados en este estudio (Silva-Valdés, 2008), mas no hay para el estadio de colonias en biopelículas. En el uso de cepas benignas propuesto Hopkins (2005) hubo que aplicarlas regularmente para que no resurgieran aquellas que son patógenas, pudiendo proteger vides por 4 años. El uso de frío como agente eliminador, requiere que haya temporadas debajo de 6°C en la zona del cultivo (Lieth, *et al*, 2011). Se han hecho estudios sobre compuestos fenólicos propios de las plantas de vid (Madoxx, *et al*, 2009) que aún se encuentra en desarrollo siendo que se determinará su efectividad. El uso de plantas transgénicas solo usa un tipo de molécula, que si bien puede eliminar a la bacteria recién esta se encuentre en el xilema (Scorza, *et al*, 2001, Dandekar, *et al*, 2012), Su desventaja es que se necesita más tiempo en ser desarrollado.

Los fagos aplicados provocaron la reducción de la bacteria en alguna de las fases de infección; los que presentaron más efectividad fueron los fagos Helper y scFv-CB. Todos los fagos reducen el número de bacterias en fase preinfección. El bajo número de colonias encontradas con respecto a los

controles de la fase preinfección, pudo ocurrir por una reducción rápida de las bacterias en el punto de inoculación, al encontrarse rápidamente con los fagos cuando estas aún no se establecen a lo largo de la planta, tanto con Cabernet Sauvignon como con Red Globe, que no permitió que hubiera un aumento en el número de células. Se ha reportado casos similares donde el crecimiento de un fitopatógeno se ve anulado por la presencia previa de fagos en la planta huésped (Frampton *et al*, 2012).

Red Globe se probó en postinfección y postsíntomas con infecciones realizadas en el mes de julio, en la fase de preinfección se realizó la infección a finales de septiembre, 3 meses después y el tratamiento duro 85 días, diferencia de 115 días de postinfección. La cantidad de células fue de 50 ufc/mg en preinfección y en las otras dos fases fue de aproximadamente 200 ufc/mg, cuatro veces más. El nivel bajo de bacterias permitió visualizar el efecto eliminatorio de los fagos. Siendo la bacteria dependiente de temperatura para su crecimiento, es probable que hayan proliferado más las bacterias en el mes de julio, que a finales de septiembre, cuando las temperaturas descienden.

En varios puntos a lo largo del muestreo por altura de nudo los fagos reducen la presencia de la bacteria. Posiblemente la capacidad para alcanzar puntos depende de que tan rápido se mueven en el xilema y se agotan por unirse al blanco, ya que la posibilidad de que se muevan por el xilema está limitada por los conductos que son continuos pero ramificados (Chatelet, *et al*, 2006).

Con fagos Helper hubo una alta ocurrencia de hojas sintomáticas sin bacterias. Se reportó que *X. fastidiosa* forma colonias que van muriendo, pero que

continúan bloqueando los conductos del xilema, ocasionando síntomas (Chatterjje, *et al.* 2008), lo que hace suponer que ocurrió que elimino sitios que recién comenzaban a establecerse, pero los síntomas se manifestaron aun después de eliminar las bacterias.

La viabilidad del fago fue evidenciada en los experimentos de preinfección, donde por los menos fueron capaces de sobrevivir por 10 días. Es posible la sobrevivencia de bacteriófagos por un periodo relativamente largo de tiempo. Se demostró que en experimentos con bacteriófagos en contra de *Xanthomonas pruni* aplicados en hojas de durazno eran efectivos antes de la infección con la bacteria (Civerolo 1969: en Frampton *et al*, 2012). La reducción en aplicación en fases de postinfección no fue comparable a preinfección posiblemente porque al no haber bacterias disponibles para los fagos, están tienen posibilidad de incrementar, pues ya se encuentran establecidas en el ambiente óptimo. Sin embargo aunque se infectó y 10 días después se comenzó la introducción de los fagos a la planta, y estas se aplicaron 5 veces más con el mismo tiempo de separación, no detuvo el crecimiento de las bacterias de todas las bacterias en las dos variedades de vid probadas. Se han visto similares resultados con otros fagos (Frampton *et al*, 2007), en este caso posiblemente debido a la naturaleza de *X. fastidiosa* de no presentarse de manera homogénea dentro de xilema, sino que se presenta en algunos vasos, donde comienza a crecer, siendo estas colonias grandes las más problemáticas y que producen más síntomas (Newman *et al*, 2003). Por lo tanto encontrarse los fagos en estos sitios y a las cantidades que se requieren para

