

BACTERIÓFAGOS PARA EL CONTROL DE LA MARCHITEZ BACTERIANA EN JITOMATE

BACTERIOPHAGES FOR THE CONTROL OF BACTERIAL WILT IN TOMATOES

Jesús Hernández-Romano*,
Adrián Gómez de Jesús
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL ESTADO
DE MORELOS.

Jesús Martínez-Barnetche,
Juan Mauricio Téllez-Sosa
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

*Autor responsable
jhernandez@upemor.edu.mx

R E S U M E N

El jitomate es uno de los principales productos de exportación de México. Los cultivos de esta hortaliza están siendo atacados por el fitopatógeno bacteriano *Ralstonia solanacearum*, provocando importantes pérdidas económicas y desalentando la inversión en este producto, el cual presenta un mercado en continuo crecimiento, principalmente en los Estados Unidos. Así, este fitopatógeno contribuye a la reducción de la productividad y competitividad del campo mexicano. Los bacteriófagos son la entidad biológica más abundante del planeta y de manera natural regulan las poblaciones bacterianas. Estos agentes representan una alternativa innovadora y sustentable para el control de patógenos bacterianos. En este trabajo se reporta el aislamiento de bacteriófagos líticos potencialmente útiles para el control de *Ralstonia solanacearum*. Estos bacteriófagos se amplifican de manera estable, generando placas líticas de manera consistente y no presentan genes relacionados con lisogenia. El conocimiento del sistema de infección *Ralstonia*-jitomate permitirá determinar su utilidad como herramienta de control biológico.

Palabras clave:
Ralstonia solanacearum, biocontrol,
jitomate.

ABSTRACT

Tomato is one of the main exported products of Mexico. The crops of this vegetable are being affected by the bacterial phytopathogen *Ralstonia solanacearum*, which has caused important economic losses and has discouraged the investment in this crop, which presents a continuously growing market, especially in the United States. Thus, this phytopathogen contributes to the reduction of productivity and competitiveness of the Mexican countryside. Bacteriophages are the most abundant biological entities on the planet and naturally regulate infection-causing bacterial populations. These agents represent an innovative and sustainable alternative for the control of bacterial pathogens. In this paper we report the isolation of potentially lithic bacteriophages useful for the control of *Ralstonia solanacearum*. Bacteriophages are stably amplified, consistently generate lytic plates and do not present genes related to lysogeny. The knowledge of the *Ralstonia*-tomato infection system will permit to determine the bacteriophages usefulness as a biological control tool.

Keywords:

Ralstonia solanacearum, biocontrol, tomato.

I N T R O D U C C I Ó N

México es el exportador número uno de jitomate fresco a nivel mundial. El mercado de esta hortaliza se encuentra en expansión, siendo los Estados Unidos de América los principales demandantes del producto, situación que ubica a México en una situación privilegiada con respecto a otros países productores de la hortaliza (SAGARPA, 2010; USDA, 2009). Sin embargo, los agricultores están abandonando el cultivo de esta hortaliza debido a las pérdidas provocadas por el fitopatógeno *R. solanacearum*, agente causal de marchitez bacteriana. Esta enfermedad representa una de las principales amenazas para los cultivos de jitomate. Las medidas de control actuales se basan en la aplicación de agroquímicos que dañan la flora microbiana del suelo, contaminan mantos freáticos y pueden ser tóxicos para la planta y para los humanos. Esta situación resalta la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el control de la marchitez bacteriana, alineadas con el desarrollo sustentable. En los últimos años, el uso de bacteriófagos como herramienta para el control de patógenos bacterianos, no sólo en el ámbito agrícola, sino también en el veterinario y humano, ha ganado relevancia debido al incremento en la resistencia bacteriana a los antibióticos (Parisien *et al.*, 2008; Coffey *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2007; Frampton *et al.*, 2012). Su elevada especificidad, capacidad de evolución, autoamplificación y autorregulación, los señalan como buenos candidatos para el control biológico, sin embargo, su uso implica conocer sus características biológicas para reducir

el riesgo de transformación lisogénica, así como las características de la infección patógeno hospedero (Meaden y Koskella, 2013; Fortier y Sekulovic, 2013). En este trabajo se describe el aislamiento y caracterización parcial de dos bacteriófagos líticos para *R. solanacearum*, así como los avances logrados en el conocimiento del sistema de infección *Ralstonia*-jitomate.

