

Prospección de bacteriófagos líticos para el control de *Ralstonia solanacearum*.

Pérez Juan Esteban, Saldarriaga Stiven
Universidad de Antioquia

Resumen. *Ralstonia solanacearum* es una bacteria habitante del suelo causante del marchitamiento bacteriano en una gran variedad de cultivos de importancia económica y es reconocida como una de las bacterias fitopatógenas más importantes debido a su letalidad, persistencia, distribución y amplio rango de hospederos (Denny., 2006; Genin and Denny., 2012). En el mundo el marchitamiento bacteriano causado por *Ralstonia solanacearum* es considerado una de las enfermedades de plantas más destructivas, las pérdidas de cosecha pueden alcanzar hasta el 100% en banano, el 90% en tomate y papa, el 30% en tabaco (Elphinstone., 2005). Las áreas más afectadas por la enfermedad en Colombia se presentan en la región de Urabá, departamento de Antioquia, donde se han erradicado áreas extensas de cultivos de plátano infestados (Castañeda y Espinosa, 2005). Las medidas de control actuales que involucran el uso de químicos tradicionales o antibióticos están perdiendo su eficacia debido al desarrollo natural de resistencia bacteriana a estos agentes (Laxminarayan *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2017). Además, se reconoce que el uso de antibióticos es ambientalmente hostil (Álvarez y Biosca., 2017; Buttimer *et al.*, 2017). La principal razón para que esta sea la alternativa de manejo más comúnmente utilizada es la ausencia de productos, de origen químico o biológico, que muestren eficacia sostenible en el tiempo controlando la enfermedad. Por lo tanto el control vigente basado en la exclusión y erradicación del material infectado conlleva también a la pérdida de material vegetal sano y a la inutilización de tierras fértiles. En consecuencia, la puesta a punto de una estrategia de manejo de la enfermedad que controle los brotes, erradique y prevenga la dispersión de la bacteria, y que además sea compatible con prácticas ambientalmente sostenibles y costo-efectivas es una necesidad en Antioquia y Colombia.

Palabras clave: biotecnología, terapia de fagos, bioprospección, control biológico

Introducción.

La bioprospección o prospección de la biodiversidad, se define como la búsqueda sistemática, clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas y otros productos que poseen un valor económico actual o potencial, y que se encuentran en los componentes de la diversidad biológica (Castree, 2003). La prospección de bacteriófagos nativos de diferentes regiones de nuestro territorio Colombiano tiene un enorme potencial para el desarrollo de nuevas alternativas biotecnológicas para el control de enfermedades causadas por bacterias (Young *et al.*, 2012). La búsqueda de bacteriófagos con potencial para ser usados como estrategia de control biológico se caracteriza por el aislamiento de fagos, la determinación del rango de hospederos, la caracterización molecular y los análisis genómicos y proteómicos (Svircev *et al.*, 2018). Si bien ya se han realizado esfuerzos para la bioprospección de bacteriófagos líticos y de que ya se ha demostrado el potencial de éstos para el control de *R. solanacearum*, existe la necesidad de aislar y caracterizar un número mayor de bacteriófagos. Ésto con el fin de contar con una mayor diversidad de bacteriófagos que puedan ser empleados en diferentes tipos de formulaciones para el control de la bacteria, que dificulten la aparición de resistencia y conserven su efectividad en condiciones de campo (Wei *et al.*, 2017).

Objetivo.

Establecer una colección de bacteriófagos líticos que puedan implementarse cómo método de control de la bacteria *Ralstonia solanacearum* causante de la enfermedad del moko en banano y plátano.

Metodología.

Aislamiento de bacteriófagos. Las muestras de suelo, para el aislamiento de fagos, se obtendrán de la rizosfera de diferentes musáceas. El aislamiento de fagos líticos se realizará según la metodología de Yamada *et al.* (2007) y Clokie and Kropinski. (2009). A partir de 300 g de suelo rizosférico, se tomarán 5 g de suelo en un falcón de 50 mL con 10 mL de caldo TSBS con CaCl₂ 1M (0.3% de TSB, 0.1% de sacarosa, 1 mL CaCl₂ por litro) y serán sometidos a agitación toda la noche a 150 rpm. Pasado este tiempo, las muestras enriquecidas serán centrifugadas a 3500 rpm x 20 min y filtradas a través de un filtro de membrana con tamaño de poro de 0.2 µm. La presencia de fagos líticos en el sobrenadante libre de suelo se evaluará por doble capa de agar y el método de la gota (spot method). La presencia de bacteriófagos en el sobrenadante será evaluada sobre 15 cepas diferentes de *R. solanacearum*. Para esto, 100 µL de una suspensión de *R. solanacearum* (1 x 10⁸ UFC/mL) se mezclará con 4 mL de TSAS semisólido (0.3% de TSB; 0.1% de sacarosa; 1 mL CaCl₂ 1M; 0.4% de agar por litro) y esta mezcla será vertida sobre platos de TSAS con CaCl₂ 1M. Luego, cada plato de Petri se dividirá en 8 secciones y 10 µL de cada filtrado será colocado en forma de gota, sobre cada división de la caja. Los platos se llevarán a la cámara de flujo por 40 min y luego pasarán a ser incubados por 24h a 28°C. Las placas detectadas después del periodo de incubación serán aisladas y almacenadas en buffer SM (Clokie and Kropinski, 2009).