eliminarlas podría ser un problema dado que muchos de estos fagos podrían perderse y desperdiciarse en vasos donde no hay bacterias presentes.

Los fagos M13 tienen a 37°C la temperatura óptima para producirse en *E. coli* (Barbas, *et al.*, 2001). La viabilidad de *X. fastidiosa* se compromete cuando la temperatura alcanza este punto (Feil y Purcell, 2001), si bien los fagos podrían circular por el sistema vascular sin afectarse, por otro lado la temperatura más baja a la cual sobrevive la bacteria en plantas de vid cultivadas en maceta se reportó entre 12 y 17 °C. En estos experimentos cuando las temperaturas promedio del ambiente bajaron a estos niveles, alrededor de noviembre y diciembre, no se pudo observar que la combinación de temperatura baja con la acción de los fagos sobre el patógeno, pudieran haber creado un efecto aún más abrupto, en plantas de Red Globe en fase postsíntomas. Posiblemente la baja actividad de la planta de disminuir la circulación de la savia no ayudo a ver este efecto. Sin embargo en Cabernet Sauvignon en fase postsíntomas si se vio reducción con los fagos scFv-CB, scFv y Helper.

El análisis por peciolo es efectivo, dado que se ha observado que es el sitio que concentra más bacterias que en los tallos (Baccari y Lindow, 2011). En estos experimentos se utilizó una cantidad alta de bacterias, 1×10^6 células, en Cabernet

Sauvignon el promedio por peciolo fue máximo 10^4 células y en Red Globe 10^2 ufc por miligramo. La transmisión natural por el insecto vector nunca alcanza a ser tan alta, en una sola inoculación, pues con que adquiera alrededor de 100 células transmite la bacteria (Hill y Purcell, 1997), además de que pueden ocurrir varios eventos de transmisión (Chatterjee, *et al.*, 2008). La intención de

estos experimentos era el provocar un escenario grave, para tratar de eliminar una alta infección, un solo punto para mayor control del experimento.

En nuestros experimentos un solo punto de infección y tratamiento permitieron visualizar una sola zona de la planta de manera controlada. En el campo de cultivo las plantas pueden tener múltiples sitios de infección por parte del insecto vector (Hill y Purcell, 1997) lo que obliga a proteger en varios puntos. La distancia que puede recorrer en promedio una sustancia en el xilema que no tenga un tamaño mayor a 0.02 nm del diámetro del poro puede llegar desde un punto desde el tallo a peciolo y de peciolo hasta hojas sin que existan restricción como se observó con partículas de tintura (Chatelet, *et al.*, 2006). La eficiencia de los fagos para pasar por las membranas intervasales, dependería del tamaño; el fago VCSM13 (Helper) mide aproximadamente 900 x 6 nm (Barbas, *et al.*, 2001), el tamaño de los vasos en los tallos para el género *Vitis* es de 1 m de largo, y donde el patógeno puede pasar con libertad, lo que también muy posiblemente pasa con los fagos. Para *X. fastidiosa* el paso se complica al tener que pasar de tallo a peciolo, donde se cree esta digiere la membrana de la pared celular, lo que ayudaría al paso de los fagos después de que esta dio paso por esta zona, si la bacteria aún no ha degradado este paso, podría ser variable el paso de los fagos dado el largo tamaño. Por otro lado, estudios indican que el xilema es un conducto continuo de tallo-peciola a peciolo-hoja, y que *X. fastidiosa* es capaz de pasar de manera pasiva por estos canales (Chatelet, *et al.*, 2006). Dado el tamaño de la bacteria de 0.25-0.35 x 0.9-3.5 μm , el de los fagos no es impedimento para que pasen libremente por

los espacios intervasales, pudiendo ser posible llegar desde un punto del tallo hasta las hojas.

