

**CARACTERIZACIÓN GENÓMICA,
MORFOLÓGICA Y REPLICATIVA DEL
BACTERIÓFAGO Φ XaF18 DE *Xanthomonas*
*vesicatoria***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA

PRESENTA

Lic. Biol. MARCELA RÍOS-SANDOVAL

DIRECTORA DE TESIS

DRA. EVANGELINA ESMERALDA QUIÑONES AGUILAR

CODIRECTORES

DR. GABRIEL RINCÓN ENRÍQUEZ

DR. GUILLERMO ALEJANDRO SOLÍS SÁNCHEZ

Zapopan, Jalisco, Diciembre de 2019



El presente documento de tesis de maestría formó parte del proyecto:

“Nanobiocontrol inteligente de bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas*) de solanáceas de importancia agrícola en México”

Financiado por el Fondo Atención a Problemas Nacionales (APN) del CONACyT
(Convocatoria 2015). Clave CONACyT 2015-01-338

Líder del proyecto: Dr. Gabriel Rincón Enríquez

La investigación de esta tesis de maestría se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ) bajo la dirección de la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar y codirección del Dr. Gabriel Rincón Enríquez y el Dr. Guillermo Alejandro Solís Sánchez.



Guadalajara, Jalisco a 17 de noviembre del 2019

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Marcela Rios Sandoval** una vez leída y revisada la Tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN GENÓMICA, MORFOLÓGICA Y REPLICATIVA DEL BACTERIÓFAGO Φ XAF18 DE *Xanthomonas vesicatoria***" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Biotecnología Agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 17 del mes de noviembre del año dos mil diecinueve.

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar
Directora de tesis

Dr. Guillermo Alejandro Solís Sánchez
Co-director de tesis

Dr. Gabriel Rincón Enríquez
Co-director de tesis

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca de maestría otorgada para la realización del presente proyecto.

Al **Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ), A. C.** donde fue realizada la presente investigación.

Al proyecto “**Nanobiocontrol inteligente de bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas*) de solanáceas de importancia agrícola en México**”, del cual forma parte la presente investigación.

A mi directora de tesis la **Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar**, así como a mis codirectores, el **Dr. Gabriel Rincón Enríquez** y el **Dr. Guillermo Alejandro Solís Sánchez**. Por su asesoría y apoyo durante la realización de este proyecto, por compartirme sus conocimientos y su experiencia y, por resolver siempre mis dudas con paciencia.

Dedicada a mi madre:

Elba Patricia Sandoval Orozco

*Quien me ha brindado su amor y apoyo incondicional en todo momento,
alentándome a ser mejor cada día.*

De los resultados de esta tesis de maestría se han publicado y presentado en foros académicos los siguientes trabajos:

Tabajos presentados en foros académicos:

Ríos-Sandoval M., G. Rincón-Enríquez, G. A. Solís-Sánchez, S. Fraire-Velázquez y E. E. Quiñones-Aguilar. 2018. Caracterización molecular del bacteriófago Φ Xaf18 asociado a la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*. XXXI Reunión Científica - Tecnológica, Forestal y Agropecuaria. Veracruz 2018. Boca del Rio, Veracruz, 24-26 octubre de 2018. Presentación en Cartel.

Ríos-Sandoval M., G. Rincón-Enríquez, A. Solís-Sánchez, E. Quiñones-Aguilar. 2019. Interacción del bacteriófago Φ XaF-18 con la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria* en condiciones *in vitro*. XXI Congreso Internacional y XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Morelia, Mich., 24 al 28 de agosto. Presentación Cartel.

Ríos-Sandoval M., G. Rincón-Enríquez, A. Solís-Sánchez, E. Quiñones-Aguilar. 2019. Genoma del bacteriófago Φ XaF-18 asociado a la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*. XXI Congreso Internacional y XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Morelia, Mich., 24 al 28 de agosto. Presentación Oral.

Publicaciones sometidas o publicadas en revistas científicas:

Ríos-Sandoval M., G. Rincón-Enríquez, G. A. Solís-Sánchez, S. Fraire-Velázquez, E. E. Quiñones-Aguilar. 2018. Caracterización molecular del bacteriófago Φ Xaf18 asociado a la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*. In: Vinay, V. J. C., V. A. Esqueda E., O. H. Tosquy V., R. Zetina L., A. Ríos U., M. V. Vázquez H., A. L. Del Angel P. y C. Perdomo M. (comps.). 2018. Avances en Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola, Pesquería, Desarrollo rural, Transferencia de tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos naturales y Cambio climático. INIFAP, CP, UACH, INAPESCA, UV, TecNM. Medellín, Ver., México. Año 2, Núm. 1. pp: 1601-1609. (<http://rcveracruz.org/doc/AvancesInvestigacionRC2018.pdf>)

- Ríos-Sandoval M., G. Rincón-Enríquez, A. Solís-Sánchez, E. Quiñones-Aguilar.** 2019. Genoma del bacteriófago Φ XaF-18 asociado a la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*. Revista Mexicana de Fitopatología 37: S43-44.
- Ríos-Sandoval M., G. Rincón-Enríquez, A. Solís-Sánchez, E. Quiñones-Aguilar.** 2019. Interacción del bacteriófago Φ XaF-18 con la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria* en condiciones *in vitro*. Revista Mexicana de Fitopatología 37: S148-149.
- Ríos-Sandoval M., E. E. Quiñones-Aguilar, G. A. Solís-Sánchez, G. Rincón-Enríquez.** Complete genome sequence of *Xanthomonas vesicatoria* bacteriophage Φ XaF18 for the biocontrol of bacterial spot of pepper in Mexico. Submitted to *Microbiology Resource Announcements* (diciembre 2019).

Distinciones recibidas de los resultados de esta tesis de maestría:

- Ríos-Sandoval M., G. Rincón-Enríquez, G. A. Solís-Sánchez, S. Fraire-Velázquez, E. E. Quiñones-Aguilar.** Constancia por la ponencia de cartel con el tema: Caracterización molecular del bacteriófago Φ Xaf18 asociado a la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*. En la XXXI Reunión Científica - Tecnológica, Forestal y Agropecuaria. Veracruz 2018. Boca del Rio, Veracruz, 24-26 octubre de 2018.
- Ríos-Sandoval M., G. Rincón-Enríquez, A. Solís-Sánchez, E. Quiñones-Aguilar.** Constancia por el segundo lugar en la modalidad de cartel nivel Estudiante con la presentación: Interacción del bacteriófago Φ Xaf18 con la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria* en condiciones *in vitro*. En el XXI Congreso Internacional y XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Morelia, Michoacán, 2019. 24-28 agosto de 2019.
- Ríos-Sandoval M., G. Rincón-Enríquez, A. Solís-Sánchez, E. Quiñones-Aguilar.** Reconocimiento por la presentación oral nivel Estudiante con el tema: Genoma del bacteriófago Φ Xaf18 asociado a la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*. En el XXI Congreso Internacional y XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Morelia, Michoacán, 2019. 24-28 agosto de 2019.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	8
2.1. Agente causal de la mancha bacteriana en tomate y chile: <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	8
2.1.1. Tratamiento tradicional de la mancha bacteriana.....	9
2.1.2. Tratamiento de la mancha bacteriana con bacteriófagos.....	9
2.2. Diversidad y abundancia de los bacteriófagos.....	11
2.3. Clasificación de los bacteriófagos.....	12
2.4. Morfología de los bacteriófagos.....	13
2.5. Secuenciación de los genomas de bacteriófagos.....	15
2.6. Organización genómica de los bacteriófagos.....	17
2.7. Interacción bacteria-bacteriófago.....	18
2.8. Genómica comparativa.....	20
2.9. Metagenómica.....	20
2.10. Empaquetamiento del ADN.....	21
2.11. Mecanismos genéticos-moleculares para decidir el ciclo lisis-lisogénia....	22
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	27
5.1. Objetivo general.....	27
5.2. Objetivos específicos.....	27
6. METODOLOGIA	28
6.1. Bacteriófago/bacteria huésped.....	28
6.1.1. Purificación y multiplicación del bacteriófago Φ XaF18.....	28
6.1.2. Concentración del título del bacteriófago mediante la técnica con Polietilenglicol/NaCl.....	29

6.2.	Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) adecuada para la fase exponencial del fago Φ XaF18.....	29
6.2.1.	Conteo de placas de lisis mediante ensayo de doble placa en agar suave.....	30
6.3.	Caracterización morfológica del bacteriófago Φ XaF18.....	30
6.3.1.	Purificación mediante gradiente de cloruro de cesio (CsCl).....	30
6.3.2.	Tinción y visualización en microscopio electrónico de transmisión (MET) de los bacteriófagos.....	31
6.4.	Caracterización genómica del bacteriófago Φ XaF18.....	31
6.4.1.	Extracción de ADN del bacteriófago.....	31
6.4.2.	Digestión del ADN para determinar su naturaleza.....	32
6.4.3.	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) del ADN del bacteriófago.....	32
6.4.4.	Secuenciación y ensamblado del genoma viral.....	33
6.4.5.	Ensayos de PCR.....	33
6.4.5.1.	Diseño de oligonucleótidos para el bacteriófago.....	33
6.4.5.2.	Reacciones de PCR.....	34
6.4.6.	Análisis bioinformático.....	35
6.4.6.1.	Determinación de genes putativos.....	35
6.4.6.2.	Predicción de secuencias funcionales.....	36
6.4.6.3.	Determinación de la estrategia de empaquetamiento.....	36
6.4.6.4.	Análisis filogenético.....	36
6.4.6.5.	Análisis comparativo.....	37
6.5.	Análisis genético-fenotípico del mecanismo de regulación lisis-lisogénia.....	37
6.5.1.	Búsqueda de genes implicados en el mecanismo de regulación lisis-lisogénia en el genoma del bacteriófago Φ XaF18.....	37
6.5.2.	Búsqueda del péptido <i>arbitrium</i> en el genoma del bacteriófago Φ XaF18.....	37
6.5.3.	Búsqueda del mecanismo lisis-lisogénia <i>in vivo</i> mediante medio condicionado.....	38

6.5.3.1.	Curva de crecimiento para evaluar medio condicionado.....	38
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
7.1.	Purificación y multiplicación del bacteriófago Φ XaF18.....	40
7.1.1.	Precipitación de bacteriófagos con Polietilenglicol/NaCl.....	41
7.2.	Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) adecuada para la fase exponencial del fago Φ XaF18.....	41
7.3.	Caracterización morfológica.....	42
7.4.	Caracterización genómica.....	43
7.4.1.	Determinación de la naturaleza del material genético.....	43
7.4.2.	Caracterización del ADN del bacteriófago Φ XaF18 por RFLPs.....	45
7.4.3.	Secuenciación, ensamblado del genoma del bacteriófago.....	47
7.4.4.	Ensayos de PCR para confirmar ensamblado del genoma de Φ XaF18 y para diferenciar entre bacteria y bacteriófago.....	48
7.4.4.1.	Diseño de oligonucleótidos.....	48
7.4.4.2.	PCR de la bacteria <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	49
7.4.4.3.	PCR a partir del genoma del bacteriófago Φ XaF18.....	49
7.4.4.3.1.	PCR y RFLPs del fragmento M3F-TER1R.....	51
7.4.5.	Análisis bioinformático.....	54
7.4.5.1.	Marcos abiertos de lectura (ORF).....	54
7.4.5.2.	Módulos funcionales.....	60
7.4.5.2.1.	Módulos estructurales.....	61
7.4.5.2.1.1.	Módulo estructural de cápside.....	61
7.4.5.2.1.2.	Módulo estructural de cola.....	62
7.4.5.2.2.	Módulos de replicación/metabolismo.....	63
7.4.5.2.2.1.	Módulo de replicación.....	63
7.4.5.2.2.2.	Módulo de metabolismo.....	65
7.4.5.3.	Predicción de secuencias funcionales.....	66
7.4.5.4.	Empaquetamiento del genoma viral y tipo de extremos.....	66
7.4.5.5.	Análisis filogenético.....	67
7.4.5.6.	Análisis comparativo de genomas de bacteriófagos de <i>Xanthomonas</i>	71

7.5.	Análisis genético-fenotípico del mecanismo de regulación lisis-lisogénia.....	72
7.5.1.	Genes implicados en el mecanismo de regulación lisis-lisogénia en el genoma del bacteriófago Φ XaF18.....	72
7.5.2.	Péptido <i>arbitrium</i> en el genoma del bacteriófago Φ XaF18.....	72
7.5.3.	Determinación <i>in vivo</i> del mecanismo de decisión lisis-lisogénia del bacteriófago Φ XaF18.....	73
8.	CONCLUSIONES.....	76
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
	ANEXOS.....	89
	Anexo 1. Artículo enviado a revisión a la revista <i>Microbiology Resource Announcements</i>	89
	Anexo 2. Secuencia genómica completa.....	92
	Anexo 3. Constancias de participación en congresos.....	93
	Anexo 4. Medios de cultivo y buffers.....	96

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para el bacteriófago Φ XaF18.....	34
Cuadro 2. Curvas de crecimiento realizadas para evaluar el mecanismo lisis-lisogénia en el bacteriófago Φ XaF18.....	39
Cuadro 3. Concentración del bacteriófago Φ XaF18 posterior a la multiplicación a distintos valores MOI calculados mediante técnica de doble placa	41
Cuadro 4. Oligonucleótidos empleados para amplificar fragmentos a lo largo del genoma del bacteriófago Φ XaF18.....	48
Cuadro 5. Marcos abiertos de lectura (ORF) obtenidos en el genoma del bacteriófago Φ XaF18 mediante distintos programas de predicción de ORF <i>in silico</i> empleados.....	54
Cuadro 6. Características de los marcos abiertos de lectura (ORFs) predichos en el genoma del bacteriófago Φ XaF18.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo replicativo del bacteriófago lambda.....	6
Figura 2. Estructura general de los bacteriófagos de cola.....	14
Figura 3. Morfología de las tres familias de bacteriófagos pertenecientes al orden <i>Caudovirales</i>	15
Figura 4. Diagrama esquemático del mecanismo de la decisión lisis-lisogénia del bacteriófago phi3T asociado a la cepa 168 de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i>	24
Figura 5. Halo de inhibición formado por el bacteriófago Φ XaF18.....	40
Figura 6. Experimento de la titulación del bacteriófago Φ XaF18 después del proceso de multiplicación.....	41
Figura 7. Micrografías electrónicas del bacteriófago Φ XaF18.....	42
Figura 8. Componentes morfológicos del bacteriófago Φ XaF18.....	43
Figura 9. Digestión del material genético del bacteriófago Φ XaF18 para determinar su naturaleza.....	44
Figura 10. Perfiles de restricción del genoma del bacteriófago Φ XaF18 mediante la técnica RFLPs.....	45
Figura 11. Comparación de los perfiles de restricción <i>in vitro</i> con los perfiles de restricción <i>in silico</i> del genoma del bacteriófago Φ XaF18 sometido a la técnica de RFLPs.....	46
Figura 12. Comparación de los perfiles de restricción <i>in vitro</i> con los perfiles de restricción <i>in silico</i> del genoma del bacteriófago Φ XaF18 con la enzima <i>BclI</i>	47
Figura 13. Amplificación del gen <i>estA</i> de la cepa BV824 de <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	49
Figura 14. Amplificación específica para el bacteriófago Φ XaF18 con siete pares de oligonucleótidos.....	50
Figura 15. Amplificación específica para el bacteriófago Φ XaF18 para el gen de la terminasa y el fragmento M4F-M1R.....	51
Figura 16. Amplificación y purificación para el bacteriófago Φ XaF18 con los oligonucleótidos M3F-TER1R.....	52
Figura 17. Comparación de los perfiles de restricción <i>in vitro</i> con los perfiles de	

restricción <i>in silico</i> de los fragmentos del genoma del bacteriófago ΦXaF18 obtenidos con los oligonucleótidos M3F-TER1R, con la enzima <i>BclI</i>	53
Figura 18. Mapa genómico del bacteriófago ΦXaF18.....	59
Figura 19. (Página anterior) Árbol filogenético realizado con secuencia de aminoácidos de la terminasa subunidad mayor del bacteriófago ΦXaF18 y de otras secuencias de terminasas de bacteriófagos del orden <i>Caudovirales</i>	68
Figura 20. (Página siguiente) Árbol filogenético realizado con secuencia de aminoácidos de la terminasa subunidad mayor del bacteriófago ΦXaF18 y de otras secuencias de terminasas de bacteriófagos de la familia <i>Myoviridae</i>	70
Figura 21. Análisis comparativo del genoma completo del bacteriófago ΦXaF18 con el genoma del bacteriófago KPhi1.....	71
Figura 22. Aminoácidos presentes en los distintos péptidos homólogos al péptido <i>arbitrium</i>	73
Figura 23. Dinámica de crecimiento de la cepa bacteriana BV824 de <i>X. vesicatoria</i> en presencia de medio condicionado en comparación con medio control.....	74
Figura 24. Dinámica de crecimiento de la cepa bacteriana BV824 de <i>X. vesicatoria</i> en presencia de medio condicionado.....	75

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA, MORFOLÓGICA Y REPLICATIVA DEL BACTERIÓFAGO Φ XaF18 DE *Xanthomonas vesicatoria*

Marcela Ríos-Sandoval

RESUMEN

Los bacteriófagos, son virus que infectan a las bacterias. Pertenecen al orden *Caudovirales*, el cual se compone de tres familias de fagos; *Myoviridae* que tienen colas contráctiles rígidas, *Podoviridae* con colas cortas, no contráctiles y *Siphoviridae* con colas largas y flexibles. Pueden presentar dos fases en su ciclo replicativo, el lítico y el lisogénico. El bacteriófago Φ XaF18 infecta a la bacteria *Xanthomonas vesicatoria*, agente causal de la mancha bacteriana en plantas solanáceas como el tomate y el chile. A medida que se descubre una mayor diversidad genética de los fagos, el conjunto de sus genes representa un recurso potencial para el desarrollo de herramientas genéticas, biotecnológicas y clínicas, y se ha descrito una gran variedad de utilidades y enfoques. Al emplear a los bacteriófagos como agentes de control biológico es deseable que estos sean líticos y no entren en lisogenia, por ello el objetivo del presente trabajo fue secuenciar y anotar el genoma del bacteriófago Φ XaF18, así como determinar la presencia o ausencia de información genética relacionada con algún mecanismo molecular de regulación de su ciclo lítico-lisogénico en el bacteriófago Φ XaF18, similar a la secuencia codificante para el péptido *arbitrium*. El bacteriófago fue caracterizado morfológicamente mediante microscopía electrónica de transmisión y caracterizado genéticamente mediante RFLPs con las enzimas *BamHI*, *BclI*, *BspHI* y *EcoRI*, PCRs específicas para el bacteriófago con ocho juegos de oligonucleótidos, uno de los cuales corresponde a la secuencia codificante de la proteína terminasa subunidad mayor y análisis bioinformático de la secuencia genómica. Además, se realizó búsqueda de genes implicados en el mecanismo de regulación lisis-lisogénia y búsqueda del péptido *arbitrium* en el genoma del bacteriófago y bajo condiciones *in vivo* mediante experimentos empleando medio condicionado (medio contenido previamente bacteriófago) y este se evaluó mediante curva de crecimiento bacteriano en presencia o ausencia del bacteriófago Φ XaF18. El bacteriófago Φ XaF18 midió 62.5 nm de vértice a vértice de la cápside, 57 nm de lado a lado de la cápside, 85.7 nm de longitud de la cola y el total del largo del bacteriófago fue de 157.5 nm, estas características morfológicas aunadas al análisis filogénico

del gen de la terminasa subunidad mayor mostaron que Φ XaF18 pertenece a orden *Caudovirales* y la familia *Myoviridae*. En todas las enzimas empleadas en la restricción *in vivo* se observaron patrones de bandeado claros y coincidieron con las restricciones *in silico*, todas las PCR realizadas amplificaron los fragmentos esperados; los RFLPs y las PCR mostraron de esta manera un correcto ensamblaje del genoma. El genoma del bacteriófago Φ XaF18 fue de cadena doble de ADN de 47407 pares de bases, con 67 marcos abiertos de lectura, de estos, a 17 se les fue asignada una función, con un contenido de G+C de 63%. La búsqueda del mecanismo de regulación lisis-lisogénia indicó la inexistencia de dicho mecanismo en el genoma del bacteriófago Φ XaF18, sin embargo, el estudio del genoma del fago Φ XaF18 puede ser de utilidad para diseñar distintas estrategias biotecnológicas para el control de enfermedades.