Purificación de bacteriófagos líticos. Los sobrenadantes de fagos serán propagados y purificados a partir de una placa individual por el método de diluciones seriadas y doble capa de agar (Clokie and Kropinski, 2009). Para esto, 8 mL de medio TSBS con CaCl₂ 1M se inoculan con 1 mL de la cepa de *R. solanacearum* UA1591 (DO600 = 0.1 ≈ 1 x 10⁸ UFC/mL) y 1 mL de sobrenadante de fago. Después de 12 a 24h de crecimiento, las células son centrifugadas a 13500 rpm por 10 min. El sobrenadante se purifica por un filtro de membrana de 0.2 µm y la concentración de fagos es determinada por diluciones seriadas y doble capa agar. Para esto, 100 µL de una suspensión de *R. solanacearum* (1 x 10⁸ UFC/mL) y 100 µL de cada una de las diluciones de

la suspensión de fagos son mezcladas con 4 mL de TSAS semisólido. Esta mezcla se vierte sobre platos de TSAS con CaCl_2 1M e incubados a 28°C por 24 h. La concentración de fagos es calculada por conteo de placas (Clokier and Kropinski., 2009).

Manipulación y secuenciación del ADN. Para determinar la naturaleza del genoma del fago, aproximadamente 1 μg del genoma será sometido a digestiones enzimáticas con ADNasa I, ARNasa A, nucleasa S1 y exonucleasa I como se describe (Ahmad et al., 2017), así como con enzimas de restricción Eco RV y Sma I utilizando el método estándar de biología molecular (Sambrook y Russell, 2001). La secuenciación se realizará en el sistema PacBio, por su beneficio para generar fragmentos más largos lo que facilita el ensamblaje de un Genoma *de novo*. Sin embargo, debido a las deficiencias intrínsecas en las lecturas de PacBio, es decir, baja precisión (~ 15% de tasa de error), se propusieron varios enfoques que utilizan exclusivamente lecturas largas para producir genomas microbianos de novo (Koren et al., 2013; Chin et al., 2013). Los marcos de lectura abiertos potenciales (ORF) mayores de 50 aminoácidos (aa) serán identificados utilizando el programa informáticos PHASTER (Arndt et al., 2016). Para asignar las posibles funciones de los ORF, se realizarán búsquedas utilizando la BLASTp en contra de la base de datos de proteínas no redundantes en NCBI (Altschul et al., 1997). Posibles secuencias de ARNt serán predichas utilizando ARNscan-SE (Schattner et al., 2005). El análisis genómico comparativo de diferentes fagos será realizado mediante el uso de progressiveMauve (Darling et al., 2011).

Referencias.

- Ahmad, A.A., Stulberg, M.J., Mershon, J.P., Mollov, D.S., y Huang, Q. (2017). Molecular and biological characterization of ϕRs551 , a filamentous bacteriophage isolated from a race 3 biovar 2 strain of *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One*, 12(9):e0185034.
- Álvarez, B., y Biosca, E.G. (2017). Bacteriophage-based bacterial Wilt biocontrol for an environmentally sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, .8:1218.

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25:3389–3402
- Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., y Wishart, D.S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 44: W16–W21.
- Bae, J.Y., Wu, J., Lee, H.J., Jo, E.J., Murugaiyan, S., Chung, E., y Lee, S. (2012). Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. *Journal Microbiology Biotechnology*, 22(12):1613-1620.
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., O'Mahony, J., y Coffey, A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8:34.
- Castañeda, D.A., y Espinosa, J. (2005). Comportamiento e impacto de la enfermedad de moko en la zona de Urabá (Colombia) en las últimas tres décadas y media propuesta de un índice de riesgo de enfermedad. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58(1):2587 - 2599.
- Castree, N. (2003). Bioprospecting: from theory to practice (and back again). *Transactions of the Institute of British Geographers*, 28 (1): 35-55
- Chin, C.S., Alexander, D.H., Marks, P., Klammer, A.A., Drake, J., Heiner, C., ..., Korlach, J. (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nature Methods*, 10: 563-569.
- Clokie, M., y Kropinski, A. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods in Molecular Biology*, 501: 69-76.
- Denny, T.P. (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. En: Plant-Associated Bacteria. *Springer Publishing*. 573–644.
- Darling, A.E., Tritt, A., Eisen, J.A., y Facciotti, M.T. (2011). Mauve assembly metrics. *Bioinformatics* 27:2756–2757.
- Elphinstone, J.G. (2005). The current bacterial wilt situation: a global overview. En: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *APS Press*. 9–28.
- Genin, S., y Denny, T.P. (2012). Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annual Review of Phytopathology*, 50: 67-89.

- Koren, S., Harhay, G.P., Smith, T.P., Bono, J.L., Harhay, D.M., Mcvey, S.D.,... Phillippy, A.M. (2013). Reducing assembly complexity of microbial genomes with single-molecule sequencing. *Genome Biology*, 14(9): R101.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K., Wertheim, H.F., Sumpradit, N.,... Cars, O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12): 1057-1098.
- Lin, D.M., Koskella, B., y Lin, H.C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3): 162-173.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schattner, P., Brooks, A.N., y Lowe, T.M. (2005). The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic Acids Research*, 33:W686–W689.
- Svircev, A., Roach, D., y Castle, A. (2018). Framing the future with bacteriophages in agriculture. *Viruses*. 10(5):218.
- Wei, C., Liu, J., Maina, A.N., Mwaura, F.B., Yu, J., Yan, C.,... Wei, H. (2017). Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. *Virologica Sinica*. 32(6), pp. 476-484.
- Yamada, T., Kawasaki, T., Nagata, S., Fujiwara, A., Usami, S., y Fujie, M. (2007). New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Microbiology*. 153(Pt 8): 2630-2639.