El posible mecanismo de acción en contra del patógeno *X. fastidiosa* por parte de los fagos Helper no se conoce. Podría ser bloqueando el sistema de secreción tipo I posiblemente involucrado en la forma del fago de eliminar a *X. fastidiosa*. Esta bacteria tiene un homólogo TolC que es parte de este sistema (Reddy, et al 2007, Simpson et al 2000). El *tolC* en *E. coli* permite la entrada del fago VCSM13 (Barbas, et al, 2001). Reddy y colaboradores (2007) encontraron que mutantes de *tolC* pierden patogenicidad, no generan síntomas y no son capaces de ser recuperadas en plantas después del punto de infección. Sin este sistema, el patógeno no es capaz de resistir drogas a las que es sensible, no generando enfermedad y sin capacidad para moverse sistémicamente por la planta.

Los fagos podrían actuar interrumpiendo funciones vitales de la célula, cuando recién comienza a establecerse la bacteria en el xilema proporcionándole ventaja de actuar, porque aunque se reducen los números en tratamientos después de la infección, lo cual limitaría que avanzara la enfermedad.

Por otra parte el fragmento de anticuerpo scFv creado en contra de *X. fastidiosa* en forma soluble inhibió el crecimiento de esta cuando se probó *in vitro* (Silva-Valdés, 2008). Aun no se sabe cuál es el antígeno que reconoce el scFv. Álvarez-Delgado (2006) observó que en fracciones de lisados celulares, se unió al extracto complejo, pero cuando se separó no se vio que se uniera a extracto intracelular, por lo que es posible que sea un antígeno presente en membrana.

No se sabe la razón del aumento de bacterias en plantas de Cabernet Sauvignon en fase postinfección con fagos Helper y scFv, con respecto a los controles infectados sin tratar. Para prevenir al 100% la aparición de bacterias en las siguientes temporadas, en lugar de dos dosis previas a la infección la recomendación es aumentar la dosis antes de la infección para prevenir totalmente.

Las bacterias serán removidas aún más en etapas cercanas a la de alta actividad de las plantas. Persistirán menos entre más se acerque la época invernal (Feil y Purcell, 2001), que es cuando entran en dormancia. Se propone aplicar el tratamiento cuando inicia de nuevo el rebrote y la planta vuelve a entrar en actividad al inicio de la primavera. En experimentos en cultivos de vid en campo infectadas con *X. fastidiosa* y tratadas con fagos Helper, aplicados con la ayuda de un dispositivo para difusión dentro del xilema, la mayor absorción de líquido se efectuó entre abril y junio (Torres-Gutiérrez, 2012).

Ya que todos los fagos pueden reducir en algún momento la presencia de *X. fastidiosa*, sería posible usarlos en combinación. Estudios con fagos diversos contra un solo patógeno aplicados en mezcla han probado ser más efectivos que en solitario. Flaherty, *et al* (2000) probaron que fagos utilizados para combatir la mancha bacteriana del tomate, disminuyeron la severidad de la enfermedad en un 17%, comparado con plantas no tratadas. Por otro lado se ha visto que en un solo tipo de fago, ha resultado exitoso para combatir la mancha de durazno (Frampton *et al.* 2012).