Palabras clave: análisis bioinformático, RFLPs, biocontrol, bacteriófagos, bacterias fitopatógenas

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar	equinones@ciatej.mx
Dr. Gabriel Rincón Enríquez	grincon@ciatej.mx
Dr. Alejandro Solís Sánchez	gsolis_al@ciatej.edu.mx
Biol. Marcela Ríos-Sandoval	marcela._1000@hotmail.com

**GENOMIC, MORPHOLOGICAL AND REPLICATIVE CHARACTERIZATION OF
Xanthomonas vesicatoria BACTERIOPHAGE Φ XaF18**

Marcela Ríos-Sandoval

ABSTRACT

Bacteriophages are viruses that infect bacteria. They belong to the order *Caudovirales*, which is composed of three families of phages; *Myoviridae* that have rigid contractile tails, *Podoviridae* with short, non-contractile tails and *Siphoviridae* with long and flexible tails. They can present two phases in their replicative cycle, the lytic and the lysogenic. The bacteriophage Φ XaF18 infects the bacterium *Xanthomonas vesicatoria*, the causative agent of bacterial spot in solanaceous plants like tomato and pepper. As a greater genetic diversity of the phages is discovered, all their genes represent a potential resource for the development of genetic, biotechnological and clinical tools, and a wide variety of utilities and approaches have been described. When using bacteriophages as biological control agents, it is desirable that these be lytic and no lysogenic, so the aim of the present work was sequence and annotate the genome of the bacteriophage Φ XaF18, as well as determine the presence or absence of genetic information that ensures some molecular mechanism of regulation of its lytic-lysogenic cycle in the bacteriophage Φ XaF18, similar to the coding sequence for the *arbitrium* peptide. The bacteriophage was morphologically identified by transmission electron microscopy and genetically characterized by RFLPs with the enzymes *Bam*HI, *Bcl*I, *Bsp*HI and *Eco*RI, PCRs specific for the bacteriophage with eight sets of oligonucleotides, one of which corresponds to the coding sequence of the terminase large subunit protein, and bioinformatic analysis of the genomic sequence. In addition, the search for genes involved in the mechanism of lysis-lysogeny regulation and the search for the *arbitrium* peptide in the bacteriophage genome and under conditions in vivo were performed by experiments using conditioned medium (previously contained bacteriophage medium) and this was evaluated through of a curve of bacterial growth in the presence or absence of the bacteriophage Φ XaF18. The bacteriophage Φ XaF18 measured 62.5 nm from vertex to vertex of the capsid, 57 nm from side to side of the capsid, 85.7 nm in length of the tail, and the total length of the bacteriophage was 157.5 nm, these morphological characteristics combined with the phylogenic analysis of the major subunit terminase gene they

showed that ΦXaF18 belongs to *Caudovirales* order and the *Myoviridae* family. In all the enzymes used in the restriction *in vivo*, clear banding patterns were observed and coincided with the *in silico* restrictions, all the PCR performed amplified the expected fragments; the RFLP and the PCR showed in this way a correct genome assembly. The genome of the bacteriophage ΦXaF18 was double stranded DNA of 47407 base pairs, with 67 open reading frames, of these, 17 were assigned a function, with a G + C content of 63%. The search for the mechanism of lysis-lysogeny regulation indicated the absence of this mechanism in the genome of the bacteriophage ΦXaF18, however, the study of the phage genome ΦXaF18 may be useful to design different biotechnological strategies for disease control.

Keywords: bioinformatic analysis, RFLPs, biocontrol, bacteriophages, phytopathogenic bacteria

1. INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos, también llamados fagos, son virus que infectan únicamente a las bacterias. El primer reporte de la existencia de los bacteriófagos data de 1896 por Ernest Hanbury Hankin, quien informó que algo en el agua de los ríos Ganges y Yamuna en India había tenido una acción antibacteriana contra la bacteria que ocasionaba el cólera (Hankin, 1896). Posteriormente, en 1915 el bacteriólogo británico Frederick Twort describió la presencia de un agente que infectaba y mataba bacterias, sin embargo, aunque el consideró que podía tratarse de un virus que creció y destruyó a las bacterias, no descartó la posibilidad de que solo se tratara de una etapa en el ciclo de vida de la bacteria o una enzima producida por la propia bacteria (Twort, 1915). Dos años más tarde y de manera independiente, el microbiólogo francocanadiense Félix Hubert d'Hérelle del Instituto Pasteur de París anunció que había descubierto un microbio invisible antagonico del bacilo de la disentería, el cual mencionó como un microbio invisible, posiblemente un virus parásito de las bacterias; además, sugirió que este fenómeno no era específico de la disentería. D'Hérelle fue quien acuñó el término “bacteriófago”, comedor de bacterias (del griego phagein = comer), realizó diversas investigaciones sobre bacteriófagos e introdujo el concepto de terapia de fagos o fagoterapia (D'Hérelle, 1917). Pronto los bacteriófagos fueron utilizados como agentes antimicrobianos para tratar y prevenir infecciones bacterianas en humanos, además de controlar enfermedades en plantas, detectar patógenos y evaluar la seguridad alimentaria (Pires *et al.*, 2016).

Los bacteriófagos, pueden estar presentes en cualquier ambiente donde se localice su hospedero bacteriano, desde suelos áridos y ambientes marinos, hasta aguas termales y alimentos (Jończyk *et al.*, 2011; Wichels *et al.*, 1998; Yoon, 2002; Schoenfeld *et al.*, 2008; Abo-Senna, 2017). Estos constituyen el grupo más amplio de virus en la naturaleza, la mayoría presentan una proyección proteica o cola, característica del orden de los *Caudovirales*, los cuales a su vez representan el grupo más estudiado y con mayor número de bacteriófagos descritos hasta el momento (Hendrix, 2002; Ackermann, 2003; Casjens, 2005).

Pueden presentar dos fases en su ciclo replicativo, el lítico y el lisogénico. En el ciclo lítico los fagos replican su ADN y producen nuevos fagos que son liberados al ambiente; en el ciclo

lisogénico, los genes líticos no se expresan, el ADN viral es integrado en el huésped y se replica junto con el ADN bacteriano, esto otorga al virus un mecanismo alternativo para hacer más copias de su genoma, para los distintos fagos el cambio de un ciclo a otro puede ocurrir mediante diferentes mecanismos (Little, 2005), en la Figura 1 se muestra el ejemplo del ciclo de vida del fago lambda.

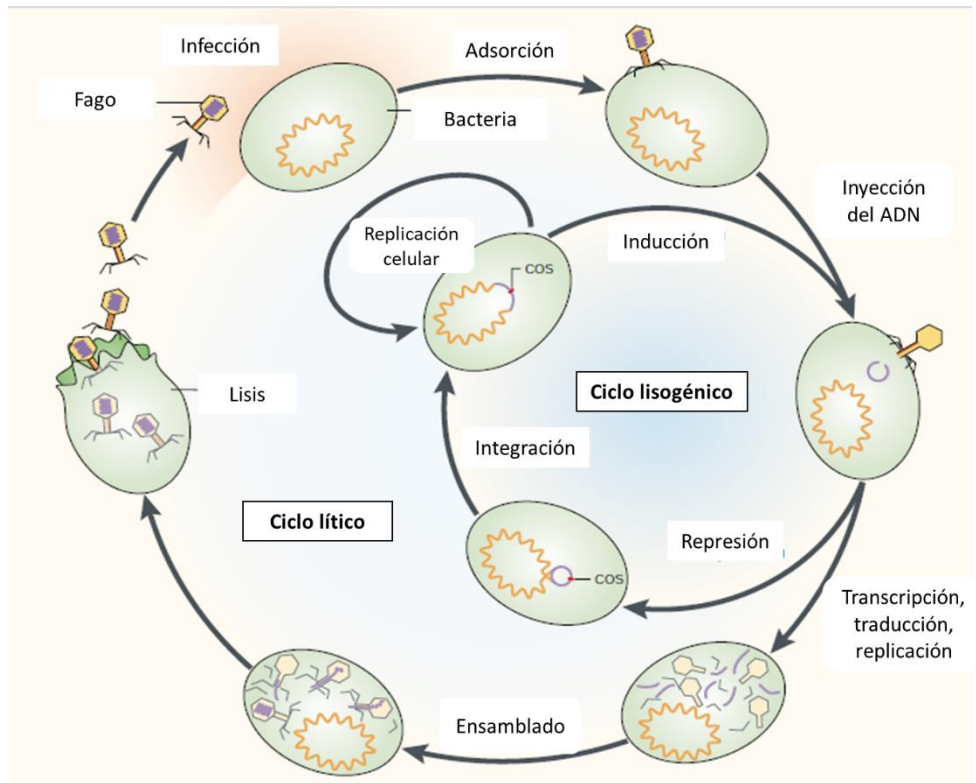


Figura 1. Ciclo replicativo del bacteriófago lambda. El fago infecta a una célula bacteriana, inyectando su ADN, en caso de entrar en estado lisogénico puede pasar al estado lítico mediante inducción (imagen modificada de Campbell, 2003).

El ciclo de vida de un fago lítico se puede dividir en tres etapas generales: adsorción, maduración (producción de la progenie dentro de la célula) y lisis (Shao y Wang, 2008). Mientras que el ciclo de vida lisogénico consta de: adsorción, integración del genoma viral en el genoma bacteriano y replicación del genoma viral junto con el genoma bacteriano.

La abundancia e importancia ecológica de los fagos en la mayoría de los ambientes, acompañada con el conocimiento limitado de su constitución genética, demanda establecer métodos

genómicos que puedan ser aplicados a escala e implementados para descifrar la estructura genética que lleva a la biología del fago. A la fecha, obtener la secuencia completa del genoma sigue siendo uno de los más eficientes caminos para adentrarse en la biología de un organismo, especialmente para un microorganismo cuya biología puede ser difícil de estudiar en su ambiente natural o en el laboratorio (Henn *et al.*, 2010). La facilidad y bajo costo de la secuenciación de fagos, aunado al conocimiento de modelos de fagos, puede dar a la genómica de fagos un papel principal en genética de poblaciones, en la evolución de genomas simples y en el modelado de secuencias de ADN (Brüssow y Hendrix, 2002).

Xanthomonas vesicatoria (sinónimos *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*) es el agente causal de la mancha bacteriana en tomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum annuum*). Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el mundo (EPPO) y se ve favorecida por las altas temperaturas (25 a 30°C) y alta humedad ambiental (Mirik y Aysan, 2009; Balogh *et al.*, 2003).

La identificación de nuevos agentes de control biológico de enfermedades de plantas es importante para una agricultura sustentable, para tener seguridad alimentaria, mejorar la salud humana y rehabilitar el ambiente (Sadunishvili *et al.*, 2015). El uso de bacteriófagos en la agricultura es una alternativa para controlar enfermedades bacterianas, estos han sido empleados exitosamente en control de enfermedades de plantas (Balogh *et al.*, 2003). El bacteriófago Φ XaF18 infecta a *X. vesicatoria* siendo una alternativa para el control biológico de la mancha bacteriana, este fue aislado a partir de suelo de cultivo de chile, cuyas plantas presentaban síntomas de mancha bacteriana, en Yurécuaro, Michoacán, México (López-Vielma, 2006).

2. ANTECEDENTES

2.1. Agente causal de la mancha bacteriana en tomate y chile: *Xanthomonas vesicatoria*

La mancha bacteriana fue reportada por primera vez en tomate en Sudáfrica y E U (Doidge, 1921; Gardner y Kendrick, 1921) y en plantas de chile (*Capsicum annum*) fue descrita por primera vez en Florida (Gardner & Kendrick 1923). Además de infectar a tomate (*Solanum lycopersicum*) y chile, *Xanthomonas vesicatoria* también infecta a *Datura* spp., *Hyoscyamus niger*, *Lycium barbarum*, *Nicotiana rustica*, *Physalis* spp. y *Solanum tuberosum*. Pertenece al Filum Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Xanthomonadales, Familia Xanthomonodaceae. *Xanthomonas vesicatoria* infecta las semillas y órganos aéreos (tallo, hojas flores y frutos) (Sadunishvili *et al.*, 2015).

X. vesicatoria puede sobrevivir en restos de plantas de tejido infectado y en semillas, donde puede mantener su patogenicidad hasta por dos años, se transmite por contacto desde las semillas infectadas a las sanas, la siembra de las semillas infectadas disminuye el número de plantas de tomate y el rendimiento en el área plantada, lo que resulta en un daño económico significativo, pudiendo causar más del 50% de pérdida en la producción de frutos. Se disemina por la lluvia impulsada por el viento y por algunas malas prácticas culturales. Esta bacteria fitopatógena entra a la planta a través de estomas y heridas ocasionadas por daño mecánico, así como por perforaciones hechas por insectos (Sadunishvili *et al.*, 2015; Balogh *et al.*, 2003).

En las hojas de tomate, las lesiones son irregulares y acuosas, volviéndose necróticas después, las lesiones están frecuentemente rodeadas de halos cloróticos. Las lesiones en los frutos de tomate son pequeñas y ligeramente elevadas. Posteriormente, las manchas aumentan de tamaño y se vuelven marrones y como costras con un halo acuoso. Las lesiones en las hojas de chile son de forma irregular y necróticas, en algunos casos rodeado por un halo clorótico. En los frutos de chile, aparecen lesiones blanquecinas elevadas en forma de costra (EPPO, 2013).

La enfermedad de la mancha bacteriana se encuentra distribuida en todo el mundo, existen reportes de su presencia en Tanzania, Turquía, Egipto, Grecia, Hungría, Israel, Italia, Rumania, Rusia, Australia, España, etc. (Shenge *et al.*, 2014; Mirik y Aysan, 2009; EPPO).

El género *Xanthomonas* se encuentra entre las bacterias patógenas de plantas más importantes, al lado de *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Xylella*, *Pectobacterium* y *Dickeya* (Mansfield *et al.*, 2012).

2.1.1. Tratamiento tradicional de la mancha bacteriana

A lo largo del tiempo, se han empleado estrategias de manejo para atacar el problema de la mancha bacteriana, como son el uso de semillas libres de patógeno, sanitización, rotación de cultivos, pero más que nada se ha implementado el uso de químicos como cobre y estreptomicina. Los antibióticos han sido empleados desde los años 1950s para tratar enfermedades en plantas. La aplicación de pesticidas contra patógenos de plantas, aunado al uso de fertilizantes ha contribuido significativamente a grandes mejoras en la productividad y calidad de los cultivos. Sin embargo, el uso excesivo de agroquímicos ha tenido consecuencias negativas generando el desarrollo de bacterias resistentes además de daños al ambiente. Por ello, es importante desarrollar métodos alternativos para controlar las enfermedades y las plagas (Sadunishvili *et al.*, 2015; Bouzar *et al.*, 1999; Obradovic *et al.*, 2004; McManus *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2007). Varios autores han reportado resistencia de cepas de *Xanthomonas* spp. a cobre y estreptomicina (Bouzar *et al.*, 1999; McManus *et al.*, 2002; Ritchie y Dittapongpitch, 1991; Carrillo-Fasio *et al.*, 2001; Marco y Stall, 1983).

2.1.2. Tratamiento de la mancha bacteriana con bacteriófagos

Previo al descubrimiento de los antibióticos ya había sido sugerido el uso de bacteriófagos para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Sin embargo, los primeros estudios con bacteriófagos fueron ampliamente criticados por la falta de controles apropiados y la inconsistencia de los resultados, así como la falta de reproducibilidad, lo cual puso en duda su eficacia, aunado a esto, el surgimiento de los antibióticos y su amplio espectro disminuyó la atención en la investigación con bacteriófagos; aunque no en todos los países, ya que, en la antigua URSS, Polonia y en menor medida en la India se continuó con las

investigaciones. No obstante, durante la última década, la resistencia bacteriana ha llevado a reconsiderar la fagoterapia (Wittebole *et al.*, 2014).

El primer reporte de fagos utilizados para controlar enfermedades de plantas data de 1924, cuando Mallmann y Hemstreet demostraron que un filtrado de col en descomposición podía inhibir a la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causante de la pudrición del col. Recientemente se han encontrado varios bacteriófagos con la capacidad de controlar bacterias fitopatógenas como *Erwinia* spp., *Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas* spp. y *Streptomyces scabies* (Nagy *et al.*, 2012). Existen reportes de bacteriófagos de *Xanthomonas vesicatoria*. Por ejemplo, en una investigación realizada por Tewfike y Desoky (2015) se reportó el aislamiento de bacteriófagos para *Xanthomonas vesicatoria*, a partir de hojas infectadas de plantas de pimiento, obteniéndose distintos fagos. Obradovic *et al.* (2004) reportaron que aplicaciones de bacteriófagos específicos al huésped bacteriano fueron efectivos contra la mancha bacteriana, mostrando una mayor eficiencia que el control sin tratamiento y que las plantas tratadas con cobre.

Sin embargo, el uso de bacteriófagos en campo tiene ciertas limitaciones, entre las que destacan temperatura, pH, desecación, lluvia e irradiación solar, lo que afecta su prevalencia en la filósfera. La irradiación solar es el factor que más afecta a los fagos, siendo la luz UV la causante de daños directos en el ADN. Se han empleado diversas estrategias para evadir los efectos de la luz UV, por ejemplo, la aplicación de los fagos al atardecer para evitar que reciban la luz solar o el uso de sustancias protectoras del fago, llamadas formulaciones (Born *et al.*, 2015; Balogh *et al.*, 2003; Iriarte *et al.*, 2007; Ibarra, 2019).

Por otro lado, el uso de bacteriófagos presenta grandes ventajas, por ejemplo, no representan ningún peligro al ambiente ni a los humanos, ya que se encuentran de forma natural en el ambiente y no son tóxicos para células eucariotas; su persistencia en el ambiente en grandes cantidades dura únicamente el tiempo que su huésped esté presente y; presentan un intervalo de hospederos limitados generalmente a nivel de cepa, lo cual permite la creación de mezclas de fagos que tengan como bacteria blanco una especie o un género dado, esta especificidad es importante ya que se pueden emplear sin dañar otras bacterias posiblemente benéficas; además,

es relativamente fácil preparar los tratamientos a base de bacteriófagos y el costo de producción es bajo, incluso se han desarrollado productos a base de bacteriófagos que ya están disponibles en el mercado (Buttimer *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2007), siendo en el año 2005 cuando se registró el primer producto a base de fagos para el control de bacterias fitopatógenas (AgriPhage™) (Nagy *et al.*, 2012).

Además del uso de los bacteriófagos, se pueden emplear proteínas codificadas por los fagos como endolisinas, exopolisacáridos y holinas para desarrollar productos antibacteriales (Wittebole *et al.*, 2014).

2.2. Diversidad y abundancia de los bacteriófagos

Los bacteriófagos son los entes biológicos más abundantes en el planeta (Pires *et al.*, 2016), principalmente en los sistemas acuáticos. Las primeras observaciones mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) indicaron la presencia de $\sim 10^7$ virus por mL en los océanos, aunque este número disminuye con la profundidad y de la distancia de la costa. Sin embargo, el uso de la MET no ha estado exento de problemas, incluidas diferencias significativas en los resultados entre las diferentes metodologías, las inconsistencias en cuanto a la reproducibilidad y los efectos de las diferentes técnicas almacenamiento de muestras. A pesar de ello, las estimaciones actuales van desde $\sim 3 \times 10^6$ virus mL⁻¹ en aguas profundas hasta $\sim 10^8$ virus mL⁻¹ en zonas costeras productivas. Para ambientes terrestres las densidades son $\sim 10^8$. Suponiendo que el volumen de los océanos es 1.3×10^{21} L y la abundancia promedio de virus es 3×10^9 L⁻¹, entonces las aguas oceánicas contienen $\sim 4 \times 10^{30}$ virus. Un virus marino contiene aproximadamente 0.2 fg de carbono y tiene aproximadamente 100 nm de longitud, esto se traduce en 200 Mt de carbono en virus marinos. Si los virus se colocaran en fila uno detrás de otro abarcaría ~ 10 millones de años luz. Así mismo, equivaldrían al carbono de ~ 75 millones ballenas azules ($\sim 10\%$ de carbono, por peso), esto es ~ 100 veces la distancia de nuestra propia galaxia. Por ello los virus representan la entidad biológica más abundante de los océanos del mundo y el segundo componente más grande de biomasa después de los procariotas (Suttle, 2005; Abedon *et al.*, 2009).