M E T O D O L O G Í A

Los bacteriófagos fueron aislados a partir de muestras ambientales de la zona sur del estado de Morelos, utilizando el método de doble capa de agar y como bacteria hospedera un cultivo puro de *R. solanacearum*. La secuenciación genómica de uno de los fagos se realizó utilizando la plataforma 454 de Roche. La amplificación del fago secuenciado se realizó en matraces de 2 litros conteniendo 500 mL de cultivo. La morfología de los fagos se determinó utilizando microscopía electrónica de transmisión. El sistema de infección *Ralstonia*-jitomate se implementó en un invernadero aislado, con tratamiento de lixiviados, exponiendo plantas de jitomate a diferentes dosis bacterianas bajo dos condiciones ambientales distintas, registrándose el porcentaje de marchitez diariamente.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I Ó N

Las imágenes de microscopía electrónica mostraron morfologías compatibles con las familias *Podoviridae* y *Mioviridae* (Figura 1).

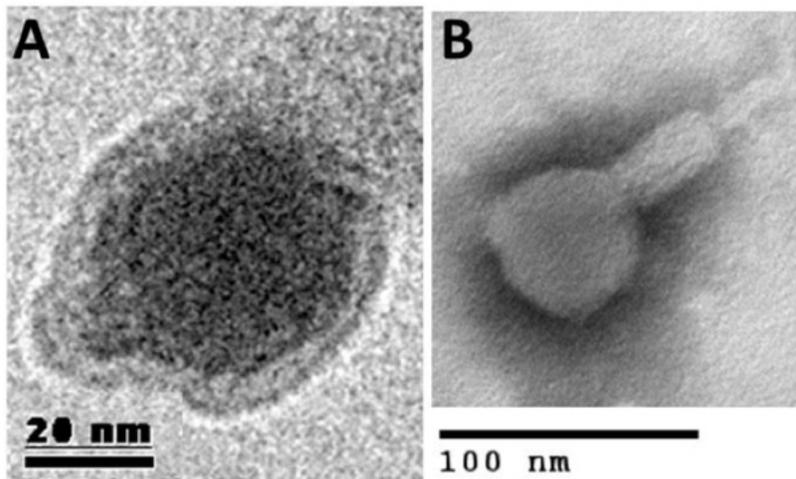


FIGURA 1.

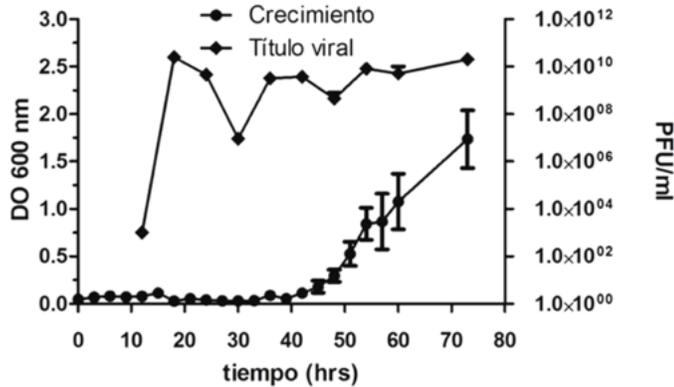
Morfología de los bacteriófagos aislados, líticos para *R. solanacearum*, compatible con *Podovirus* (A) y *Miovirus* (B).