Debido a que no existen tratamientos infalibles para combatir a cualquier fitopatógeno, es necesaria la constante búsqueda de nuevas alternativas para evitar resistencia, sobretudo nuevas formas y métodos que faciliten su producción, que sean versátiles de modificar, así como estrategias efectivas de aplicación. Este sistema puede prometer estas cualidades, dado que puede ser modificado el blanco a unión para eliminar a la bacteria. La utilización de fagos como agente antimicrobianos ha sido propuesto como una alternativa biotecnológica muy viable para aplicar en agricultura, como vehículos para el despliegue en fagos, como antibacterianos o para entrega de vacunas (Haq, *et al.*, 2012).

8. CONCLUSIONES

Todos los fagos reducen el crecimiento de la bacteria *X. fastidiosa* en alguna de las fases de infección probadas en las dos variedades de vid, Cabernet Sauvignon y Red Globe.

En experimentos de preinfección, todos los fagos reducen el crecimiento de *X. fastidiosa* en las dos variedades de vid, en Cabernet Sauvignon más del 87 % con 135 días de tratamiento y red 97% con 115 días de tratamiento.

El tratamiento con fagos scFv-CB en plantas de Red Globe redujo 100% la aparición de bacterias en preinfección con 115 días de tratamiento.

El tratamiento con fagos Helper de 85 días en fase postinfección reduce la aparición de síntomas en Red Globe en un 70%.

Siete meses después de tratadas las plantas de Red Globe con los fagos en fase preinfección, la apariencia de las plantas es similar a aquellas plantas control sin infectar ni tratar.

9. LITERATURA CITADA

- Almeida, R. P.P., Purcell A. H., 2003. Biological traits of *Xylella fastidiosa* strains from grapes and almonds. *Applied and environmental microbiology*. 69: 7447-7452.
- Agrios, G.N. 1997. *Plant pathology*. 4ta edición. Academic Press. Estados Unidos de América. 453-456.
- Álvarez-Delgado, P.C., 2006. Proteínas reconocidas por un Fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de gallina dirigido en contra de *Xylella fastidiosa*. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Baja California. México. Pags. 66.
- Andersen P.C., M.L. Ishida, E.A. Momol, B.V. Brodbeck B. Leite, M.T. Momol. 2004. Influence of *Vitis* xylem fluid and xylem fluid plus cecropin on growth of *Xylella fastidiosa*. *Vitis*. 43:19-25.
- Andersson, M., A. Boman, H.G. Boman. 2003. *Ascaris* nematodes from pig and human make three anti-bacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cellular and molecular life sciences*. 60: 599-606.
- Baccari, C, S. E. Lindow. 2011. Assesment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars. *Phytopathology*. 101: 77-84.
- 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. Capítulos 1-23.

- Brogden, K.A., M. Ackermann, P.B. McCray, B.F. Tack. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defenses. *International journal of antimicrobial agents*. 22: 465-478.
- Chatelet D.S., M.A. 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., Almeida, R.P.P, Lindow, S. 2008. Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 243-271.
- Costa, H.S., Raetz, E., Pinckard, T.R., Gispert, C., Hernandez-Martinez, R., Dumenyo, C.K., Cooksey, D.A. 2004. Plant host of *Xylella fastidiosa* in and near southern California vineyards. *Plant Disease*. 88: 1255-1261.
- Davis. M.J., A.H. Purcell, S.V. Thompson. 1977. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science*. 199: 75-77.
- Feil, H., A. H. Purcell, 2001. Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in potted grapevines. *Plant Dis.* 85:1230-1234.
- Flaherty J.E., J.B. Jones, B.K. Harbaugh, G.C. Somodi, L.E. Jackson. 2000. Control of Bacterial Spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. *HortScience*. 35: 882-884.
- Frampton R.A., A.R. Pitman, P.C. Fineran. 2012. Advances in Bacteriophages-mediated control of plant pathogens. *International journal of microbiology*. 2012. pp 11.