La diversidad de estos virus se ve reflejada en su diversidad de tamaños de genomas, los cuales van desde 4 hasta 600 kilo pares-bases (kb). El análisis de los datos genómicos de fagos otorga una clara visión de la gran diversidad genética de esta población y de las similitudes fundamentales. A medida que se descubre una mayor diversidad genética de los fagos, el conjunto de genes de fagos representa un recurso potencial para servir a los fines humanos (Brüssow y Hendrix, 2002). Estos descubrimientos se deben en parte, a una creciente conciencia del gran número de fagos existentes en todos los ambientes dominados por bacterias, así como la presencia de profagos en los genomas bacterianos (Clokier *et al.*, 2011). Los llamados fagos lambdoides de enterobacterias son en muchos aspectos el grupo mejor estudiado, los cuales tienen genomas de ADN de doble cadena de 40-50 kb (Hendrix, 2002). Cabe mencionar que actualmente la mayoría de los bacteriófagos no son detectados mediante los procedimientos usuales de microbiología, por lo cual los genomas de estos bacteriófagos no propagados representan una fuente inexplorada de diversidad genética (Serwer *et al.*, 2007), esto sugiere que el conocimiento actual acerca de la real diversidad de bacteriófagos es muy bajo y podría ser mucho mayor de lo que se piensa.

En general, las secuencias de genomas de fagos que no comparten huéspedes raramente comparten similitud de secuencia, aunque esto no es sorprendente en bacteriófagos cuyos huéspedes bacterianos están distantemente relacionados. Por ejemplo, no hay una similitud obvia de secuencias entre genomas publicados de fagos de *Streptomyces* y mycobacteriófagos, aunque tanto *Mycobacterium* como *Streptomyces* son miembros de *Actinomycetales*. Además, diferentes morfotipos de fagos tienen diferentes organizaciones de sus genomas y esto implica mayor diversidad de secuencias. La gran diversidad genética entre fagos de un huésped común aunado al limitado número de secuencias disponibles es un indicador de la abundancia de secuencias de genomas virales aun no identificados (Hatfull, 2008).

2.3. Clasificación de los bacteriófagos

No existe un método universal para la clasificación de virus, no existe un programa generalmente aceptado para clasificar a los bacteriófagos. Felix d'Herelle pensaba que los bacteriófagos se trataban de un único organismo, *Bacteriophagum intestinale*, con varias razas. Posteriormente, con la invención del microscopio electrónico fue propuesta la primera

clasificación formal de los bacteriófagos por Ernst Ruzka en 1943, distinguiendo diferentes tipos morfológicos entre ellos. En 1948, Holmes clasificó a los fagos como un suborden en el orden Virales, incluyendo un género y 46 especies, sin embargo, este sistema, basado en el espectro o rango de hospedero, nunca fue aceptado. En 1962, Lwoff, Horne y Tournier propusieron una clasificación por el tipo de ácido nucleico (ADN o ARN), forma de la cápside, presencia o ausencia de una envoltura, y número de capsómeros. Los fagos de cola recibieron el rango de orden y fueron nombrados *Urovirales*. En 1966 se fundó el comité de la clasificación de los virus, el cual se basó en clasificar a los virus por las propiedades del virión y su ácido nucleico en lugar de rango de hospedero y patogenicidad, este se convirtió en el ICTV (International Committee of Taxonomy of Viruses). La clasificación de los bacteriófagos está abierta ya que nuevos fagos son descubiertos a diario y el ICTV está muy atrasado en las actualizaciones de clasificación (Ackermann, 2009).

De acuerdo con su forma los bacteriófagos se dividen en fagos de cola, poliédricos, filamentosos y pleomórficos (Ackermann, 2003), de los cuales los más abundantes (cerca del 96%) son los *Caudovirales*, o fagos de cola (Hendrix, 2002). Aunque la mayoría de los autores manejan un orden (*Caudovirales*) y tres familias (*Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*), la presente clasificación en el ICTV incluye cinco familias (*Ackermannviridae*, *Herelleviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*) dentro del mismo orden (ICTV, 2019). La mayoría de los *Caudovirales* contienen ADN de doble cadena, pero hay pequeños grupos de fagos con ADN de cadena sencilla, ARN de cadena sencilla o ARN de cadena doble. Las familias se definen principalmente por la naturaleza del ácido nucleico y la morfología. Por otro lado, las pruebas de inactivación, patrones de restricción, y rango de hospedero son identificadores de especie y cepa (Ackermann, 2003; Abedon *et al.*, 2009).

2.4. Morfología de los bacteriófagos

Todos los fagos de cola presentan la misma estructura general, poseyendo una cápside, en cuyo interior se empaqueta el ADN, collar, cola, placa basal, fibras de la cola y vaina (Figura 2).

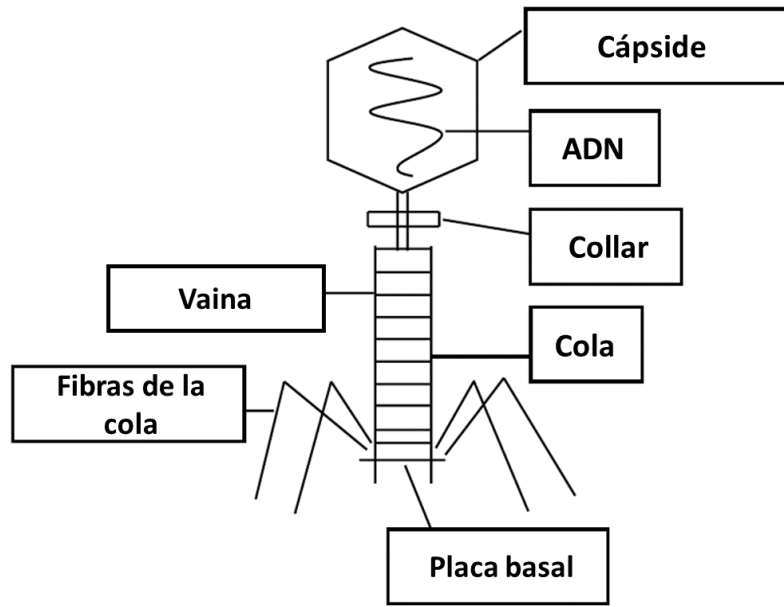


Figura 2. Estructura general de los bacteriófagos de cola (imagen modificada de Elbreki *et al.*, 2014).

La familia *Myoviridae* tiene colas contráctiles y rígidas, *Podoviridae* colas cortas no contráctiles y *Siphoviridae* colas largas y flexibles. Los fagos pertenecientes a otras familias tienen morfologías altamente variables con genomas de diferente composición de ácidos nucleicos (Buttimer *et al.*, 2017) (Figura 3).

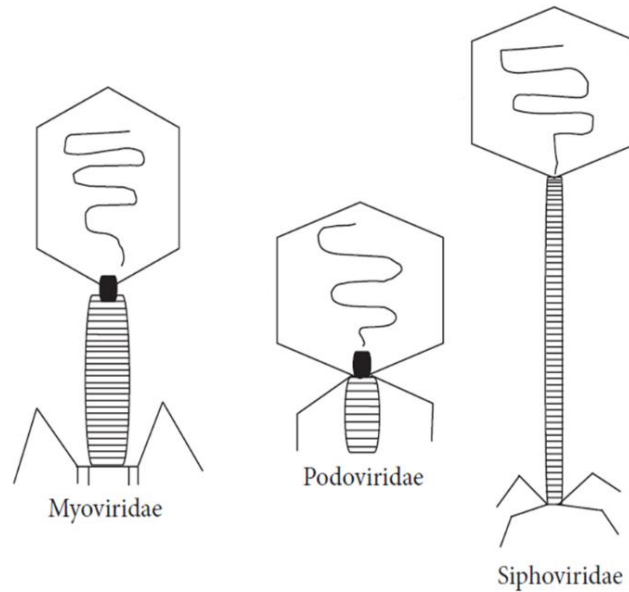


Figura 3. Morfología de las tres familias de bacteriófagos pertenecientes al orden *Caudovirales* (imagen modificada de Elbreki *et al.*, 2014).

La mayoría de los virus se encuentran usualmente en un rango de tamaño de cápside entre 30 y 60 nm, aunque existen excepciones de virus con cápsides mayores de 60 nm y menores de 30 nm. Sin embargo, han sido reportados virus gigantes con cápsides de 200 a >700 nm en aguas dulces y ambientes marinos (Weinbauer, 2004).

2.5. Secuenciación de los genomas de bacteriófagos

En la era genómica durante la década de los años 70's del siglo XX, los bacteriófagos tuvieron un papel importante. El primer genoma secuenciado de la historia fue el del bacteriófago MS2 en 1976 el cual posee un genoma de ARN. Posteriormente fue secuenciado el genoma de ADN del bacteriófago ϕ X174, el primero obtenido con un nuevo método de secuenciación rápida desarrollado por Walter Gilbert y Fred Sanger (Sanger *et al.*, 1977). En ambos casos los fagos poseen genomas pequeños con solo cuatro y diez genes, respectivamente (Koonin y Galperin, 2003). En 1982, el genoma del fago λ fue publicado (Sanger *et al.*, 1982), en 1983 se reportó la secuencia del genoma del fago T7 (Dunn y Studier, 1983) y diez años después la secuencia del genoma del mycobacteriófago L5 (Hatfull y Sarkis, 1993). A partir de entonces el número de secuencias de genomas de bacteriófagos ha ido en aumento (Hatfull, 2008). Para el año 2002

existían cerca de 100 genomas de fagos de cola secuenciados en las bases de datos (Hendrix, 2002).

En la actualidad el número alcanza más de 2500 genomas completos en las bases de datos de NCBI. Con la llegada de las tecnologías de secuenciación, es ahora posible analizar las secuencias y por lo tanto poder estudiar cual es la estructura de la población global de fagos, cuál es su dinámica y cómo evolucionan (Brüssow y Hendrix, 2002).

Por ejemplo, en el caso de la evolución, se necesita una mejor comprensión de la estructura genética en la población global antes de poder entender las relaciones evolutivas (Hendrix, 2002), siendo muy importante la caracterización de los genomas de fagos de cola, y hoy en día existen genomas bien caracterizados de bacteriófagos. Algunos de los estudios realizados han podido establecer relaciones entre fagos, como es el caso de un estudio realizado en el año 2000 por Rohwer *et al.*, quienes secuenciaron el genoma de un fago marino, y encontraron similitudes en las secuencias con los colifagos T3 y T7, indicando de esta manera, un vínculo entre fagos marinos y no marinos. Por otro lado, Hendrix (2002) secuenció al azar fagos provenientes de estanques de agua dulce, encontrando una relación de estas secuencias con secuencias ya conocidas, con cerca del 10% de coincidencias con secuencias de fagos que ya estaban en las bases de datos (Brüssow y Hendrix, 2002).

Como ya se mencionó los fagos de cola son las formas morfológicas predominantes. Algunos de estos tienen genomas menores de 10 kb, pero la mayoría son mayores de 15 kb; generalmente los Siphovirus tienen genomas más largos de 20 kb pero no tan largos como los Miovirus, con genomas >125 kb (Hatfull, 2008). Si se separan los bacteriófagos en fagos y profagos se tiene que para los primeros el tamaño promedio del genoma es de 39.5 kb y para los segundos el promedio es de 27.3 kb (Lima-Mendez *et al.*, 2011).

Los avances en la genómica de los bacteriófagos han sido alimentados con dos objetivos principales. En primer lugar, para conocer la abundancia y el cambio de la población de fagos, lo cual, plantea preguntas sobre cómo los genomas de los fagos se relacionan entre sí y con sus huéspedes y qué mecanismos evolutivos dieron forma a esta población. En segundo lugar, la

genómica ha avanzado en el uso de fagos para el desarrollo de herramientas genéticas, biotecnológicas y clínicas, y se ha descrito una gran variedad de utilidades y enfoques (Hatfull, 2008).

La secuenciación de genomas ha traído enormes posibilidades, pero también nuevos problemas. Los mayores problemas son la pobre identificación de bacteriófagos con las bases de datos de los genomas, así como dificultades relacionadas con la identificación de genes, esto debido a que las bases de datos contienen genomas de virus no identificados, no publicados o pobremente anotados, las funciones de genes son a menudo desconocidas, las identificaciones de genes son frecuentemente limitadas a genes de morfogénesis y lisis, los genomas de muchos fagos son mosaicos, con partes de un rompecabezas del genoma de las bacterias, virus de eucariotas y eucariotas, hay relaciones graduales y formas de transición y los mapas genómicos son presentados en maneras muy divergentes, haciendo la comparación difícil (Ackermann, 2009).

En cuanto a los genomas completos de bacteriófagos reportados en las bases de datos de NCBI, para el caso de *Xanthomonas* spp. son apenas trece y de ellos solamente uno está reportado como fago de *X. vesicatoria*.

2.6. Organización genómica de los bacteriófagos

Los genes de los fagos de cola de ADN de doble cadena están organizados muy eficientemente, presentando poco espacio entre cada gen. Este espacio entre los genes está usualmente ocupado por secuencias regulatorias, como promotores y terminadores (Lu *et al.*, 2013).

Por otro lado, presentan una característica muy peculiar: están organizados en módulos funcionales, ya que al comparar las secuencias de distintos bacteriófagos, se puede observar que comparten la misma organización genética general. Han sido identificados en los límites de los genes puntos de recombinación, estas secuencias de unión son las que promueven el reordenamiento genético a través de la recombinación homóloga, dando como resultado regiones de secuencias intercaladas, y de esta manera los bacteriófagos son mosaicos con respecto el uno del otro. Lo anterior sustenta la idea de transferencia horizontal genética entre

fagos a través de la población. Cabe mencionar que esta transferencia se da entre grupos de genes relacionados funcionalmente (Hendrix *et al.*, 1999; Brüssow y Hendrix 2002).

Esta teoría modular de la evolución de los fagos fue propuesta en el año 1980, y desde entonces se sugirió que las unidades de selección son los módulos, cada uno de los cuales posee una función biológica particular y aunque los fagos sean morfológicamente distintos y tengan hospederos diferentes pueden poseer mapas genéticos homólogos (Botstein, 1980). Sin embargo, la frecuencia de los eventos de recombinación puede depender de la distancia filogenética entre los huéspedes (Lima-Méndez *et al.*, 2011), siendo los bacteriófagos más relacionados filogenéticamente los que presentan más homologías.

Por lo general, la detección de similitudes de uno o más ORFs predichos con proteínas bien conservadas es suficiente para detectar los módulos, por ejemplo, para detectar el módulo de replicación basta con detectar helicasas y ADN polimerasas (Weigel y Seitz, 2006).

El mosaicismo es evidente, aun dentro de las regiones homologas de los genomas de los fagos. Parece probable que los genes “nuevos” se obtienen de los hospederos y/o de otros grupos de fagos (Casjens, 2005). La extensión del mosaicismo en los genomas del fago es notable y se ha convertido incluso más claro a medida que aumenta el número de genomas disponibles para el análisis comparativo (Hatfull, 2008). Y una característica importante del mosaicismo es que hace casi imposible rastrear la descendencia exacta de los fagos (Weigel y Seitz, 2006).

La representación modular es una característica importante, ya que provee una descripción más racional de los genomas donde características como similitud de secuencias, modo de replicación y empaquetamiento no son congruentes con los morfotipos, de esta manera sirve como apoyo para la clasificación (Lima-Méndez *et al.*, 2011).

2.7. Interacción bacteria-bacteriófago

Los bacteriófagos dictan muchos aspectos de la biología bacteriana, afectando muchos aspectos de la fisiología (Clokier *et al.*, 2011), la ecología y la evolución de las bacterias y, por lo tanto, juegan papeles importantes en los ecosistemas, por ejemplo, en el ciclo del carbono y del

nitrógeno, ya que poseen la capacidad de modificar aspectos del ambiente físicos y químicos (Casjens, 2005; Abedon *et al.*, 2009).

De esta manera, las comunidades bacterianas pueden ser afectadas diferencialmente por la comunidad de fagos que las rodea (Rohwer *et al.*, 2000). Siendo los bacteriófagos elementos genéticos móviles que participan en la transferencia horizontal de genes en bacterias; además, muchos genes de virulencia bacterianos están presentes en los genomas de bacteriófagos (Solís-Sánchez *et al.*, 2016), afectando el fenotipo y el comportamiento de sus huéspedes, por ejemplo, genes de toxinas con efectos patogénicos, los cuales se expresan en el estado lisogénico (Little, 2005); estas toxinas codificadas por parte de los bacteriófagos podrían ser una posible estrategia de los fagos para modificar el ambiente y hacerlo más adecuado para su óptimo crecimiento (Abedon *et al.*, 2009).

El proceso en el cual los bacteriófagos median la transferencia horizontal de genes se denomina transducción. Existen dos tipos de transducción, la generalizada y la especializada. Durante la transducción generalizada, un pequeño número de partículas virales puede contener aleatoriamente fragmentos de ADN bacteriano, mientras que en la transducción especializada solo el ADN del huésped que está cercano al sitio de integración del ADN del fago puede ser transducido (Garneau *et al.*, 2017).

Existen pruebas de la transferencia horizontal de genes, por ejemplo, secuencias similares encontradas en fagos muy distantes o genomas de fagos temperados en el cromosoma bacteriano (profagos) (Hendrix, 2002). Se ha reportado que del 3 al 10% del ADN en los genomas bacterianos es contribuido por profagos, contribuyendo de esta manera a la evolución de las bacterias (Brüssow y Hendrix, 2002).

Esto lleva a hablar de una coevolución entre bacteria y bacteriófago, la cual puede ser caracterizada como una constante batalla evolutiva, que comienza con la adsorción del fago y la inyección del material genético, seguido de la replicación dentro de la célula y continúa si el fago entra en lisogénia. Los bacteriófagos pueden existir dentro de las células bacterianas en cuatro formas de acuerdo con sus estrategias evolutivas: como un virus replicante en el ciclo

lítico, en pseudolisogénia (el ácido nucleico del fago reside dentro de su huésped en un estado inactivo inestable), como profago durante la lisogénia o como un profago críptico (el genoma viral permanece atrapado en el cromosoma del huésped y ya no puede lisar ni producir partículas infectivas). Por otro lado, la célula bacteriana reconoce al bacteriófago como un agente extraño y es capaz de evolucionar para evadir la infección viral, por ejemplo, durante la replicación del fago, existen tres mecanismos de defensa por parte de la bacteria: sistema de restricción, el sistema CRISPR (por sus siglas en inglés Clustered Regularly Intersperced Short Palindromic Repeat) e infección abortiva; durante la adsorción, algunas bacterias desarrollan varios mecanismos de bloqueo (enmascarando receptores de fagos por varias proteínas y produciendo matrices extracelulares o inhibidores competitivos); también hay mecanismos que bloquean la entrada del ADN. A su vez, los virus son capaces de desarrollar contramedidas para evitar estos mecanismos de defensa celulares. Esto lleva a una variación continua y selección tanto de bacteria como de virus (Golais *et al.*, 2012).

2.8. Genómica comparativa

Como ya se mencionó, todos los genomas de un tipo de fago dado tienen sus funciones genéticas alineadas a lo largo del genoma en el mismo orden. Esto significa que un único evento de recombinación homóloga puede crear un nuevo genoma (Casjens, 2005).

Un gran desafío para el futuro es comprender las tasas relativas y absolutas de transferencias y creaciones de nuevos genomas, así como las limitaciones de estos procesos de intercambio genético, el tiempo necesario de divergencia entre dos genes para que sus productos ya no sean reconocidamente homólogos por comparación de secuencias, conocer si el intercambio genético se da entre fagos que tienen hospederos poco relacionados o únicamente se dan las relaciones más cercanas (Casjens, 2005). Mediante comparación de secuencias se pueden lograr entender estos y otros aspectos de la biología de los bacteriófagos.