Ambos fagos amplifican de manera consistente, generando a las 48 horas placas de lisis de aproximadamente 1 cm de diámetro. El análisis genómico del Podovirus encontrado, mostró homología con el fago T7, no se encontraron genes de integrasa, ni genes homólogos a toxinas conocidas, el gen de la integrasa se asocia con fagos lisogénicos (Groth y Calos, 2004). Este hallazgo es compatible con las características de amplificación que se han observado en el laboratorio, las cuales indican que el Podovirus no se comporta como virus lisogénico y sí como virus lítico estricto. El modelo de infección *Ralstonia*-jitomate, muestra un comportamiento estacional, de forma que, en este trabajo no fue posible obtener plantas infectadas durante los meses de diciembre y enero, aun utilizando dosis bacterianas que se sabía que inducían marchitez en la temporada cálida (julio-agosto). Durante los meses cálidos, la inducción de marchitez fue evidente a los 10 días post-exposición, utilizando una dosis bacteriana de 1×10^8 ufc por planta (Figura 2), resultados compatibles con los reportado por Singh y cols. (2013). Para evaluar el efecto protector de los fagos frente a la inducción de marchitez bacteriana, los fagos fueron inicialmente amplificados. La amplificación viral generó títulos virales de aproximadamente 1×10^9 pfu mL^{-1} , los cuales aparecieron desde las 11 horas después de la inoculación viral (Figura 3).



FIGURA 2.

Inducción experimental de marchitez bacteriana en plantas de jitomate. Se observan a los lados plantas control.

**FIGURA 3.**

Cinética de producción viral en matraz Erlenmeyer de 500 mL, con 200 mL de medio de cultivo. El título fágico máximo se obtiene a las 11 horas después de la inoculación viral.

La purificación de los fagos para evaluar efecto protector y otras características como estabilidad en diferentes soluciones, pH y temperaturas, resultó infructuosa debido a que la solución fágica no se pudo filtrar, aun cuando previamente se centrifugó a 10000 g por 15 minutos. El sobrenadante se colocó en un sistema de filtración que tenía un tamaño de poro de 0.4 μm , sin embargo, de los 500 mL sólo se lograron filtrar cerca de 25 mL, antes de que la membrana se tapara. Este bloqueo de la filtración posiblemente se deba a la producción de exopolisacáridos por parte de la bacteria, los cuales quedan en el sobrenadante y no se eliminan durante la filtración. Se está buscando su eliminación por métodos enzimáticos, o la reducción de su producción modificando la composición del medio de cultivo. Este paso de purificación fágica es crítico para la evaluación del efecto protector de los fagos, puesto que se debe garantizar que el producto a aplicar esté libre del fitopatógeno, para determinar que la sola aplicación del producto no tiene efectos nocivos en el cultivo de la hortaliza.

CONCLUSIONES

A partir de zonas afectadas por marchitez bacteriana, es posible aislar bacteriófagos específicos para *Ralstonia solanacearum*. Para evaluar el efecto protector de los bacteriófagos aislados, es importante tomar en cuenta el comportamiento estacional del sistema de infección jitomate-Ralstonia, así como la purificación río abajo de los fagos después de que se ha amplificado, ya que se debe garantizar que los fagos aplicados estén libres del fitopatógeno.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo de CONACyT-FOMIX Morelos, a través del proyecto MOR-2010-C01-148777.

R E F E R E N C I A S

- COFFEY B., Mills, S., Coffey, A., McAuliffe, O., & Ross, R. P. (2010). Phage and their lysins as biocontrol agents for food safety applications. *Annual Review of Food Science and Technology* 1: 449-468.
- FORTIER L., Sekulovic O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* 4: 354-365.
- FRAMPTON R. A., Pitman, A. R., & Fineran, P. C. (2012). Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *International Journal of Microbiology*. doi: 10.1155/2012/326452.
- GROTH A. C., Calos M. P. (2004). Phage integrases: Biology and applications. *J. Mol. Biol.* 335: 667-678.
- JONES J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2007). Bacteriophages for plant disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 245-262.
- MEADEN S., Koskella B. (2013). Exploring the risks of phage application in the environment. *Frontiers in Microbiology*, doi:10.3389/fmicb.2013.00358.
- PARISIEN A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., & Lan, C. Q. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology* 104(1): 1-13.
- SAGARPA, 2010. Indicadores básicos del sector alimentario y pesquero 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- SINGH D., Yadav D. K., Sinha S., Choudhary G. (2013). Effect of temperature, cultivars, injury of root and inoculum load of *Ralstonia solanacearum* to cause bacterial wilt of tomato. *Arch. Phytopathol. Plant Protection* 47: 1574-1583.
- USDA, 2009. World markets and trade: fresh tomatoes. United States Department of Agriculture. Foreign Agriculture Service.