- Guevara-Lugo, J. 2002. Importancia de la enfermedad de Pierce. Memorias XXV congreso nacional de control biológico. 15-17.
- Hagens S., M.J. Loessner. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 513-519.
- Haq I.U.,W.N. Chaudhry, M.A. Akhtar, A. Andleeb, I. Qadri. 2012. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. Virology Journal. 9:9.
- Hill, B.L., A.H. Purcell. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. Phytopathology. 85: 1368-1372.
- Hopkins, D.L. 1979. Effect of tetracycline antibiotics on Pierce's disease of grapevine in Florida. Proc. Fla. State Hort. Soc. 92: 284-285.
- 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.
- Hopkins, D.L., A.H. Purcell. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathology. 34: 131-151.
- Hopkins, D.L., A.H. Purcell. 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. Phytopathology. 87: 1197-1201.
- Hopkins, D.L., A.H. Purcell. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. Plant disease. 86: 1056-1066.
- Inal J.M. Phage therapy. 2003. A reappraisal of bacteriophages as antibiotics. Arch. Immunol. Ther. Exp. 51: 237-244.

- Jones J.B., L.E. Jackson, B. Balogh, A. Obradovic, F.B. Iriarte, M.T. Momol. 2007. Bacteriophages for plant disease control. *Annu. Rev. Phytopathology*. 45: 245-262.
- Kuzina, L.V., T.A. Miller, D.A. Cooksey. 2006. *In vitro* activities of antibiotics and antimicrobial peptides against the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*. *Letters in applied microbiology*. 42: 514-520.
- Lieth J.H., M.M. Meyer, K.H. Yeo, B.C. Kirkpatrick. 2011. Modeling cold curing of Pierce's disease in *Vitis vinifera* "Pinot Noir" and "Cabernet Sauvignon" grapevines in California. *Phytopathology*. 101: 1492-1500.
- Maddox C.E., L.M. Laur, L.Tian. 2010. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*, *Curr. Microbiology*. 60: 53-58.
- Minsavage, G.V., C.M. Thompson, D.L. Hopkins, R.M. Leite, R.E. Stall. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*. 84: 456-461.
- Newman K.L., R.P.P. Almeida, A.H. Purcell, S.E. Lindow. 2003. Use of green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 7319-7327.
- Patel R. 2005. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 437: 41-47.
- Reddy, J.D., S.J. Reddy, D.L. Hopkins, D.W. Gabriel. 2007. TolC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* Grapevines. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20: 403-410.

- Rodrigues C.M., M.A. Takita, H.D. Coletta-Filho, J.C. Olivato, R. Caserta, M.A. Machado, A.A. de Souza. 2008. Copper resistance of biofilm cells of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 77: 1145-57.
- Scorza, R., D.J. Gray. 2001. Disease resistance in vitis. Patente No. 6,232,528 B1. Estados Unidos de América.
- Silva-Valdés S.E.M. 2008. Eliminación *in vitro* de *Xylella fastidiosa* utilizando bacteriófagos, fragmentos de anticuerpo y péptidos líticos. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Baja California. México. pp 115.
- Simpson, A.J.G., F.C. Reinach, P. Arruda, F.A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, *et al.* 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*. 406: 151-159.
- Torres-Gutiérrez O. 2012. Aplicación de bacteriófagos líticos en viñedo para el control de la enfermedad de Pierce. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Baja California. México.
- Wells, J.M., B.C. Raju, H. Hung, W.G. Weisburg, L. Mandelco-Paul, D.J. Brenner. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp.

APENDICE A. Resultados de la aplicación de diversos fagos para la eliminación de *X. fastidiosa* en plantas de vid, Cabernet Sauvignon y Red Globe.

Pruebas en invernadero en plantas de vid Cabernet Sauvignon, con los diferentes fagos en contra de *X. fastidiosa*.