2.9. Metagenómica

Los análisis de metagenómica representan un buen método de caracterización de fagos provenientes del ambiente sin la necesidad de cultivarlos. Primero se concentran y purifican los viriones de una muestra ambiental, después se eliminan los ácidos nucleicos libres, se lisan los

virus y el ADN liberado es secuenciado, y por último se analizan los resultados de secuenciación, comparándose unos con otros (Abedon *et al.*, 2009).

De esta manera, se proporciona una visión alternativa de la estructura del genoma del fago que es diferente pero complementaria a la determinación de la secuencia del genoma completo. La metagenómica de bacteriófagos a gran escala podría ser una ventaja crucial para la comprensión de la genómica general de estos virus (Hatfull, 2008).

Los diferentes grupos de fagos son distintos en su ciclo de vida, tipo de genoma y estructura y; es difícil imaginar que compartan orígenes evolutivos unos con otros, sin embargo, la metagenómica aporta evidencia a favor de la existencia de un origen común (Hendrix, 2002). Por ejemplo, en un estudio de metagenómica viral realizado por Schoenfeld *et al.* (2008) se obtuvieron altos porcentajes de similitud en secuencias de diferentes poblaciones estudiadas. Otro ejemplo de la aplicación de la metagenómica es el análisis metagenómico comparativo de comunidades virales de microbialitas del mar y agua dulce realizado por Desnues *et al.* (2008), donde se demostró que algunos genotipos de fagos están geográficamente restringidos, ya que al comparar tres metagenomas el porcentaje de similitud de secuencias fue muy bajo.

2.10. Empaquetamiento del ADN

Cuando se entra en el ciclo lítico es necesario empaquetar el ADN viral en las cápsides, los fagos con ADN de doble cadena generalmente forman concatámeros, los cuales son cortados por la terminasa durante el empaquetamiento para formar el cromosoma maduro (Black, 1989). Existen cuatro mecanismos principales usados por los fagos para reconocer su propio ADN e iniciar y terminar su empaquetamiento: en el primero, la terminasa puede reconocer un sitio específico donde introduce un corte escalonado (sitio *cos*), generando extremos de ADN fijos, donde el extremo más largo puede ser 5' o 3'; en el segundo caso, una posición fija puede ser reconocida en el ADN del fago donde extremos directos repetidos (DTR) pueden ser generados por síntesis de extensión en el extremo 3' de los cortes escalonados, el tamaño de estos DTR puede variar de algunos cientos de bases a más de diez mil bases, existen bacteriófagos, como el N4 que tiene extremos repetidos con un término preciso en el extremo izquierdo pero muchos posibles términos en el extremo derecho; en el tercer mecanismo, la terminasa puede iniciar

empaquetando en un sitio específico de empaquetamiento (sitio *pac*) y los cortes subsiguientes son hechos en posiciones variables, cuando la cabeza del fago está llena, esto lleva a las cápsides a contener genomas circularmente permutados con extremos redundantes usados para circularizar el genoma del fago a través de la recombinación después de la inyección en la célula huésped; y por último, los fagos de tipo T4 usan una variante del empaquetamiento anterior, con la excepción de que no se reconoce un sitio *pac* y el empaquetamiento es iniciado aleatoriamente, estos fagos usualmente degradan el ADN del huésped, asegurando que solo el ADN viral es empaquetado.

Además de las cuatro estrategias mencionadas, existen otras tres menos frecuentes que no involucran la formación de concatámeros: la primera es el caso del fago P2, el cual tiene un sitio *cos*, pero el sustrato a empaquetar es ADN de doble cadena circular; el bacteriófago Mu se replica a través de transposición en el genoma del huésped y lleva fragmentos del ADN del huésped en sus extremos; y el bacteriófago phi29 tiene proteínas covalentemente unidas a sus extremos del ADN. Los diferentes mecanismos de empaquetamiento de ADN llevan a una variedad de extremos de ADN en el genoma del bacteriófago (Garneau *et al.*, 2017).

2.11. Mecanismos genéticos-moleculares para decidir el ciclo lisis-lisogénia

En los bacteriófagos es importante estudiar los genomas individuales, así como estudiar poblaciones enteras de fagos mediante metagenómica, el flujo de genes y la comparación de genomas entre bacteriófagos distintos, para con ello lograr conocer la diversidad, evolución, y relación bacteria-bacteriófago. Pero cuando el principal objetivo es emplear a los bacteriófagos como agentes de control biológico, los bacteriófagos deben ser altamente líticos y no entrar en lisogénia y se deben entender los mecanismos que emplean estos microorganismos para sus distintos procesos naturales como es el caso de la decisión lisis-lisogénia.

El Quorum Sensing (QS) es un proceso de comunicación altamente estudiado en bacterias, en este proceso las bacterias se comunican entre sí mediante moléculas de señalización química, dicha comunicación implica producir, liberar, detectar y responder a pequeñas moléculas similares a hormonas denominados autoinductores, de esta manera, las bacterias pueden monitorear el ambiente en busca de otras bacterias y alterar el comportamiento a escala

poblacional en respuesta a cambios en el número y/o especies presentes en una comunidad (Waters y Bassler, 2005). No obstante, también existen reportes de este tipo de comunicación en bacteriófagos. Hargreaves *et al.* (2014) reportaron que el bacteriófago phiCDHM1 posee dentro de su genoma tres homólogos de genes bacterianos del sistema de QS, siendo el primer reporte de estos genes presentes en un genoma de fago.

En el momento de la infección de su bacteria huésped, el fago temperado debe decidir entre replicarse en la célula y lisarla o entrar en un estado lisogénico. La decisión lisis-lisogénia ha sido ampliamente estudiada para el caso del fago lambda de *E. coli*, estando principalmente influenciada por el estado metabólico de la célula infectada y el número de partículas de fago coinfectantes (Oppenheim *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2010). La decisión de lisis-lisogénia en el fago lambda se controla mediante una interacción entre los reguladores transcripcionales codificados en fagos CI, CII y Cro, así como factores codificados por el huésped, el regulador principal del estado lisogénico es el represor transcripcional CI, que se une a los promotores de los genes líticos e inhibe su expresión (Oppenheim *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Erez *et al.* (2017) se encontró que el grupo de virus SPbeta de *Bacillus subtilis* usa una pequeña molécula de comunicación para coordinar las decisiones de lisis-lisogénia, de una manera similar al QS reportado en bacterias. Durante la infección de su célula huésped (*B. subtilis*), el fago produce un péptido de comunicación de seis aminoácidos (SAIRGA) de largo que es liberado al medio, al cual llamaron “*arbitrium*”. En infecciones posteriores, la progenie de fagos mide la concentración de este péptido y entra en el ciclo lisogénico si la concentración es suficientemente alta (Figura 4). Diferentes fagos codifican diferentes versiones del péptido, lo cual demuestra que el código del péptido de comunicación para la decisión de lisogénia es específico para cada fago, y presenta reglas estrictas en la misma composición en su secuencia, con un residuo obligatorio de glicina en la quinta posición.

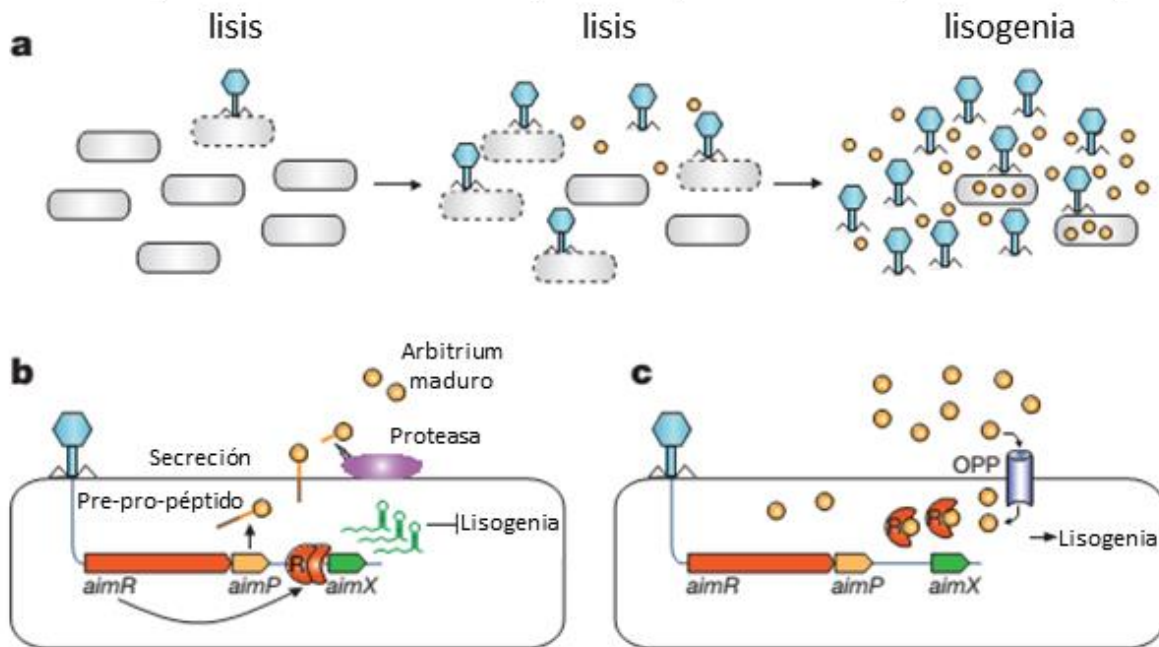


Figura 4. Diagrama esquemático del mecanismo de la decisión lisis-lisogénia del bacteriófago phi3T asociado a la cepa 168 de la bacteria *Bacillus subtilis*. a) dinámica de la acumulación del péptido *arbitrium* durante la infección. b) los genes tempranos *aimR* y *aimP* son expresados inmediatamente después de la infección. *AimR*, como dímero, activa la expresión de *aimX*, el cual es un inhibidor de la lisogénia. Al mismo tiempo *AimP* es expresada, secretada y procesada extracelularmente para producir el péptido maduro. c) en estadios tardíos de la infección *arbitrium* se acumula en el medio y entra a la bacteria por el transportador OPP. El receptor *AimR* se une al péptido *arbitrium* evitando la expresión de *aimX*, llevando a lisogénia (imagen modificada de Erez *et al.*, 2017).

Al realizar BLAST para identificar homólogos cercanos de la proteína *AimR* dentro de fagos y profagos, encontraron 112 homólogos, la mayoría pertenecientes al grupo de fagos SPbeta (Erez *et al.*, 2017). Los elementos genéticos móviles que contienen el sistema *arbitrium* y sistemas similares al *arbitrium* se encontraron dentro de los genomas de 41 especies bacterianas, siendo la mayoría bacterias del género *Bacillus*, y aunque no se descarta que este sistema sea ampliamente utilizado por los fagos en la naturaleza, los homólogos de *AimR* se encontraron solo dentro del orden *Bacillales*; sin embargo, no se descarta que los sistemas *arbitrium* estén presentes en los fagos que infectan a otras bacterias, pero quizá estos sistemas han evolucionado

más allá de las capacidades de detección de las búsquedas basadas en homología (Stokar-Avihail *et al.*, 2019).

Para que un bacteriófago pueda ser utilizado como control biológico debe ser exclusivamente lítico (Buttimer *et al.*, 2017), por ello, el estudio y comprensión del mecanismo de decisión lisis-lisogénia podría ser utilizado para el desarrollo de nuevas biotecnologías, por ejemplo, al ser identificado el péptido encargado de la decisión lisis-lisogénia se podrían desarrollar bacteriófagos líticos profesionales mediante la inhibición de dicho péptido y así evitar que el fago de interés entre en su ciclo lisogénico, de esta manera logrando un mejor control biológico de las enfermedades bacterianas. En el caso particular de *Xanthomonas vesicatoria*, se podría lograr un mejor control de la mancha bacteriana al entender mejor los mecanismos del fago Φ XaF18.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de bacteriófagos para el tratamiento de enfermedades bacterianas se ha convertido en una de las estrategias más prometedoras en áreas como la medicina, veterinaria y la agricultura, así mismo, actualmente son la base para el desarrollo de nuevos productos biotecnológicos, contribuyendo de manera importante al campo de la biología molecular y la biotecnología. Dicho desarrollo depende en gran medida de conocimiento de las características moleculares y biológicas de los fagos, sin embargo, a pesar de ser los organismos más abundantes del planeta (10^{32} partículas virales) y del crecimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, hoy en día, tan solo se han secuenciado poco más de 2500 fagos y de los cuales menos de 20 corresponden al género *Xanthomonas*. Por lo tanto, un estudio detallado del genoma y biología de nuevos fagos de *Xanthomonas vesicatoria* es indispensable para el desarrollo de nuevos productos biotecnológicos.

4. HIPÓTESIS

El bacteriófago Φ XaF18 posee dentro de su genoma información genética que asegura algún mecanismo molecular que regula su ciclo lítico-lisogénico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar molecular y biológicamente al fago Φ XaF18 de *Xanthomonas vesicatoria*.

5.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar morfológicamente al bacteriófago Φ XaF18, mediante microscopía electrónica de transmisión.
2. Secuenciar y anotar bioinformáticamente el genoma del bacteriófago Φ XaF18.
3. Determinar el mecanismo de regulación del ciclo lítico-lisogénico en el bacteriófago Φ XaF18.

6. METODOLOGIA

6.1. Bacteriófago/bacteria huésped

El bacteriófago empleado fue el Φ XaF18 ligado a la cepa BV824 de *Xanthomonas vesicatoria* como su hospedera, ambos de la colección microbiológica del laboratorio de Fitopatología de la unidad de Biotecnología Vegetal de la Unidad Zapopan del CIATEJ.

6.1.1. Purificación y multiplicación del bacteriófago Φ XaF18

Se tomaron 20 μ L del stock del bacteriófago y se colocó una gota en doble placa (400 μ L de bacteria + 3 mL de medio NYGA suave) (Anexo 4). Se dejó en incubación 18-24 h a 28°C. Se tomó el bocado de la placa y se pasó a un tubo de vidrio con 5 mL de medio líquido NYG (5 g/L de peptona, 3 g/L de extracto de levadura, 20 mL/L de glicerol) y se agregaron 400 μ L de la bacteria. Se incubó durante 18 h a 28°C y 200 rpm (modificado de Adams, 1959). Después del tiempo de incubación, se agregaron 250 μ L (0.5:10 cloroformo: cultivo) de cloroformo y se mezcló por inversión, se centrifugó a 13000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante.

Con el sobrenadante recuperado se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-8} y se sembraron 10 μ L de cada dilución en doble placa (sobre una placa de medio NYGA sólido (16 g/L de agar, se agrega la mezcla dilución-bacteria: 400 μ L de bacteria y 3 mL de medio NYGA suave (6 g/L de agar) a 48°C). Se incubó 18 h a 28°C. Se tomó la dilución donde se encontraron placas de lisis aisladas y se hizo doble placa nuevamente (400 μ L de bacteria +10 μ L de bacteriófago + 3 mL de medio NYGA suave). Se incubó 18 h a 28°C. Se tomó una placa de lisis aislada y se colocó en 1 mL de medio NYG más 100 μ L de un cultivo de 18 h de la bacteria. Se incubó 18 h a 28°C. Se agregó cloroformo (0.5:10 cloroformo: cultivo), se agitó y centrifugó a 13000 rpm por 5 min, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4°C. El procedimiento se realizó por duplicado para asegurar una población de fagos homogénea.

Una vez que se obtuvieron placas homogéneas se procedió a escalar el lisado de bacteriófagos a un mayor volumen, se tomaron 100 μ L del último lisado y se agregaron a 5 mL de medio NYG más 400 μ L de bacteria. Se incubó 18 h a 28°C y 200 rpm. Se agregó cloroformo (0.5:10 cloroformo: cultivo), se agitó y centrifugó a 13000 rpm por 5 min, se recuperó el sobrenadante

y se almacenó a 4°C. Se agregó todo el sobrenadante recuperado a 50 mL de medio NYG más 4 mL de bacteria. Se incubó 18 h a 28°C/200 rpm. Se agregó cloroformo (0.5:10 µL cloroformo: cultivo), se agitó y centrifugó a 13000 rpm por 5 min, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4°C.

Una vez más, se agregó todo el sobrenadante recuperado a 200 mL de medio NYG más 16 mL de bacteria. Se incubó 18 h a 28°C y 200 rpm. Se agregó cloroformo (0.5:10 cloroformo: cultivo), se agitó y centrifugó a 13000 rpm por 5 min, se recuperó el sobrenadante, se filtró con membrana de 0.22 µm y se almacenó a 4°C. Por último, se tituló mediante diluciones decimales seriadas y siembra en doble placa.

6.1.2. Concentración del título del bacteriófago mediante la técnica con Polietilenglicol/NaCl

Para precipitar los fagos se añadió NaCl al cultivo bacteriano conteniendo el fago, ajustándose a una concentración de 1M y se disolvió con agitador magnético, una vez disuelto se ajustó a 10% de PEG (polietilenglicol) 8000 la solución total, se disolvió con agitador magnético. Se dejó 24 h a 4°C, se centrifugó a 15000×g por 1 h a 4°C. Se resuspendió la pastilla en medio de cultivo líquido NYG. Por último, se tituló el fago mediante diluciones decimales seriadas y siembra en doble placa.

6.2. Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) adecuada para la fase exponencial del fago ΦXaF18

La multiplicidad de infección o MOI representa el número de genomas virales con los que se infecta por célula bacteriana; si se añade un millón de viriones a un millón de células, la MOI es de uno. Sin embargo, eso no significa que cada célula en el cultivo recibe un virión. El cálculo de la MOI está dado por la siguiente ecuación (Medina *et al.*, 2016):

$$MOI = \frac{\text{número de células bacterianas del cultivo}}{\text{número de viriones}}$$

Para determinar en cual MOI se obtenía mayor concentración de bacteriófagos se puso a crecer la bacteria en medio líquido NYG a 28°C y 200 rpm durante 18 h. Después del tiempo de

incubación, se tomó 1 mL y se pasó a medio NYG nuevo, se dejó creciendo 6 h a 28°C y 200 rpm. Se calculó la concentración midiendo la absorbancia a una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) y se ajustó a una OD_{600} de 0.1.

Se dejó creciendo el cultivo bacteriano a 28°C y 200 rpm por 6 h, tiempo en el cual se inoculó con el bacteriófago con relaciones virus-bacteria de 1:1, 1:10 y 10:1 y se volvió a dejar a 28°C y 200 rpm por 24 h. Se centrifugó a $15000\times g$ a 4°C por 20 min, se tomó el sobrenadante y se filtró con membranas de 0.22 μm (la pastilla fue desechada).

Se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-8} y se realizó ensayo de doble placa para colocar las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . Se incubó a 28°C hasta la aparición de placas de lisis. Las placas de lisis fueron contadas y con base en esto se determinó la MOI a la cual hubo mayor infección viral, mediante el conteo directo de las placas de lisis. Se realizó duplicado para cada una de las relaciones evaluadas.

6.2.1. Conteo de placas de lisis mediante ensayo de doble placa en agar suave

Se fundió el medio NYGA suave y se mantuvo a 48°C en baño maría. En tubos de ensayo de 5 mL se agregaron 400 μL de cultivo bacteriano y 10 μL de filtrado enriquecido. Se dejó por 10 min y se agregaron 3 mL de medio NYGA suave. Se mezcló y se vació sobre una caja Petri con medio NYGA sólido, formándose así una doble capa, se homogenizó y dejó enfriar, se incubó a 28°C por 18 h. Se realizó conteo de las placas de lisis (modificado de Adams, 1959).

6.3. Caracterización morfológica del bacteriófago $\Phi XaF18$

6.3.1. Purificación mediante gradiente de cloruro de cesio (CsCl)

Se realizó centrifugación en gradiente de CsCl para eliminar residuos contaminantes que impidieran la observación en microscopio electrónico de transmisión (MET), a partir de los bacteriófagos recuperados de la concentración con PEG8000. Se prepararon tres diferentes soluciones de CsCl (1.3 g/mL, 1.5 g/mL y 1.6 g/mL), se confirmó la densidad pesando 1 mL de cada solución. Se prepararon los gradientes en tubos de centrifuga de vidrio agregándose lentamente con una micropipeta cada solución de mayor a menor densidad, teniendo cuidado de no mezclar las distintas soluciones. Por último, se agregó la suspensión del bacteriófago arriba

del gradiente. Se centrifugó a 100000×g por 20 h en centrifuga Sorvall WX Ultra 90 de Thermo Scientific™.

Una vez terminado el tiempo de centrifugación, se separaron todas las fracciones obtenidas con una pipeta Pasteur y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL. El CsCl fue removido mediante diálisis a 4°C durante 24 h 2 veces en buffer SM 1000x (1 mL de la muestra más 2 L de buffer) (Anexo 4).

6.3.2. Tinción y visualización en microscopio electrónico de transmisión (MET) de los bacteriófagos

Los bacteriófagos fueron teñidos negativamente: 7 µL de la suspensión del fago puro fueron colocados en una rejilla de cobre recubierta con Formvar y se dejó adsorber durante 12 min, se retiró el exceso con papel filtro y se agregaron 7 µL de acetato de uranilo al 2% (w/v), se dejó adsorber por 10 min y el exceso se retiró con papel filtro, la rejilla se dejó secar al aire libre. La muestra fue visualizada en microscopio electrónico de transmisión (FEI/PHILIPS modelo Morgagni M-268) a 80 kV. Se tomaron micrografías electrónicas a 180 kx. Se tomaron medidas de la cápside, longitud de la cola y longitud total del bacteriófago en el programa ImageJ; fueron tomadas 10 mediciones en total para ser promediadas y así determinar el tamaño de las partículas virales. Los bacteriófagos fueron identificados usando el criterio morfológico señalado en el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (modificado de Braun *et al.*, 1989; Yoon *et al.*, 2002; Solís-Sánchez *et al.*, 2016).

6.4. Caracterización genómica del bacteriófago ΦXaF18

6.4.1. Extracción de ADN del bacteriófago

El ADN genómico fue extraído mediante la técnica modificada de Sambrook y Russell (2001). En un tubo de 1.5 mL se agregó 500 µL del lisado del fago, 10 µL de DNAsa I (10 mg/mL) y 1.72 µL de RNAsa (29 mg/mL) y se incubaron a 37°C por 2 h. Después se agregaron 50 µL de SDS (10x), 60 µL de EDTA pH 8 (0.5 M), 10 µL de CaCl₂ (250 mM) y por último se agregaron 100 µL de proteinasa K (0.1 mg/mL) y se incubó nuevamente a 37°C por 1 h. Terminado el tiempo de incubación, se agregó un volumen igual al de la muestra de fenol-cloroformo (1:1) y se centrifugó a 10000 rpm por 2 min. Se recuperó la fase superior, se agregó nuevamente un

volumen de fenol-cloroformo y se centrifugó a 10000 rpm por 2 min. Se repitió las veces necesarias hasta obtener las dos fases limpias. Se recuperó la fase superior y se agregó un volumen de isopropanol al 100% igual al de la fase recuperada, se incubó a -80°C por 30 min. Se centrifugó a 13000 rpm a 4°C por 30 min, terminado el tiempo de centrifugación se desechó el sobrenadante por decantación. Para lavar la pastilla de ADN, se agregó etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm a 4°C por 20 min, se desechó el etanol por decantación y se volvió a lavar con etanol, se dejó secar la pastilla en campana. Una vez evaporado completamente el etanol, se resuspendió en 40 µL de agua milliQ y se almacenó a -20°C. Se determinó la concentración de ADN mediante la absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro ND-1000 y mediante geles de agarosa al 0.8% y un gradiente de electroforesis en buffer SB (borato disódico decahidratado a pH 8.5).

6.4.2. Digestión del ADN para determinar su naturaleza

Se digirió el material genético con distintas enzimas. Para determinar si se trataba de ADN o ARN se trató con las enzimas DNasa I y RNasa, las cuales degradan ADN y ARN respectivamente; para determinar la naturaleza del ADN: cadena doble o cadena sencilla se trató con la enzima S1 nucleasa, la cual degrada cadena sencilla de ADN y; por último, para determinar si el ADN fue circular o lineal se trató el ADN con la enzima exonucleasa III, la cual degrada extremos de ADN.

6.4.3. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) del ADN del bacteriófago

Se realizaron digestiones enzimáticas del ADN viral con distintas enzimas de restricción. Posteriormente, se observaron los patrones de bandeo producidos por la digestión mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. Las enzimas de restricción empleadas fueron *BamHI*, *BclI*, *BspHI* y *EcoRI*. En tubos de 200 µL se agregó 2 µL del buffer, 0.5 µL de la enzima (20,000 U/µL) y 200 ng del ADN del bacteriófago, se ajustó la reacción a 20 µL con H₂O milliQ. Se digirió durante una hora a 37°C para las enzimas *BamHI*, *BspHI* y *EcoRI* y a 50°C para la enzima *BclI*, seguido de 20 min a 65°C para inactivar la enzima.

Por otro lado, se realizaron digestiones *in silico* en NebCutter V2.0 con las mismas cuatro enzimas (*BamHI*, *BclI*, *BspHI* y *EcoRI*) para realizar comparaciones entre estas y las digestiones *in vitro*.

6.4.4. Secuenciación y ensamblado del genoma viral

El ADN del bacteriófago purificado fue secuenciado en la plataforma de Illumina Miseq, en colaboración con el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Se realizó ensamblado *de novo* utilizando el programa SPADES 3.12.0 (Bankevich *et al.*, 2012).

6.4.5. Ensayos de PCR

Con el fin de evaluar la presencia del bacteriófago y de la bacteria, se realizaron ensayos de PCR para ambos microorganismos. Para el caso del bacteriófago se diseñaron oligonucleótidos; mientras que para la bacteria se emplearon oligonucleótidos previamente reportados por Lee *et al.* (2009).

6.4.5.1. Diseño de oligonucleótidos para el bacteriófago

Se diseñaron los oligonucleótidos en los servidores Primer3 y Primer-BLAST para detectar al bacteriófago, se analizaron con el servidor Oligoanalyzer de IDT (Integrated DNA Technologies) para verificar que no formaran horquillas, homodímeros o heterodímeros, se realizó también una prueba de especificidad en Primer-BLAST para cada par de oligonucleótido para evitar así la generación de productos inespecíficos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para el bacteriófago Φ XaF18.

Oligonucleótidos	Secuencia
M1F	GCA GAA CGA TAG CGC AAA GG
M1R	CGT AGC TGC ATT CTT CAC GC
M2F	ACT CGA TTG CCA TCA CGG TT
M2R	GTA AGC GTC ATC TTG CAG CG
M3F	TTC CTC ATC CTC GAT GGT TC
M3R	GAG TTT TCT GGC GTT GAA GC
M4F	GCG GTA TTG ACG TCG TTT CG
M4R	GGC GGC ATC GTA TCA GGT TA
M5F	GCA CAT CAC CGG CAT GAA TC
M5R	GAA CGC AAG ATG GCG ATG TC
M6F	GTA CGC GAC TGC GTG ATT TC
M6R	GGT CGC GGT ACA GGT CAT AG
M7F	CAG TTC TGC AGT TGT GGT GC
M7R	GTA CGC GTA GAC GAT GCT GA
TER1F	CAC GAT TGG AGA CCG AGA GG
TER1R	CGA CAG TCC GTA GTC CAT CG

6.4.5.2. Reacciones de PCR

Para el caso de la bacteria, se realizó amplificación del gen *estA*. Se emplearon los oligonucleótidos Xc-lip-F2 (TAT GTG ATG GTG CCG ACC ATTC) y Xc-lip-R2 (GGA CTT CGC GGT CCA CGT CGT AGC) (Lee *et al.*, 2009), los cuales amplifican un fragmento de 777 pares de bases. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo para desnaturalización de 1 min a 94°C; 35 ciclos para amplificación de: 30 s a 94°C, 30 s a 58°C para alineamiento, y 1 min a 72°C de extensión; 5 min a 72°C de extensión final. La composición de la mezcla de la reacción consistió en 1.2 μ L de buffer de PCR, 1.2 μ L de dNTP's, 0.5 μ L de cada oligonucleótido, 1.4 μ L de agua milliQ, 0.2 μ L de enzima Taq polimerasa y 7 μ L de ADN, teniendo un volumen final de 12 μ L.

La PCR para el bacteriófago se realizó con ocho juegos de oligonucleótidos, uno de los cuales corresponde a la secuencia codificante de la proteína terminasa subunidad mayor (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 y TER1). Las condiciones de amplificación fueron: 3 min a 95°C de

desnaturalización inicial; 30 ciclos de: 30 s a 95°C de desnaturalización, 30 s a 57°C de alineamiento (excepto para el juego M3, con una temperatura de alineamiento de 54°C) y 30 s a 72°C de extensión; 5 min a 72°C de extensión final. La mezcla de reacción consistió en 1.2 µL de buffer de PCR, 1.5 µL de dNTP's, 1.5 µL de cada oligonucleótido, 4.8 µL de agua milliQ, 0.5 µL de enzima Taq polimerasa y 1 µL de ADN, teniendo un volumen final de 12 µL.

Para confirmar la correcta secuenciación y ensamblaje del genoma, los fragmentos de PCR M1, M2, M3, M5, M6 y M7 se purificaron mediante el kit de purificación QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN cat. no. 28704), según las instrucciones del fabricante y, se secuenciaron en el Laboratorio de Servicios Genómicos del Langebio CINVESTAV-Unidad Irapuato. Una vez obtenidas las secuencias se compararon *in silico* con el genoma mediante búsqueda de las secuencias en el programa SnapGene Viewer 4.3.8.

Además, se realizó PCR con los oligonucleótidos M4F y M1R, para cubrir una parte mayor del genoma y de esta manera confirmar un fragmento más grande con una correcta secuencia, esperando un amplicon de 2858 pares de bases. Se realizó una PCR más, con los oligonucleótidos M3F y TER1R, con un producto esperado de 6061 pb. Con el producto de esta PCR se realizó digestión enzimática *in vitro* e *in silico* con la enzima *BclI* de acuerdo con la metodología del apartado 6.4.3., con previa purificación del amplicon mediante el kit de purificación QIAquick® Gel Extraction Kit.

6.4.6. Análisis bioinformático

6.4.6.1. Determinación de genes putativos

Se identificaron marcos abiertos de lectura (ORFs) empleando los servidores EasyGene 1.2b Server, Basys (Bacterial Annotation System), ORFfinder (Open Reading Frame Finder) de NCBI, Phaster (Phage Search Tool Enhanced Release), Orf finder de SMS (Sequence Manipulation Suite) y el programa Phanotate 0.13.0 (Larsen y Krogh, 2003; Van Domselaar *et al.*, 2005; Arndt *et al.*, 2016; Stothard, 2000; McNair *et al.*, 2019). Los ORFs fueron anotados en los programas Artemis Release 16.0.0 y SnapGene Viewer 4.3.8, para posteriormente determinar si fueron codificantes.

Se realizó la comparación de los distintos ORFs obtenidos entre las distintas fuentes para así obtener los ORFs consenso, así como comparación con la base de datos de NCBI mediante BLASTx para determinar cuáles son los ORFs codificantes o no para alguna proteína (Ye *et al.*, 2006).

Además, se realizó búsqueda de dominios conservados mediante los servidores Prosite de Expasy y Conserved Domain Search Service (CD Search) de NCBI (Sigrist *et al.*, 2010; Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

6.4.6.2. Predicción de secuencias funcionales

Se realizaron predicciones de promotores, operadores y terminadores empleando el servidor Phisite para los tres tipos de secuencias regulatorias; además, para el caso de los terminadores se realizaron predicciones también en el servidor ARNold (Klucar *et al.*, 2010; Naville *et al.*, 2011).

Se realizó la búsqueda de ARNs de transferencia y ARNs ribosomales utilizando tRNAscan-SE, RNAmmer y Rfam (Lowe y Eddy, 1997; Lagesen *et al.*, 2007; Griffiths-Jones *et al.*, 2003).

6.4.6.3. Determinación de la estrategia de empaquetamiento

Mediante el programa PhageTerm se determinó el tipo de extremos del ADN viral, así como la ubicación y el tipo de dicha secuencia terminal, además del modo de empaquetamiento.

6.4.6.4. Análisis filogenético

Se realizó análisis filogenético con la secuencia de la proteína terminasa subunidad mayor, fueron realizados dos análisis, uno para situar al bacteriófago dentro del orden *Caudovirales* y otro más para situarlo dentro de la familia *Myoviridae*.

Primero se realizó alineamiento de la secuencia proteica de la terminasa subunidad mayor del bacteriófago Φ XaF18 en el programa Clustal X 2.1 (Larkin *et al.*, 2007), con una extensión de hueco de 0.8 para el árbol de *Caudovirales* y 1.0 para el árbol de *Myoviridae*, y distancia de separación de hueco de 5 para ambos. Seguido del alineamiento, se realizó la construcción del

árbol filogenético empleando el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) mediante el método Neighbor-joining con una distribución gamma de 10 y 1000 réplicas de bootstrap. Para realizar el árbol filogenético de los *Caudovirales* se emplearon 90 secuencias proteicas y para el de la familia *Myoviridae* fueron empleadas 63 secuencias.

6.4.6.5. Análisis comparativo

Se realizó un BLASTn con la secuencia completa del genoma del bacteriófago ΦXaF18 para determinar su similitud con otros bacteriófagos. Después de lo cual, se realizó análisis comparativo en el programa Mauve 20150226 (Darling *et al.*, 2004) con el bacteriófago KPhi1.

6.5. Análisis genético-fenotípico del mecanismo de regulación lisis-lisogénia

Se realizó la búsqueda de genes implicados en el mecanismo de regulación lisis-lisogénia, así como la búsqueda del péptido *arbitrium*, en el genoma del bacteriófago ΦXaF18. Por otro lado, se realizó medio condicionado con posterior evaluación mediante curva de crecimiento bacteriano para determinar la existencia en el medio alguna molécula liberada por los bacteriófagos que esté implicada en la decisión lisis-lisogénia del fago ΦXaF18.

6.5.1. Búsqueda de genes implicados en el mecanismo de regulación lisis-lisogénia en el genoma del bacteriófago ΦXaF18

Con la finalidad de dilucidar si el genoma del bacteriófago ΦXaF18 poseía los genes implicados en el mecanismo de regulación lisis-lisogénia se realizó un alineamiento tipo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) con los tres genes claves de este mecanismo: *aimP*, *aimX* y *aimR*.

6.5.2. Búsqueda del péptido *arbitrium* en el genoma del bacteriófago ΦXaF18

Por otro lado, se realizó un análisis de BLASTp para la secuencia proteica denominada *arbitrium*, así como con otras secuencias reportadas por Erez *et al.* (2017) como homologas del péptido *arbitrium* en el proteoma predicho del fago ΦXaF18.

6.5.3. Búsqueda del mecanismo lisis-lisogénia *in vivo* mediante medio condicionado

Para la realización del medio condicionado se cultivó la cepa BV824 de *X. vesicatoria* en medio líquido NYG, ajustándose a una OD₆₀₀ de 0.1 y se dejó en incubación a 28°C y 200 rpm durante 18 h. Se centrifugó el cultivo a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en medio líquido NYG nuevo, a partir de esta suspensión se realizó un cultivo nuevo, ajustándose a OD₆₀₀ de 0.1 y se dejó en incubación a 28°C y 200 rpm durante 6 h.

Terminado el tiempo de incubación se midió la OD₆₀₀ y se inoculó con bacteriófagos a una MOI de 1 solamente para el medio condicionado. Se realizaron dos cultivos: el medio condicionado (con bacteria y bacteriófago) y el medio control (solo con bacteria). Se dejó en incubación a 28°C y 200 rpm durante 3 h. Se colectó el medio de cultivo y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se filtró con filtros de 0.22 µm para eliminar restos celulares. Se realizó un segundo filtrado con filtros de 3 kDa para eliminar las partículas virales y moléculas de más de 3 kDa (se filtró centrifugando a 5000×g por 30 min a 4°C). Se almacenó a 4°C para su posterior uso.

6.5.3.1. Curva de crecimiento para evaluar medio condicionado

Se realizó una curva de crecimiento bacteriano para evaluar la posible presencia de moléculas de señalización en el medio condicionado. Primero se cultivó la cepa BV824 de *X. vesicatoria* en medio líquido NYG, ajustándose a una OD₆₀₀ de 0.1 y se dejó en incubación a 28°C y 200 rpm durante 18 h. Se centrifugó el cultivo a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 5 mL de medio líquido NYG nuevo, a partir de esta suspensión se realizó un cultivo nuevo, ajustándose a OD₆₀₀ de 0.1, y se dejó en incubación a 28°C y 200 rpm durante 6 h. Nuevamente se centrifugó el cultivo a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 5 mL de medio líquido NYG nuevo. A partir de esto se tomó bacteria para inocular el medio de cultivo condicionado, se inoculó ajustándose a una OD₆₀₀ de 0.1 en un volumen total de 10 mL, se calculó la concentración bacteriana midiendo OD₆₀₀ y se agregó el bacteriófago a MOI de 1. Se dejó en incubación a 28°C y 200 rpm, se evaluó el crecimiento bacteriano mediante la

medición de la OD₆₀₀, cada dos h durante 14 h y una última evaluación a las 24 h. Se realizó otra curva de crecimiento de la misma manera, a excepción de que se inoculó bacteriófago a las 24 h y se evaluó hasta las 40 h. Las curvas de crecimiento fueron en total 6 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Curvas de crecimiento realizadas para evaluar el mecanismo lisis-lisogénia en el bacteriófago ΦXaF18.

Tipo de medio de cultivo	Microorganismos inoculados	Tiempo de inoculación del bacteriófago	Tiempo total evaluado
Condicionado	Bacteria + Bacteriófago	0 h	24 h
Condicionado	Bacteria	-	24 h
Condicionado	Bacteria + Bacteriófago	24 h	40 h
Condicionado	Bacteria	-	40 h
Control	Bacteria + Bacteriófago	0 h	24 h
Control	Bacteria	-	24 h

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Purificación y multiplicación del bacteriófago Φ XaF18

Se purificó y multiplicó el bacteriófago Φ XaF18. La primera gota del stock de bacteriófago que fue sembrada mostró un halo de lisis después del tiempo de incubación, lo cual demostró que los bacteriófagos se encontraron con actividad lítica (Figura 5).



Figura 5. Halo de inhibición formado por el bacteriófago Φ XaF18. Sembrado en doble placa de medio NYGA. Se observa un halo claro, lo cual es indicador de lisis bacteriana ocasionada por el bacteriófago.

Una vez que se obtuvieron placas homogéneas se procedió a escalarlo para obtener 200 mL de lisado del bacteriófago, cuando se terminó el proceso de purificación y multiplicación se realizó la titulación del bacteriófago (Figura 6), obteniéndose un título de 6×10^{10} UFP/mL.

Debido a que el proceso de purificación y multiplicación conlleva la utilización de cloroformo, se pudo confirmar que el bacteriófago Φ XaF18 fue resistente a cloroformo, ya que dicha sustancia no afectó la concentración ni la viabilidad del bacteriófago (actividad lítica).



Figura 6. Experimento de la titulación del bacteriófago Φ XaF18 después del proceso de multiplicación. Se obtuvo un título de 6×10^{10} UFP/mL.

7.1.1. Precipitación de bacteriófagos con Polietilenglicol/NaCl

Se logró concentrar el lisado del bacteriófago Φ XaF18. El título fue mayor de 6×10^{10} UFP/mL (la concentración a partir de la cual se partió), aumentando a 5×10^{11} UFP/mL.

7.2. Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) adecuada para la fase exponencial del fago Φ XaF18

Se determinó que la mejor multiplicidad de infección (MOI) fue la de 1, debido a que al realizar la titulación se obtuvo mayor cantidad de placas de lisis en esta relación. Los resultados se muestran en el Cuadro 3. Por lo cual, 1 fue la MOI que se empleó en todos los experimentos posteriores.

Cuadro 3. Concentración del bacteriófago Φ XaF18 posterior a la multiplicación a distintos valores MOI calculados mediante técnica de doble placa. Las repeticiones representaron experimentos independientes.