Preinfección Cabernet Sauvignon ufc/peciolo/planta

Controles	scFv-CB	scFv-CP1	scFv	Helper
0.3	0.5	0.2	0.2	0.7
0.3	0.2	0.3	0.0	0.5
5436.8	0.5	0.3	0.2	0.2
2.3	15.0	13.3	46.2	0.0
125.5	0.2	644.2	10.5	0.3
	0.2	180.7	10.8	0.7

Preinfección Cabernet Sauvignon promedio ufc/peciolo/planta

1113.1	2.8	139.8	11.3	0.4
--------	-----	-------	------	-----

Postinfección Cabernet Sauvignon ufc/peciolo/planta

Controles	scFv-CB	scFvCP1	scFv	Helper
469.3	41.0	80.7	9.8	155.5
5.0	240.0	0.0	3.0	102.7
328.7	44.0	5.3	0.2	0.2
984.2	546.7	315.7	8776.0	7.2
166.7	50.2	0.0	3.0	0.3
0.2	546.5	8.7	0.0	4244.7

Postinfección Cabernet Sauvignon promedio ufc/peciolo/planta

325.7	244.7	68.4	1465.3	751.8
-------	-------	------	--------	-------

Postsíntomas Cabernet Sauvignon ufc/peciolo/planta

Controles	scFv-CB	scFv-CP1	scFv	Helper
700.6	0.0	1792.2	135.0	409.3
118.3	0.0	1721.5	239.3	0.3
6493.2	0.0	499.7	460.6	8.8
871.0	20.9			
1118.8				
224.9				

Postsíntomas Cabernet Sauvignon Promedi
ufc/peciolo/planta

1587.8	5.2	1337.8	278.3	139.5
--------	-----	--------	-------	-------

Preinfección Recuento ufc/peciolo/planta

Controles	scFv-CB	scFv-CP1	scFv	Helper
1288	582	4	4120	0
713	499	450	5255	0
	93	28	1570	0
	0	158	2758	0
	38	2458	1325	0
	540	1859	263	3033

Preinfección Recuento Promedio ufc/peciolo/planta

1000.5	292	826.1	2548.5	505.5
--------	-----	-------	--------	-------

Postinfección Recuento ufc/peciolo/planta

Controles	scFv-CB	scFv-CP1	scFv	Helper
0	1	9569	30	1793
0	44	580	7816	22
218	0	2823	0	59
0	474	4158	5105	1331
0	434	0	56	4692
0	557	432	2968	671

Postinfección Recuento Promedio ufc/peciolo/planta

36	252	2927	2663	1428
----	-----	------	------	------

Postsíntomas Recuento ufc/peciolo/planta

Controles	scFv-CB	scFv-CP1	scFv	Helper
5625	5144	1634	0	4643
10000	10	923	0	610
2679	1299	239	6143	1163
2583	17	0	196	0
2708	185	6236	6667	0
		0	5005	1042

PostSintomas Recuento Promedio ufc/peciolo/planta

4719	1331	1806.4	2601.2	1283.2
------	------	--------	--------	--------

Pruebas en invernadero en plantas de vid Red Globe, con los diferentes fagos en contra de *X. fastidiosa*.

Red Globe Preinfección ufc/mg promedio por planta

	Controles	scFv-CB	scFv-CP1	scFv	Helper
	133	0	0	0	0
	0	0	0	0	8
	148	0	0	0	0
	85	0	0	0	0
	34	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
	0	0		0	
	0	0		7	
	33	0		3	
	2	0			
	0	0			
	1	0			
Suma	436	0	0	10	8
Promedio	36	0	0	1	1

Red Globe Postinfección ufc/mg promedio por planta

	Controles	scFv-CB	scFv-CP1	scFv	Helper
	11	0	0	0	0
	78	0	225	29	0
	26	0	0	5	0
	282	172	0	0	0
	135	8	215	0	75
	156	1	425	0	0
	335	112	71	0	0
	846	0	2	792	4
	158	196	129	0	0
	4	115	259	244	0
	0		10	0	
			5		
Suma	2031	603	1343	1071	79
Promedio	185	60	122	97	8