MOI (relación fago: bacteria)	Concentración (10^{10} UFP/mL)	
	Experimento 1	Experimento 2
1:1	50	30
1:10	28	10
10:1	4	11

7.3. Caracterización morfológica

Se determinó que el bacteriófago Φ XaF18 pertenece al orden *Caudovirales*, esto al realizar el análisis en microscopio y observar que se trata de un fago de cola; a su vez se situó dentro de la familia *Myoviridae*, ya que las medidas de la cápside y cola se encuentran dentro del intervalo esperado para dicha familia según lo reportado por Comeau *et al.* (2012), quienes señalan que fagos pertenecientes a la familia *Myoviridae* tienen un tamaño de cápside situada entre 55 a 77 nm y un tamaño de cola de 62 a 115 nm. El bacteriófago Φ XaF18 midió 62.5 nm de vértice a vértice de la cápside, 57 nm de lado a lado de la cápside, 85.7 nm de longitud de la cola y el total del largo del bacteriófago desde el vértice apical de la cápside hasta la base de la cola fue de 157.5 nm (Figura 7). Debido a que presentó la morfología típica de dicha familia, se puede deducir que posee cola contráctil y rígida, característica típica de esta familia.

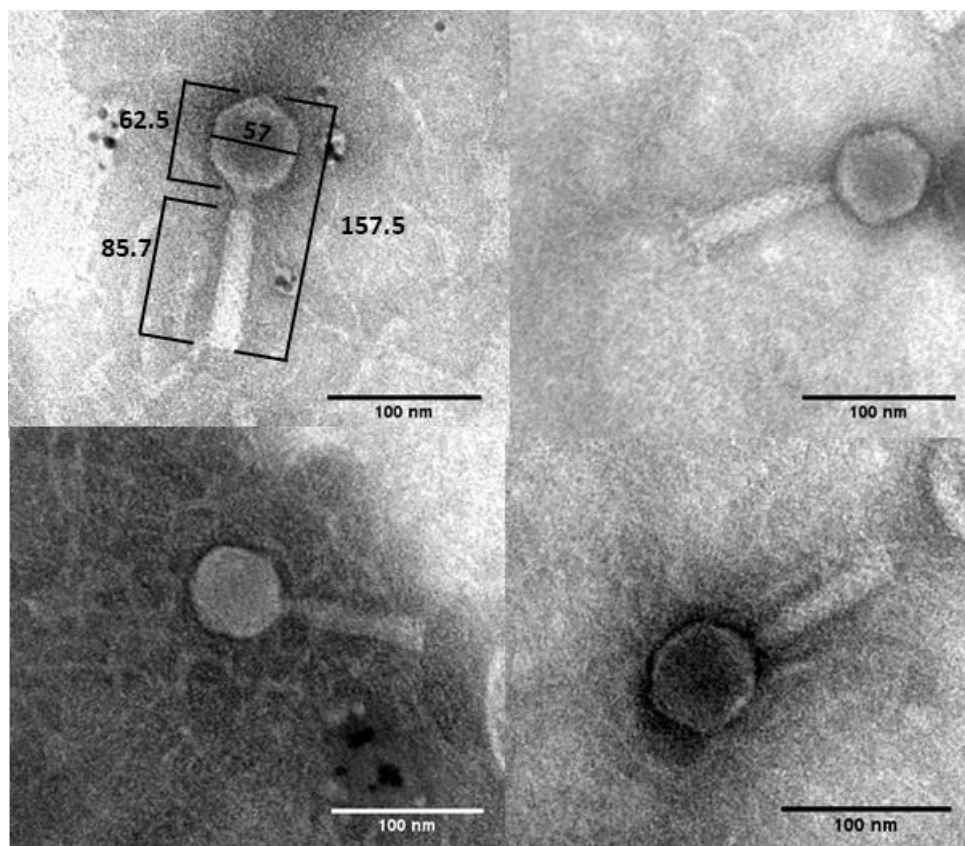


Figura 7. Micrografías electrónicas del bacteriófago Φ XaF18. Las medidas son las siguientes: 62.5 nm de vértice a vértice de la cápside, 57 nm de lado a lado de la cápside, 85.7 nm de longitud de la cola y 157.5 nm del total del largo del bacteriófago desde el vértice

apical de la cápside hasta la base de la cola. Imágenes tomadas a 180kx en microscopio electrónico de transmisión (FEI/PHILIPS modelo Morgagni M-268) a 80 kV.

En la Figura 8 se presentan las partes del bacteriófago Φ XaF18, donde se pueden observar la cápside, el cuello, la cola, la placa basal y las espículas; no se logró observar en ninguna de las micrografías electrónicas la presencia de las fibras de la cola, debido quizá a ser demasiado delgadas y no ser suficiente la resolución o por otro lado, pudieron haberse perdido durante el proceso de preparación de las muestras.

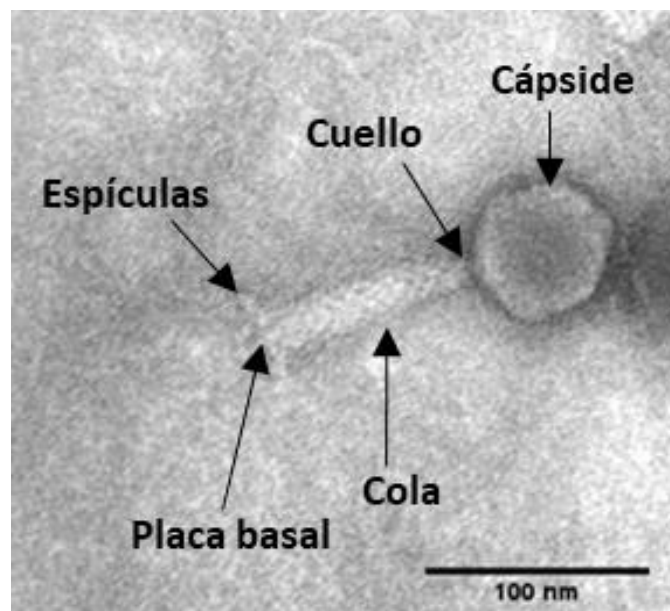


Figura 8. Componentes morfológicos del bacteriófago Φ XaF18. Se observa la cápside, el cuello y la cola, así como placa basal y espículas. Imágen tomada a 180kx en microscopio electrónico de transmisión (FEI/PHILIPS modelo Morgagni M-268) a 80 kV.

7.4. Caracterización genómica

7.4.1. Determinación de la naturaleza del material genético

Todos los genomas reportados del orden *Caudovirales* presentan ADN de doble cadena lineal (Elbreki *et al.*, 2014), por lo tanto, el bacteriófago Φ XaF18 debe presentar indudablemente estas características en su genoma.

Al tratar el material genético con la enzima DNasa esta lo degradó completamente y la enzima RNasa no lo degradó, lo cual confirmó que el material genético del bacteriófago Φ XaF18 es ADN (Figura 9).

Al tratar el ADN con la enzima S1 nucleasa (la cual corta ADN de cadena sencilla) esta no lo degradó, indicando esto que el ADN es de cadena doble, coincidiendo de esta manera con lo reportado por Elbreki *et al.* (2014) (Figura 9).

Para el caso de la enzima exonucleasa III (la cual corta ADN en sus extremos), el ADN del bacteriófago tampoco fue degradado, por lo cual se podría pensar que el ADN es circular, sin embargo, apoyado por los datos de las especificaciones de la enzima exonucleasa III (Promega) de que dicha enzima no presenta actividad en extremos salientes 3' de 4 pb o más, no se puede concluir que el genoma del fago Φ XaF18 sea circular, ya que cabe la posibilidad de que los extremos del genoma presenten esta característica, debido a que existen reportes que indican que todos los *Caudovirales* poseen genoma lineal, por lo que se sugiere que el genoma del bacteriófago Φ XaF18 es lineal (Figura 9).

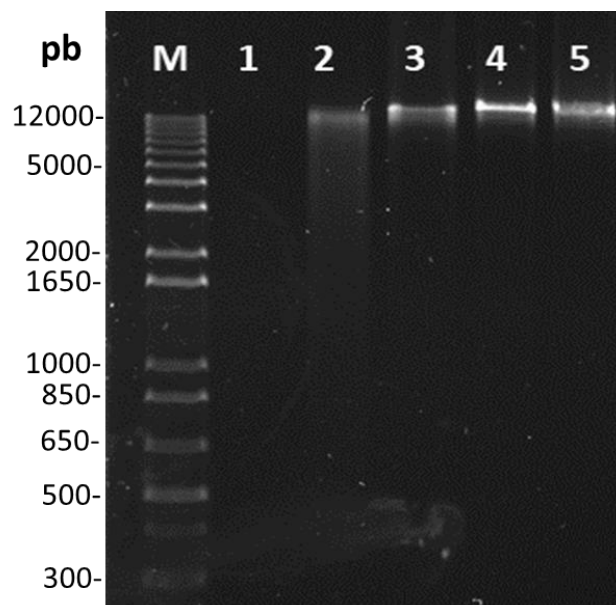


Figura 9. Digestión del material genético del bacteriófago Φ XaF18 para determinar su naturaleza. M: marcador de peso molecular (1 kb-Plus, InvitrogenTM); material genético del bacteriófago Φ XaF18 tratado con: 1: DNasa, 2: RNasa, 3: S1 nucleasa, 4:

exonucleasa III, 5: ADN sin tratamiento. Condiciones de electroforesis: agarosa al 0.7%, búfer SB (borato disódico decahidratado a pH 8.5), 80 Kv.

7.4.2. Caracterización del ADN del bacteriófago Φ XaF18 por RFLPs

En las cuatro enzimas evaluadas (*Bam*HI, *Bcl*I, *Bsp*HI y *Eco*RI), se observaron patrones de bandeo claros (Figura 10). Al comparar las restricciones *in vitro* con las restricciones *in silico*, se observó el mismo patrón de bandeo para las cuatro enzimas empleadas (Figura 11 y 12), lo cual indica que el genoma generado *in silico* es correspondiente al genoma real del bacteriófago Φ XaF18.

Al digerir con la enzima *Bam*HI se obtuvieron 7 bandas, con la *Bsp*HI fueron 13 bandas, con la enzima *Eco*RI se obtuvieron 10 bandas y con la *Bcl*I fueron 22 bandas (Figura 10).

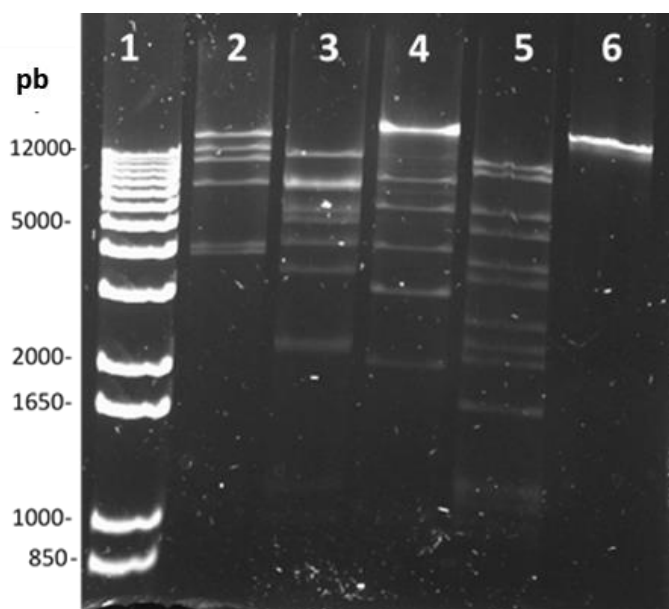


Figura 10. Perfiles de restricción del genoma del bacteriófago Φ XaF18 mediante la técnica RFLPs. 1: marcador de peso molecular (1 kb-Plus, InvitrogeTM), 2: digestión con la enzima *Bam*HI, 3: digestión con la enzima *Bsp*HI, 4: digestión con la enzima *Eco*RI, 5: digestión con la enzima *Bcl*I, 6: ADN sin digerir. Condiciones de electroforesis: agarosa al 0.7%, búfer SB (borato disódico decahidratado a pH 8.5), 80 Kv.

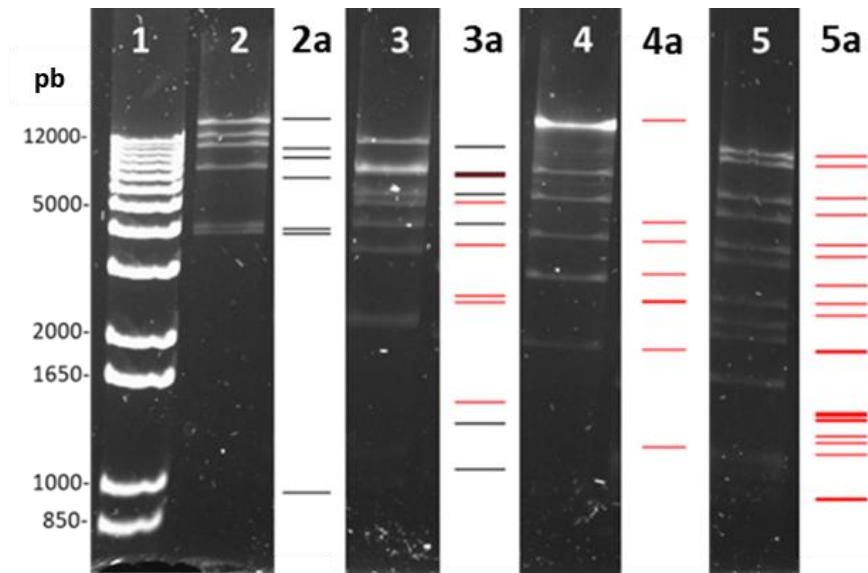


Figura 11. Comparación de los perfiles de restricción *in vitro* con los perfiles de restricción *in silico* del genoma del bacteriófago ΦXaF18 sometido a la técnica de RFLPs. 1: marcador de peso molecular (1 kb-Plus, Invitroge™), 2: digestión con la enzima *BamHI* *in vitro*, 2a: digestión con la enzima *BamHI* *in silico*, 3: digestión con la enzima *BspHI* *in vitro*, 3a: digestión con la enzima *BspHI* *in silico*, 4: digestión con la enzima *EcoRI* *in vitro*, 4a: digestión con la enzima *EcoRI* *in silico*, 5: digestión con la enzima *BclI* *in vitro*, 5a: digestión con la enzima *BclI* *in silico*. Condiciones de electroforesis: agarosa al 0.7%, búfer SB (borato disódico decahidratado a pH 8.5), 80 Kv.

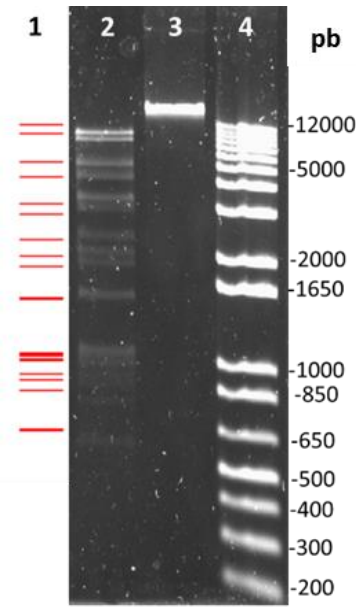


Figura 12. Comparación de los perfiles de restricción *in vitro* con los perfiles de restricción *in silico* del genoma del bacteriófago ΦXaF18 con la enzima *BclI*. 1: digestión con la enzima *BclI in silico*, 2: digestión con la enzima *BclI in vitro*, 3: ADN sin digerir, 4: marcador de peso molecular (1 kb-Plus, Invitroge™). Condiciones de electroforesis: agarosa al 0.7%, búfer SB (borato disódico decahidratado a pH 8.5), 80 Kv.

7.4.3. Secuenciación, ensamblado del genoma del bacteriófago

Una vez realizada la secuenciación y el ensamblado genómico se determinó que el bacteriófago ΦXaF18 posee un genoma de 47407 pares de bases.

La familia *Myoviridae* posee generalmente genomas grandes, por ejemplo, el genoma del fago T4 es de los genomas considerados como grandes de esta familia, con 168 kb; sin embargo, esta familia también posee en menor cantidad genomas considerados como “pequeños”, siendo estos los que poseen genomas de menos de 50 kb (Comeau *et al.*, 2012). El bacteriófago ΦXaF18 posee un genoma de 47407 pares de bases, esto lo sitúa dentro de los bacteriófagos de la familia *Myoviridae* que poseen genomas pequeños. Otros bacteriófagos de la familia *Myoviridae* poseen genomas similares, como el bacteriófago OP2, con 46643 pb (Inoue *et al.*, 2006), KPhi1 con 46077 pb (Gašić *et al.*, 2018) y varios genomas reportados por Comeau *et al.* (2012), todos entre 43.5 y 48.5 kb.

7.4.4. Ensayos de PCR para confirmar ensamblado del genoma de Φ XaF18 y para diferenciar entre bacteria y bacteriófago

Se procedió a realizar ensayos de PCR, como una herramienta para la identificación tanto de la bacteria como del bacteriófago. Para la bacteria fueron empleados oligonucleótidos previamente reportados y para el bacteriófago se realizó el diseño de oligonucleótidos específicos. En cuanto a las PCR realizadas, se obtuvo el producto esperado para todas las reacciones, tanto para las PCR de la bacteria como para las del fago.

7.4.4.1. Diseño de oligonucleótidos

Se determinaron ocho pares de oligonucleótidos para el bacteriófago Φ XaF18, los cuales fueron los que presentaron mayor estabilidad al analizarlos con Oligoanalyzer y estos no amplificaron para ningún otro organismo al realizar PCR *in silico* en Primer-BLAST (Cuadro 4).

Cuadro 4. Oligonucleótidos empleados para amplificar fragmentos a lo largo del genoma del bacteriófago Φ XaF18.

Oligonucleótidos	Secuencia	Región amplificada del genoma del Φ XaF18	Longitud del amplicón (pb)
M1F M1R	GCA GAA CGA TAG CGC AAA GG CGT AGC TGC ATT CTT CAC GC	38540-39107	568
M2F M2R	ACT CGA TTG CCA TCA CGG TT GTA AGC GTC ATC TTG CAG CG	37283-38147	865
M3F M3R	TTC CTC ATC CTC GAT GGT TC GAG TTT TCT GGC GTT GAA GC	43680-43835	156
M4F M4R	GCG GTA TTG ACG TCG TTT CG GGC GGC ATC GTA TCA GGT TA	36249-36477	229
M5F M5R	GCA CAT CAC CGG CAT GAA TC GAA CGC AAG ATG GCG ATG TC	26578-26823	246
M6F M6R	GTA CGC GAC TGC GTG ATT TC GGT CGC GGT ACA GGT CAT AG	5485-5599	115
M7F M7R	CAG TTC TGC AGT TGT GGT GC GTA CGC GTA GAC GAT GCT GA	9706-10554	849
TER1F TER1R	CAC GAT TGG AGA CCG AGA GG CGA CAG TCC GTA GTC CAT CG	232-2334	2103

7.4.4.2. PCR de la bacteria *Xanthomonas vesicatoria*

Se realizó PCR del gen *estA* (específico de *Xanthomonas vesicatoria*); y se obtuvo el fragmento de amplificación esperado según lo reportado por Lee *et al.* (2009): 777 pb (Figura 13). Confirmando de esta manera que efectivamente la bacteria empleada fue del genero *Xanthomonas*, descartando de esta manera cualquier duda al respecto a este genero.

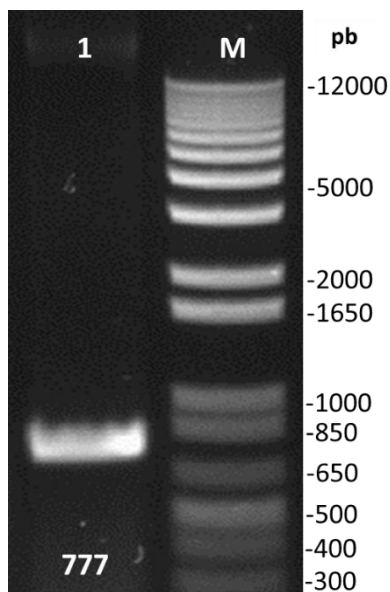


Figura 13. Amplificación del gen *estA* de la cepa BV824 de *Xanthomonas vesicatoria*. M: marcador de peso molecular (1 kb-Plus, InvitrogeTM), 1: amplificación realizada con los oligonucleótidos Xc-lip-F2 y Xc-lip-R2. Condiciones de electroforesis: agarosa al 0.7%, búfer SB (borato disódico decahidratado a pH 8.5), 80 Kv.

7.4.4.3. PCR a partir del genoma del bacteriófago Φ XaF18

Para todas las amplificaciones realizadas se obtuvieron los amplicones esperados de acuerdo con el diseño de los oligonucleótidos, obteniéndose bandas claramente distinguibles. En la Figura 14 se observan los productos de PCR con los oligonucleótidos M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7. Mientras que en la Figura 15 se muestran los resultados de la amplificación con los oligonucleótidos TER1 y M4F-M1R.

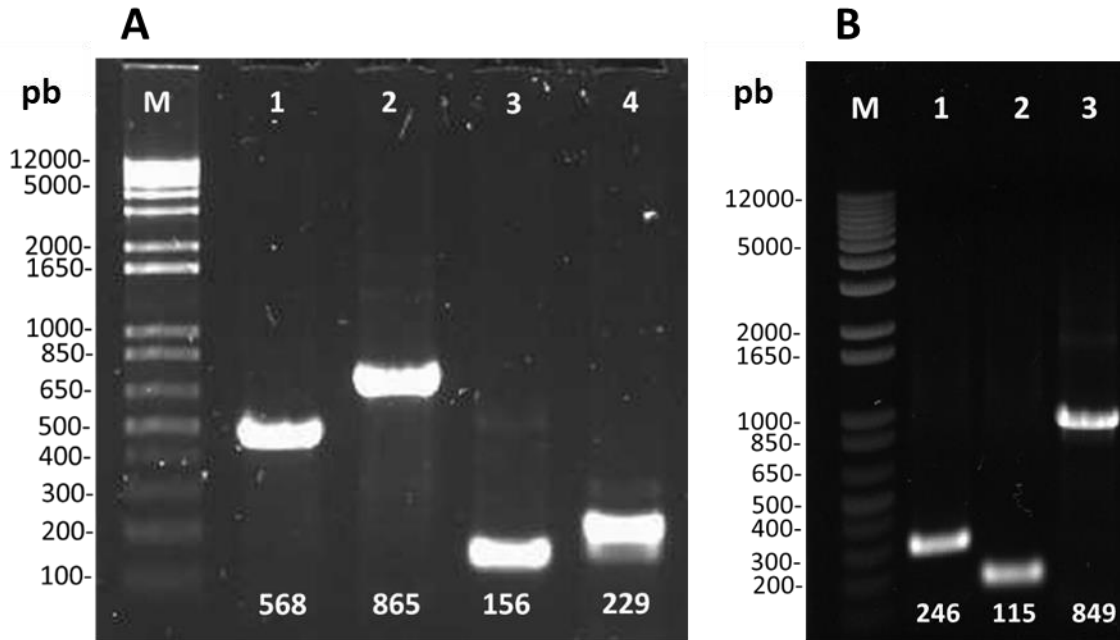


Figura 14. Amplificación específica para el bacteriófago Φ XaF18 con siete pares de oligonucleótidos. **(A)** M: marcador de peso molecular (1 kb-Plus, InvitrogenTM), 1: amplificación realizada con oligonucleótidos M1, 2: amplificación realizada con oligonucleótidos M2, 3: amplificación realizada con oligonucleótidos M3, 4: amplificación realizada con oligonucleótidos M4. **(B)** M: marcador de peso molecular, 1: amplificación realizada con oligonucleótidos M5, 2: amplificación realizada con oligonucleótidos M6, 3: amplificación realizada con oligonucleótidos M7. Condiciones de electroforesis: agarosa al 0.7%, búfer SB (borato disódico decahidratado a pH 8.5), 80 Kv.

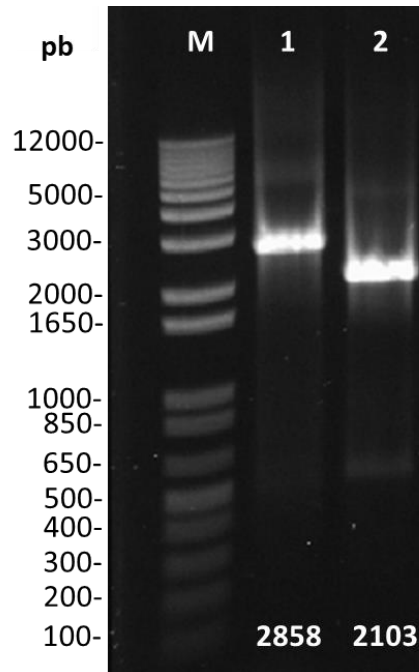


Figura 15. Amplificación específica para el bacteriófago Φ XaF18 para el gen de la terminasa y el fragmento M4F-M1R. M: marcador de peso molecular (1 kb-Plus, InvitrogeTM), 1: amplificación realizada con oligonucleótidos M4F y M1R, 2: amplificación realizada con oligonucleótidos TER1. Condiciones de electroforesis: agarosa al 0.7%, búfer SB (borato disódico decahidratado a pH 8.5), 80 Kv.

7.4.4.3.1. PCR y RFLPs del fragmento M3F-TER1R

Para la amplificación del fragmento M3F-TER1R se obtuvo el fragmento esperado de 6061 pb. Sin embargo, se obtuvo un producto inespecífico de 495 pb, por lo cual, se detectó la posición en el genoma para dicho producto inespecífico, la cual abarca de la posición 27734 a 28228 pb. Una vez determinada la región de complementariedad de los oligonucleótidos para este fragmento inespecífico se determinó que no es necesaria una coincidencia del 100% por parte de los oligonucleótidos para que se lleve a cabo la amplificación, ya que para el oligonucleótido M3F fue necesaria únicamente la complementariedad de 12 pb, mientras que para el oligonucleótido TER1R fue de 11 pb para generar este fragmento inespecífico.

Se procedió a purificar ambos amplicones por separado, el esperado de 6061 pb y el inespecífico de 495 pb (Figura 16), así como a realizar RFLPs por separado. En la Figura 17 se muestra el resultado de los RFLPs para ambos casos.

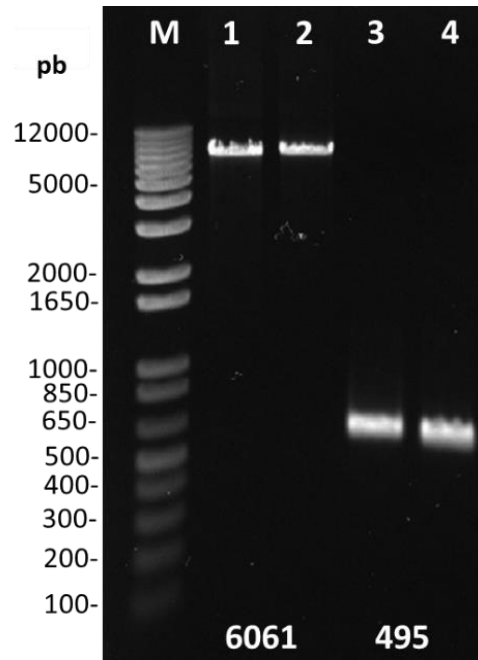


Figura 16. Amplificación y purificación para el bacteriófago Φ XaF18 con los oligonucleótidos M3F-TER1R. M: marcador de peso molecular (1 kb-Plus, InvitrogeTM), 1 y 2: réplicas del amplicon esperado de 6061 pb, 3 y 4: réplicas del amplicon inespecífico de 495 pb. Condiciones de electroforesis: agarosa al 0.7%, búfer SB (borato disódico decahidratado a pH 8.5), 80 Kv.

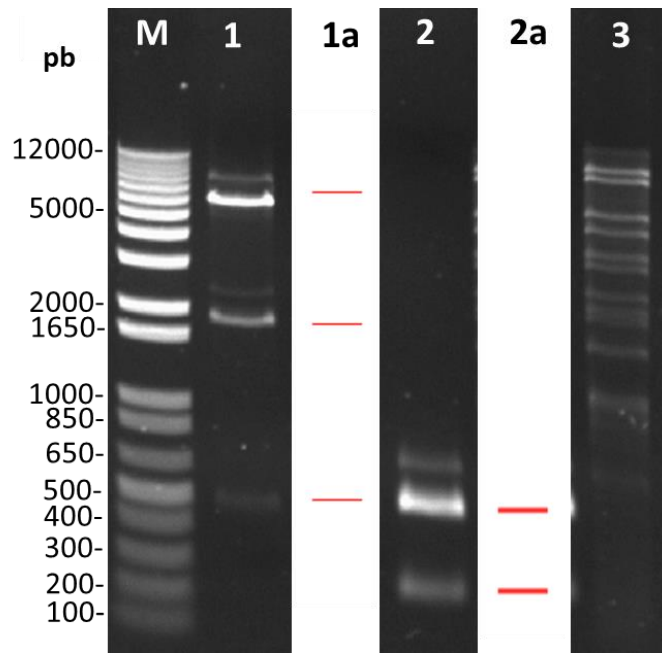


Figura 17. Comparación de los perfiles de restricción *in vitro* con los perfiles de restricción *in silico* de los fragmentos del genoma del bacteriófago ΦXaF18 obtenidos con los oligonucleótidos M3F-TER1R, con la enzima *BclI*. M: marcador de peso molecular (1 kb-Plus, Invitrogen™), 1: digestión *in vitro* del fragmento mayor (6061 pb), 1a: digestión *in silico* del fragmento mayor (6061 pb), 2: digestión *in vitro* del fragmento menor (495 pb), 2a: digestión *in silico* del fragmento menor (495 pb), 3: digestión del genoma completo con la enzima *BclI*. Condiciones de electroforesis: agarosa al 0.7%, búfer SB (borato disódico decahidratado a pH 8.5), 80 Kv.

Los resultados mostraron una coincidencia de las bandas generadas *in vitro* con las bandas esperadas *in silico*, sin embargo, se obtuvieron otras bandas no esperadas para ambos casos, esto se puede explicar debido a que la enzima no degradó completamente estos fragmentos, probablemente porque la cantidad empleada no fue suficiente o bien, por pérdida de actividad debido a la degradación de esta. Por consiguiente, se esperaba para el fragmento de 6061 pb tres bandas, una de 4330 pb, otra de 1383 pb y una más de 349 pb, no obstante, se obtuvieron dos bandas más, una superior al fragmento de 4330 pb que corresponde al fragmento de 6061 pb no degradado y, otra superior al fragmento de 1383 pb, de 1732 pb correspondiente a la suma del fragmento de 1383 pb más el de 349 pb. Para el fragmento de 495 pb se esperaban dos bandas, una de 314 pb y otra de 181 pb, y fue obtenida una banda correspondiente al fragmento de 494

pb sin degradar (Figura 17), a pesar de esto se pudo constatar que el fragmento de PCR amplificado y digerido corresponde al fragmento esperado.

En conjunto, los ensayos de RFLPs y las PCR son pruebas de que el genoma del bacteriófago Φ XaF18 fue correctamente ensamblado, dado que los resultados *in vitro* coincidieron con los resultados *in silico* en el genoma ensamblado.

7.4.5. Análisis bioinformático

7.4.5.1. Marcos abiertos de lectura (ORF)

Al realizar la búsqueda de marcos abiertos de lectura (ORF) se obtuvieron distintos dependiendo del programa o servidor empleado (Cuadro 5), todos ellos fueron anotados en el genoma para posteriormente ser comparados con bases de datos y determinar si fueron o no codificantes.

Se determinó que el genoma presentó 67 marcos abiertos de lectura (ORF), de los cuales 17 poseen función determinada, ya que presentaron homología con genes reportados en la base de datos del NCBI, que son codificantes para proteínas. El genoma posee 63% de contenido G+C y 91.2% de la totalidad del genoma es codificante. En el Cuadro 6 se presentan de manera detallada las características principales de cada ORF.

En la Figura 18 se muestra el genoma del bacteriófago Φ XaF18, el cual se pueden observar los 67 marcos abiertos de lectura y cuatro regiones de acuerdo con la dirección de la transcripción.

Cuadro 5. Marcos abiertos de lectura (ORF) obtenidos en el genoma del bacteriófago Φ XaF18 mediante distintos programas de predicción de ORF *in silico* empleados.

Programa/servidor empleado	Marcos abiertos de lectura (ORFs) predichos
Basys	84
Easygene	53
Orffinder (NCBI)	111
Phanotate	82
Phaster	72
Orf finder (SMS)	169
CONSENSO	67

Cuadro 6. Características de los marcos abiertos de lectura (ORFs) predichos en el genoma del bacteriófago ΦXaF18.

Secuencia codificante	Hebra de ADN	Posición		Longitud (amino ácidos)	Tamaño proteína (kDa)	Función predicha de la proteína	Homología con proteínas en base de datos	Porcentaje de identidad	Valor-E
		Inicio	Termino						
ORF 1	+	77	562	161	17.2	Proteína anti-TRAP (AT)	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453631.1)	79	1 e- 75
ORF 2	+	559	2025	488	53.4	Terminasa subunidad mayor	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41906.1)	99	0
ORF 3	+	2074	3708	544	59.7	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453629.1)	74	0
ORF 4	+	3749	4567	272	30.3	Proteína de cápside	<i>Xanthomonas</i> phage XPV2 (AVO24257.1)	69	5 e- 144
ORF 5	+	4604	5335	243	27.0	Proteína hipotética	<i>Bacillus cereus</i> (SCC62096.1)	31	2 e- 35
ORF 6	+	5410	6549	379	40.4	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453627.1)	68	3 e- 160
ORF 7	+	6565	7098	177	17.7	Proteína estructural	<i>Xanthomonas</i> phage XPP1 (AVO23666.1)	75	1 e- 80
ORF 8	+	7127	8143	338	36.5	Proteína de cápside y andamiaje	<i>Xanthomonas</i> phage XPP1 (AVO23667.1)	77	0
ORF 9	-	8505	8269	78	8.8	Proteína hipotética	-		
ORF 10	+	8586	9056	156	16.9	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453624.1)	73	2 e- 67
ORF 11	+	9070	9573	167	17.6	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453623.1)	71	6 e- 83
ORF 12	+	9570	9830	86	9.4	Proteína hipotética	-		
ORF 13	+	9827	10336	169	18.6	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage XPV1 (AVO24225.1)	73	1 e- 82
ORF 14	+	10333	10779	148	16.3	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453621.1)	53	3 e- 45
ORF 15	+	10779	11309	176	19.7	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41894.1)	100	1 e- 131
ORF 16	+	11334	12818	494	51.5	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41893.1)	99	0

ORF 17	+	12831	13265	144	15.7	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453618.1)	74	1 e- 76
ORF 18	-	14481	13618	287	30.9	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41890.1)	99	0
ORF 19	-	14815	14498	105	12.0	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41889.1)	98	1 e- 75
ORF 20	-	15249	14815	144	16.7	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41888.1)	99	1 e- 108
ORF 21	-	15437	15246	63	7.0	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41887.1)	100	1 e- 44
ORF 22	-	17583	15613	656	72.8	ADN polimerasa I	<i>Xanthomonas</i> phage XPP1 (AVO23686.1)	76	0
ORF 23	-	18245	17922	107	11.9	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41883.1)	99	9 e- 80
ORF 24	-	18448	18245	67	6.8	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41882.1)	98	1 e- 43
ORF 25	-	20337	18517	606	67.9	Helicasa	<i>Xanthomonas</i> phage XPV1 (AVO24167.1)	83	0
ORF 26	-	20855	20580	91	10.4	Proteína hipotética	-		
ORF 27	-	20962	20852	36	3.9	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41880.1)	91	3 e- 21
ORF 28	-	21249	21046	67	8.3	Proteína hipotética	-		
ORF 29	-	21958	21572	128	13.9	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage XPP8 (AVO24072.1)	63	3 e- 45
ORF 30	-	23164	22130	344	36.6	Metiltransferasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (WP_086250819.1)	58	7 e- 106
ORF 31	-	23387	23229	52	5.7	Proteína hipotética	-		
ORF 32	-	23624	23499	41	4.3	Proteína hipotética	-		
ORF 33	-	24044	23778	88	9.4	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41944.1)	98	1 e- 63
ORF 34	-	24223	24044	59	6.8	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41943.1)	100	3 e- 41
ORF 35	-	24684	24220	154	17.0	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41942.1)	98	5 e- 115

ORF 36	-	25192	24887	101	11.5	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41940.1)	99	6 e- 75
ORF 37	-	26050	25196	284	29.6	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41939.1)	100	0
ORF 38	-	28608	26125	827	91.1	Proteína asociada a virulencia (familia E)	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41938.1)	99	0
ORF 39	-	28956	28636	106	11.9	Proteína hipotética	-		
ORF 40	+	29249	29632	127	13.6	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage XPV1 (AVO24187.1)	76	7 e- 67
ORF 41	+	29629	30042	137	14.2	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41936.1)	100	3 e- 97
ORF 42	+	30110	30829	239	23.3	Proteína de fibra de la cola	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453655.1)	77	8 e- 34
ORF 43	+	30950	31489	179	19.1	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41934.1)	100	4 e- 131
ORF 44	+	31462	31839	125	14.2	Proteína hipotética	<i>Vibrio</i> phage vB VpaM MAR (YP_007112532.1)	54	5 e- 44
ORF 45	+	31836	32234	132	14.5	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453653.1)	78	4 e- 70
ORF 46	+	32238	32903	221	23.7	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41931.1)	100	3 e- 162
ORF 47	+	32907	34742	611	65.5	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453651.1)	48	3 e- 162
ORF 48	+	34739	35635	298	32.3	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41929.1)	100	0
ORF 49	+	35637	35858	73	8.3	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41928.1)	100	4 e- 52
ORF 50	+	35855	36520	221	22.8	Proteína de placa basal	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453648.1)	72	9 e- 92
ORF 51	+	36538	37806	422	42.9	Proteína de placa basal	j-like protein of <i>Myoviridae</i> sp. (AXH72293.1)	37	6 e- 52

ORF 52	+	37806	38486	226	25.4	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41925.1)	99	9 e- 172
ORF 53	+	38496	39920	474	44.3	Proteína de fibra de la cola	<i>Burkholderia</i> virus BcepNY3 (YP_001294868.1)	57	5 e- 73
ORF 54	-	40449	39952	165	18.6	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41923.1)	98	4 e- 122
ORF 55	-	40660	40439	73	7.9	Proteína hipotética	-		
ORF 56	-	41181	40657	174	19.0	Lisozima	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_112524.1)	75	2 e- 86
ORF 57	-	41945	41604	113	12.1	Proteína hipotética	-		
ORF 58	-	42064	41942	109	12.6	Regulador transcripcional de unión a ADN	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41919.1)	100	9 e- 26
ORF 59	-	42697	42287	128	14.0	Resolvasa	<i>Xanthomonas</i> phage XPV1 (AVO24208.1)	71	1 e- 51
ORF 60	-	43326	42784	180	20.4	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453635.1)	45	7 e- 27
ORF 61	-	43952	43323	209	23.5	Proteína hipotética	<i>Vibrio</i> phage vB VpaM MAR (YP_007112510.1)	37	3 e- 20
ORF 62	-	44385	43945	146	16.1	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41915.1)	98	2 e- 89
ORF 63	-	45001	44363	212	22.4	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage OP2 (YP_453634.1)	44	1 e- 38
ORF 64	-	45493	45074	139	15.3	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41912.1)	100	7 e- 102
ORF 65	-	45710	45477	77	8.6	Proteína hipotética	<i>Xanthomonas</i> phage KPhi1 (APQ41911.1)	100	2 e- 53
ORF 66	-	45934	45707	75	8.0	Proteína hipotética	-		
ORF 67	-	47244	45931	437	48.0	Endonucleasa	<i>Ralstonia</i> phage DU_RP_II (ASN73066.1)	27	3 e- 10

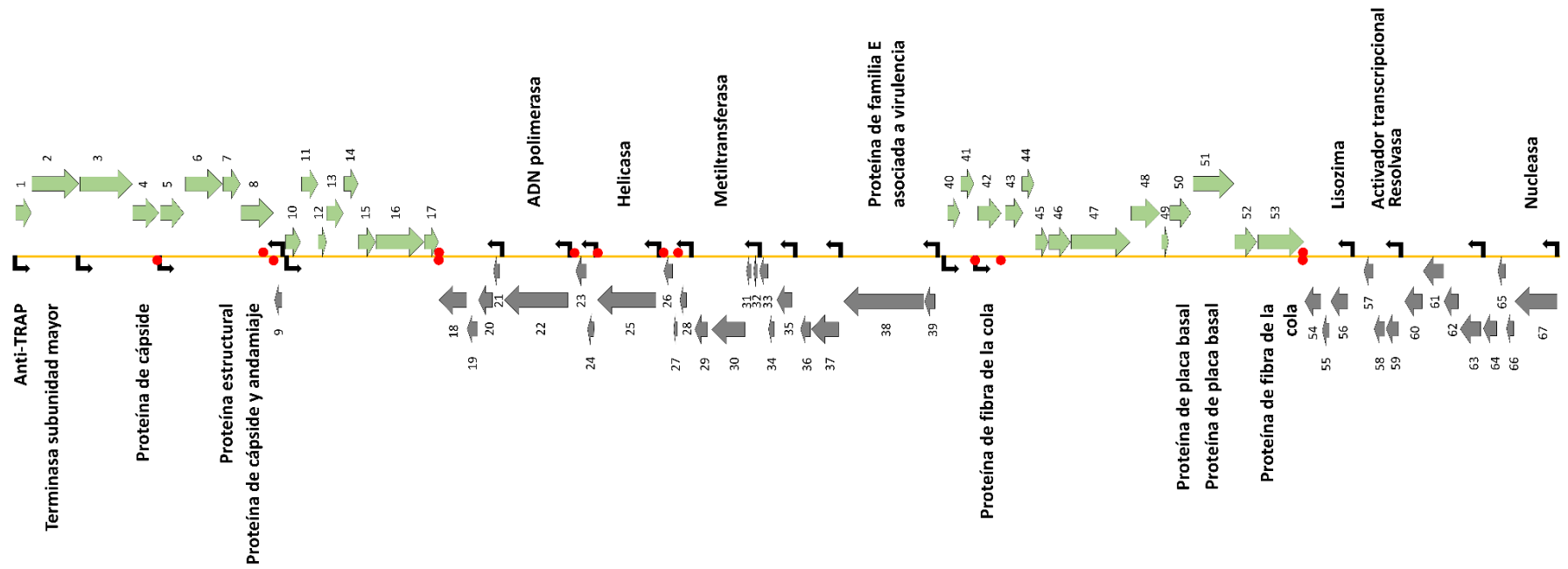


Figura 18. Mapa genómico del bacteriófago Φ XaF18. El genoma posee 67 marcos abiertos de lectura (ORF). Las flechas verdes representan genes con dirección de transcripción en la hebra sentido, las flechas grises representan genes con dirección de transcripción en la hebra anti-sentido, las flechas negras indican regiones promotoras y los puntos rojos indican terminadores rho-independientes. Los nombres anotados en los ORF son las funciones predichas. Los ORF están numerados de acuerdo a un inicio asignado arbitrariamente.