Red Globe Postsíntomas ufc/mg promedio por planta

	Controles	scFv-CB	scFv-CP1	scFv	Helper
	123	72	330	71	0
	205	0	0	0	0
	657	0	0	24	134
	41	0	0	88	800
	1431	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	71	0	670	0
	0	0	139	0	0
	0	0	224	0	0
	0	0		169	
	0	916			
Suma	2458	1060	693	1021	934
Promedio	223	96	77	102	104

APENDICE B

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

Ajustar el pH a 7.0 y ajustar a 1 litro

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido

Enfriar a ~55° C y añadir los antibióticos deseados

PBS 1x (amortiguador de fosfatos salino)

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

12 mM Na₂HPO₄

1.2 mM KH₂PO₄

pH 7.4 HCl

Llevar a un litro con agua destilada y esterilizar por autoclave 20 minutos a ciclo líquido.

PD2.

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

4 g triptona

2 g soytona

1 g citrato trisódico

1 g succinato disódico

1 g MgSO₄·7H₂O

1.5 g K₂HPO₄

1 g KH₂PO₄

10 ml Hemina al 0.1% en NaOH 0.05 N

Ajustar el pH entre 6.8 y 7.1 con NaOH

Para medio sólido añadir 8 g Gelrite

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido.

PW y PWG.

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

4 g Fitona peptone

1 g Triptona

0.4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1.2 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

1 g KH_2PO_4

10 ml Hemina al 0.1% en NaOH 0.05 N

Para medio sólido añadir 8 g Gelrite

Ajustar el pH entre 6.8 y 7.1 con NaOH

Esterilizar por autoclave 20 minutos en ciclo líquido.

Enfriar a $\sim 55^\circ \text{C}$ y añadir los siguientes componentes esterilizados por filtración (0.22 μm):

4 g L-glutamina; disuelta por calentamiento, en 50 ml de agua destilada.

15 ml BSA 20%; añadir para disolverla en agua destilada, primero la mitad de los gramos y lentamente agregar la otra mitad, finalmente aforar.

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 (0.22 μm). Almacenar a 4°C .

APENDICE C

Volúmenes de los diversos fagos aplicados en plantas de vid

Tabla XI. Volúmenes de fagos aplicados en plantas Cabernet Sauvignon tratadas y no tratadas, con diversas construcciones de fagémidos y en diferentes fases de infección. Cada dosis tiene 7 días de separación y representan un promedio aplicado por el número de plantas utilizadas por tratamiento.

Fase	Fago	n	Volúmenes por cada dosis en μ l						Volumen promedio aplicado	Volumen promedio total
			1°	2°	3°	4°	5°	6°		
Preinfección	Sin fago	5	--	--	--	--	--	--	--	--
	scFv-CB	6	50	40	--	--	--	--	45	90
	scFv-CP1	6	83	91	--	--	--	--	87	174
	scFv	6	60	130	--	--	--	--	95	190
	Helper	6	129	150	--	--	--	--	140	279
Postinfección	Sin fago	6	--	--	--	--	--	--	--	--
	scFv-CB	6	40	40	40	40	40	80	47	280
	scFv-CP1	6	77	87	76	97	76	61	79	474
	scFv	6	117	203	112	58	75	90	109	655
	Helper	6	108	105	125	141	82	145	118	706
Postsíntomas	Sin fago	6	--	--	--	--	--	--	--	--
	scFv-CB	4	100	100	100	83	83	60	88	526
	scFv-CP1	3	*	55	90	*	*	84	76	229
	scFv	3	*	90	150	90	90	83	101	503
	Helper	3	103	100	100	82	80	82	91	547

--, * No hay datos.

n, considera plantas que llegaron al muestreo final.

Tabla XII. Volúmenes de fagos aplicados, en plantas Red Globe tratadas y no tratadas, con diversas construcciones de fagémidos y en diferentes fases de infección. Cada dosis tiene 10 días de separación y representan un promedio aplicado por el número de plantas utilizadas por tratamiento.

Fase	Fago	n	Volúmenes por cada dosis en µl						Volumen promedio aplicado	Volumen promedio total
			1°	2°	3°	4°	5°	6°		
Preinfección	Sin fago	12	--	--	--	--	--	--		
	scFv-CB	12	78	89	--	--	--	--	84	167
	scFv-CP1	6	150	121	--	--	--	--	136	271
	scFv	10	110	182	--	--	--	--	146	292
	Helper	10	90	117	--	--	--	--	104	207
Postinfección	Sin fago	11	--	--	--	--	--	--		
	scFv-CB	10	*	45	42	72	100	88	69	416
	scFv-CP1	12	*	81	96	124	65	92	92	550
	scFv	11	*	72	83	116	89	114	95	569
	Helper	10	*	90	158	165	200	143	151	907
Postsíntomas	Sin fago	12	--	--	--	--	--	--		
	scFv-CB	12	92	134	85	103	98	--	102	614
	scFv-CP1	10	82	120	123	139	122	--	117	703
	scFv	11	124	147	153	140	172	--	147	883
	Helper	10	85	128	192	67	96	--	114	682

--, * No hay datos.

n, considera plantas que llegaron al muestreo final.

APENDICE D

VALORES DE NORMALIDAD PARA CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS CONTRA *X. fastidiosa* Y CONTROLES

Tabla XIII. Pruebas de Normalidad para los datos obtenidos de plantas de vid Cabernet Sauvignon, con el tratamiento de los distintos fagos contra *X. fastidiosa*, en ufc totales/ planta, en distintas fases de infección.

Fase	Fago	Valor de p (>0.05)
Preinfección	Sin fago	<0.010
	scFv-CB	<0.010
	scFv-CP1	<0.010
	scFv	0.011
	Helper	>0.1
Postinfección	Sin fago	>0.100
	scFv-CB	>0.100
	scFv-CP1	<0.010
	scFv	<0.010
	Helper	<0.10
Postsíntomas	Sin fago	<0.010
	scFv-CB	>0.100
	scFv-CP1	0.091
	scFv	>0.100
	Helper	0.047

Tabla XIV. Pruebas de Normalidad para los datos obtenidos en plantas de vid Cabernet Sauvignon, un año después del tratamiento con los fagémidos contra *X. fastidiosa*, en ufc promedio/planta.

Fase	Fago	Valor de p (>0.05)
Preinfección	Sin fago	> 0.100
	scFv-CB	>0.100
	scFv-CP1	0.092
	scFv	>0.100
	Helper	>0.100
Postinfección	Sin fago	> 0.100
	scFv-CB	>0.100
	scFv-CP1	>0.100
	scFv	>0.100
	Helper	>0.100
Postsíntomas	Sin fago	0.095
	scFv-CB	<0.010
	scFv-CP1	0.043
	scFv	>0.100
	Helper	0.042

Tabla XV. Pruebas de Normalidad para los datos obtenidos de plantas de vid Red Globe, con el tratamiento con los fagos contra *X. fastidiosa*, en ufc/mg/ planta, en distintas fases de infección.

Fase	Fago	Valor de p (>0.05)
Preinfección	Sin fago	<0.010
	scFv-CB	*
	scFv-CP1	>0.100
	scFv	<0.010
	Helper	<0.010
Postinfección	Sin fago	<0.010
	scFv-CB	0.040
	scFv-CP1	0.034
	scFv	<0.010
	Helper	<0.010
Postsíntomas	Sin fago	<0.010
	scFv-CB	0.010
	scFv-CP1	0.100
	scFv	<0.010
	Helper	0.030

* Todos los datos fueron 0.