7.4.5.2. Módulos funcionales

Los genomas de los bacteriófagos pueden ser divididos en varios módulos funcionales, revelando una aparente estructura de mosaico, que es una característica de los genomas de fagos. Esto sugiere que los genomas de fagos de cola evolucionaron de combinaciones de módulos de diferentes especies (Lu *et al.*, 2013). Lo anterior concuerda con el genoma del bacteriófago del presente estudio, el cual, efectivamente se encuentra dividido en cuatro módulos claramente distinguibles según el análisis bioinformático. Existen reportes de bacteriófagos que comparten esta característica de presentar el genoma dividido en unidades transcripcionales, entre ellos fagos de *Xanthomonas* y *Lactobacillus*, quienes interesantemente poseen también cuatro módulos (Ahern *et al.*, 2014; Casey *et al.*, 2014).

El genoma del bacteriófago Φ XaF18 se divide en cuatro módulos funcionales: el primero y el tercer módulo son estructurales, sin embargo, están divididos según el destino final de la proteína, de esta manera se tiene que el primer módulo posee el gen codificante para la proteína terminasa subunidad mayor, así como genes codificantes para proteínas estructurales de cápside; mientras que el tercer módulo posee genes implicados en la estructura de cola y de la base; el segundo módulo posee los genes codificantes para la ADN polimerasa, helicasa, ADN metilasa, lo cual indica que en este módulo se agrupan los genes implicados en la replicación; y el cuarto módulo es de metabolismo, presenta genes codificantes para la lisozima, un regulador transcripcional, resolvasa y nucleasa. El primero y el tercer módulo se encuentran en la hebra sentido, mientras que el segundo y el cuarto módulo presentan la dirección de la transcripción en la hebra anti-sentido.

El hecho de poseer el genoma dividido en módulos sustenta la transferencia horizontal de genes en los genomas de bacteriófagos, ya que se observa claramente correspondencia en distintos genomas en las mismas regiones. Ackermann (2009) reporta que esta transferencia horizontal de genes se ha dado en gran medida durante la evolución de los fagos, siendo los fagos de cola en particular entidades que parecen una red, un complejo reticulado con patrones cruzados de relaciones. Weigel y Seitz (2006) reportan que se puede reconocer el módulo de replicación sometiendo el genoma del bacteriófago a una búsqueda de homología en las bases de datos

disponibles; siendo esto aplicable para todos los módulos; a su vez, cuando se tiene el módulo detectado se puede inferir la función de proteínas de función desconocida que se encuentren dentro de dicho módulo. Los módulos pueden ser asignados a distintas categorías, por ejemplo, de adsorción, replicación, regulación, recombinación, cápside, cola, entre otros (Lima-Méndez *et al.*, 2011).

7.4.5.2.1. Módulos estructurales

El genoma del bacteriófago Φ XaF18 posee dos módulos estructurales, uno conteniendo genes implicados en la morfogénesis de la cápside y otro con genes correspondientes a la morfogénesis de la cola; esta organización de los genes estructurales divididos en dos módulos es reportado también por Comeau *et al.* (2012). En el primer módulo, junto con las proteínas de cápside se encuentra el gen de la proteína terminasa subunidad mayor. Esto concuerda con lo reportado por varios autores, quienes mencionan que este módulo posee proteínas de cápside y andamiaje y que el gen de la terminasa se encuentra río arriba de las proteínas estructurales, además, la proteína portal (componente de la cápside a través de la cual se transloca el ADN al interior de la cápside) también puede estar presente en este módulo (Lu *et al.*, 2013; Comeau *et al.*, 2012; Lima-Méndez *et al.*, 2011). En el segundo módulo estructural, se encuentran las proteínas de fibra de la cola, así como proteínas de placa basal, tal como lo reporta Comeau *et al.* (2012).

7.4.5.2.1.1. Módulo estructural de cápside

En el primer módulo se logró predecir la función de cinco genes. El ORF 1 mostró similitud con una proteína hipotética del fago de *Xanthomonas* OP2, con una identidad del 79%, sin embargo, presentó el dominio de la súper familia anti-TRAP, por lo cual se le asignó dicha función. La proteína anti-TRAP, está involucrada en el metabolismo del triptófano. El triptófano es importante por ser precursor de una gran cantidad de compuestos microbianos (Alkhalaf y Ryan, 2015). La proteína TRAP activada por triptófano regula negativamente la expresión de genes involucrados en el metabolismo del triptófano, promoviendo la terminación de la transcripción o bloqueando la iniciación de la traducción. Por el contrario, anti-TRAP (AT), forma un complejo con TRAP e inhibe su actividad (Valbuzzi *et al.*, 2002).

El ORF número 2 se identificó como la terminasa subunidad mayor, presentó similitud con la terminasa del fago de *Xanthomonas* KPhi1 (identidad= 99%), además, presentó el dominio correspondiente a la terminasa. La proteína terminasa subunidad mayor está implicada en el empaquetamiento del ADN. El complejo de empaquetamiento está formado por tres proteínas, la proteína portal localizada en un vértice de la cápside, la terminasa subunidad mayor y la terminasa subunidad menor. El empaquetamiento inicia cuando la terminasa subunidad menor reconoce el ADN viral y lo lleva a la terminasa subunidad mayor, la cual se encarga de la translocación del ADN al interior de la cápside a través de la proteína portal, una vez terminado el empaquetamiento el ADN es nuevamente cortado para terminar el empaquetamiento y el ADN restante es transferido a una nueva procápside vacía. La secuencia de la proteína terminasa subunidad mayor está altamente conservada, por lo que representa una excelente opción para realizar análisis filogenéticos (Kanamaru *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2012).

En cuanto a los ORFs 4, 7 y 8, estos fueron identificados como genes estructurales correspondientes a proteínas de cápside y andamiaje involucradas en la morfogénesis de la cápside, la cual tiene como función contener al ADN en su interior una vez ensambladas las partículas virales. El ORF 4 corresponde a una proteína de cápside, ya que mostró similitud con una proteína de cápside del fago de *Xanthomonas* XPV2 (identidad= 69%). Al ORF 7, se le asignó la función de proteína estructural, presentando una identidad del 75% con una proteína estructural menor del fago de *Xanthomonas* XPP1. Y por último, el ORF número 8 corresponde a una proteína de cápside y andamiaje, con una identidad del 77% con la proteína de cápside y andamiaje del fago de *Xanthomonas* XPP1.

7.4.5.2.1.2. Módulo estructural de cola

En el tercer módulo se predijo la función de cuatro genes, todos ellos estructurales. Los ORFs 42 y 53 corresponden a proteínas de fibra de la cola, debido a que presentaron similitud con proteínas de fibra de la cola del fago de *Xanthomonas* OP2 (identidad= 77%) para el primer caso y del fago de *Burkholderia* BcepNY3 (identidad= 57%) para el segundo caso. Los ORFs 50 y 51 fueron identificados como proteínas de placa basal, con una identidad del 72% con una proteína del fago de *Xanthomonas* OP2 y 37% con *Myoviridae* sp., respectivamente; además, ambos genes poseen dominio conservado de la misma función. Tanto las proteínas de fibra de

la cola, como las proteínas de la placa basal, juegan papeles clave en el proceso de adsorción, el primer paso del ciclo de replicación. Este proceso puede variar notoriamente entre grupos de fagos. En *Myoviridae*, las fibras de la cola unidas a la placa basal se unen a un receptor primario de manera reversible, esta unión causa un cambio conformacional en la placa basal y esta se une de manera irreversible a un receptor secundario (lipopolisacáridos, lipoproteínas, flagelos, entre otros), esto a su vez ocasiona la contracción de la cola para que se lleve a cabo la inyección del genoma (Letarov y Kulikov, 2017; Li *et al.*, 2016).

7.4.5.2.2. Módulos de replicación/metabolismo

La replicación de muchos genomas de fagos requiere pasos de recombinación para proveer las formas relinealizadas que son el substrato para el empaquetamiento dentro de las cápsides, por consiguiente, existe una notable co-localización de genes de replicación y recombinación en muchos genomas de fagos (Weigel y Seitz, 2006), algunos bacteriófagos poseen en un solo módulo, proteínas que abarcan gran parte de estas funciones, como son replicación de ADN, recombinación y reparación, expresión de genes y metabolismo (Lima-Méndez *et al.*, 2011). Sin embargo, en el bacteriófago Φ XaF18 estas funciones se encuentran divididas en el genoma, dando lugar a dos módulos, uno de replicación y otro de metabolismo. No obstante, se puede observar cierta relación entre estos dos módulos, ya que presentan la misma dirección de la transcripción, encontrándose ambos en la hebra anti-sentido, de la misma manera que los dos módulos funcionales comparten la misma dirección de transcripción, en la hebra sentido.

7.4.5.2.2.1. Módulo de replicación

El segundo módulo posee cuatro genes predichos. El ORF 22 fue anotado como ADN polimerasa, ya que presentó identidad del 76% con la proteína ADN polimerasa I del fago de *Xanthomonas* XPP1, además de poseer el dominio conservado para dicha proteína. La función de las ADN polimerasas es la replicación del genoma para asegurar el mantenimiento y la transmisión de la información genética a través de las generaciones. Existen reportadas más de 40 diferentes ADN polimerasas, y han sido clasificadas en dos principales grupos: la ADN polimerasa tipo I (de *E. coli*) y ADN polimerasa eucariótica tipo alfa. Al principio se creía que la polimerasa I era la principal polimerasa en la replicación, sin embargo, está ahora claro que su función está relacionada con la reparación del ADN y la maduración de los fragmentos de

Okazaki. No obstante, a pesar de que en bacterias solo tienen este rol en la replicación, en otros organismos lleva a cabo la mayor parte de la replicación genómica, como es el caso de polimerasas de bacteriófagos como el T7 (Garcia-Diaz y Bebenek 2007; Ito y Braithwaite, 1991; Doublet y Ellenberger, 1998).

El ORF 25 se identificó como helicasa, con el 83% de identidad con la proteína ADN helicasa del fago de *Xanthomonas* XPV1. Las helicasas se encuentran en virus, bacterias y eucariotas. Utilizan la energía del ATP para romper los puentes de H de la doble hélice de ADN. Al hacer esto, las helicasas permiten el acceso a la información genética, estas participan en varios aspectos del metabolismo de los ácidos nucleicos, como la replicación del ADN, recombinación, reparación, transcripción, traducción y corte y empalme de transcritos de ARN (Raney *et al.*, 2013). Las ARN y ADN helicasas están cercanamente relacionadas y se encuentran clasificadas en seis superfamilias, algunas de las cuales poseen tanto ARN como ADN helicasas (Jankowsky, 2011).

El ORF número 30 corresponde a una metiltransferasa, éste mostró similitud con una proteína ADN citosina metiltransferasa de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (identidad= 58%), y presentó dominio conservado para la misma función. Esta enzima se encarga de la metilación de bases, la cual puede modular la interacción de las proteínas de unión a ADN, y controlar la replicación del cromosoma, corrección de errores del ADN, transcripción y formación de linajes epigenéticos. La metilación de bases involucra la transferencia de un grupo metilo de S-adenosil-metionina al ADN en sitios específicos. La mayoría de las metiltransferasas son parte de un sistema de restricción-modificación, en el cual la metiltransferasa se encarga de prevenir la degradación del ADN por una endonucleasa que reconoce el mismo sitio (Sánchez-Romero *et al.*, 2015), de esta manera, una bacteria infectada por un bacteriófago puede defenderse de la invasión, ya que el genoma viral no se encuentra metilado y es degradado por la endonucleasa (Adams y Burdon, 1985). Sin embargo, algunos bacteriófagos también poseen la capacidad de metilar su genoma y de esta manera evadir los mecanismos de defensa bacterianos.

En cuanto al ORF 38, fue identificado como una proteína asociada a virulencia de la familia E, con una identidad del 99% con la proteína asociada a virulencia de la familia E del fago de

Xanthomonas KPhi1 y también presentó el dominio conservado de esta familia de proteínas. Esta proteína esta reportada, como su nombre lo indica, por conferir virulencia en *Streptococcus suis* (Ji *et al.*, 2016).

7.4.5.2.2.2. Módulo de metabolismo

En el último módulo se predijo la función de 4 genes. El ORF 56 se identificó como una lisozima, presentó similitud con una enzima lítica del fago de *Xanthomonas* OP2 (identidad= 75%), además, presentó el dominio conservado de la superfamilia lisozima. La función de esta enzima en el ciclo lítico es iniciar la fase extracelular liberando los viriones del huésped bacteriano al lisar la pared celular. Aunque la lisozima funciona fuera de la membrana citoplasmática, no es una proteína secretada, es sintetizada sin una secuencia señal. Las holinas, son las encargadas de romper la membrana celular permitiéndole a la lisozima tener acceso a la pared celular (Poteete y Hardy, 1994; Wang, 2006).

El ORF 58 presentó similitud con la proteína LuxR del fago de *Xanthomonas* KPhi1 (identidad= 100%), así como el dominio conservado de la familia LuxR, y ya que las proteínas pertenecientes a este grupo son reguladores transcripcionales, se le asignó la función de regulador transcripcional de unión a ADN. Estos reguladores juegan un papel importante en Quorum sensing (QS), coordinando la expresión de varios genes, incluyendo aquellos que codifican factores de virulencia, biosíntesis de antibióticos, motilidad, modulación, transferencia de plásmidos, bioluminiscencia y formación de biopelícula (Chen y Xie, 2011).

El ORF 59 corresponde a una proteína resolvasa, mostró una identidad del 70% con una proteína resolvasa del fago de *Xanthomonas* XPV1, así como dominio conservado de la superfamilia RusA. La recombinación homóloga del ADN es una fuente de diversidad genética y un importante mecanismo de reparación, tanto en procariontas como en eucariotas. Durante este proceso se forma un intermediario de ADN llamado Holliday junction (HJ) que comprende un punto de entrecruzamiento con cuatro brazos de ADN dúplex. La disociación del HJ para volver a separar el ADN es un paso crítico en el proceso de recombinación. Este proceso se lleva a cabo por endonucleasas llamadas resolvasas que reconocen el HJ y cortan el ADN. La resolvasa RusA es encontrada en muchas bacterias, incluyendo *E. coli* (Macmaster *et al.*, 2006).

El ORF 67 fue identificado como una proteína endonucleasa, ya que presentó similitud con la superfamilia de proteínas nucleasa PD-(D/E)XK del fago de *Ralstonia* DU_RP_II (identidad=27%), y presentó dominio conservado de la proteína Cas4 asociada a CRISPR. Las PD-(D/E)XK nucleasas, constituyen una superfamilia de enzimas que están involucradas en numerosos eventos de corte de ADN en varios procesos celulares, por ejemplo, reparación de ADN dañado, eventos adicionales de corte en recombinación además de la disociación de HJ y protección contra ADN invasor (Knizewski *et al.*, 2007). Por otro lado, la proteína Cas4 asociada a CRISPR, presenta también actividad nucleasa (Haft *et al.*, 2005). El sistema CRISPR-Cas actúa por integración de secuencias pequeñas de virus en el locus CRISPR, permitiendo a la célula bacteriana recordar, reconocer y actuar contra infecciones virales (Rath *et al.*, 2015).

7.4.5.3. Predicción de secuencias funcionales

Se encontraron 20 secuencias promotoras hipotéticas y 13 secuencias terminadoras rho-independientes hipotéticas (Figura 18).

En cuanto a los ARNs de transferencia y ribosomales, no fueron encontrados en ninguno de los dos casos.

7.4.5.4. Empaquetamiento del genoma viral y tipo de extremos

Los fagos que usan el mecanismo de cápside llena típicamente generan un concatámero con varias copias de su genoma, durante el empaquetamiento se hace un primer corte en el sitio *pac*, pero los siguientes cortes son hechos cuando la cápside del fago está llena, teniendo posiciones variables, en el caso de la mayoría de los fagos de cápside llena existe la presencia de términos secundarios, esto sucede cuando el sitio de corte por la terminasa en el sitio *pac* no es preciso. Otros fagos empaquetan su genoma a través del mecanismo de empaquetamiento de cápside llena, pero sin señales de empaquetamiento, estos genomas son circularmente permutados con términos aleatorios y redundantes, tal es el caso de los bacteriófagos T4, PaP1 y OP2 (Garneau *et al.*, 2017; Sechaud *et al.*, 1965; Inoue *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2013), todos los cuales pertenecen a la familia *Myoviridae*, lo que sugiere que esta característica es propia de dicha familia. Los resultados del análisis del genoma en el programa PhageTerm indicaron que el genoma del

bacteriófago Φ XaF18 es circularmente permutado con extremos redundantes, los cuales son usados para circularizar el genoma del fago, no se detectó un sitio específico (sitio *pac*) que es reconocido por la terminasa para iniciar el empaquetamiento, esto indica que posee el mismo tipo de empaquetamiento que el bacteriófago T4. La orientación del empaquetamiento es en la hebra sentido por poseer está el mayor pico.

7.4.5.5. Análisis filogenético

Además de los resultados obtenidos en el análisis microscópico, el análisis filogenético realizado con la secuencia de ADN del gen de la terminasa subunidad mayor confirmó la pertenencia del fago Φ XaF18 al orden *Caudovirales* y a la familia *Myoviridae*, ya que se sitúa cerca de los fagos de tipo-T4, y siendo el fago T4 un miembro representativo de este orden, aunado al análisis morfológico, se puede concluir que el fago Φ XaF18 pertenece a los *Caudovirales* (Figura 19).

Una vez determinado esto, se realizó un análisis filogenético para analizar la relación de Φ XaF18 dentro de la familia *Myoviridae*, y se encontró que este se encuentra estrechamente relacionado con los fagos de *Xanthomonas* OP2 y KPhi1, así como con ciertos bacteriófagos de *Burkholderia* (Figura 20).

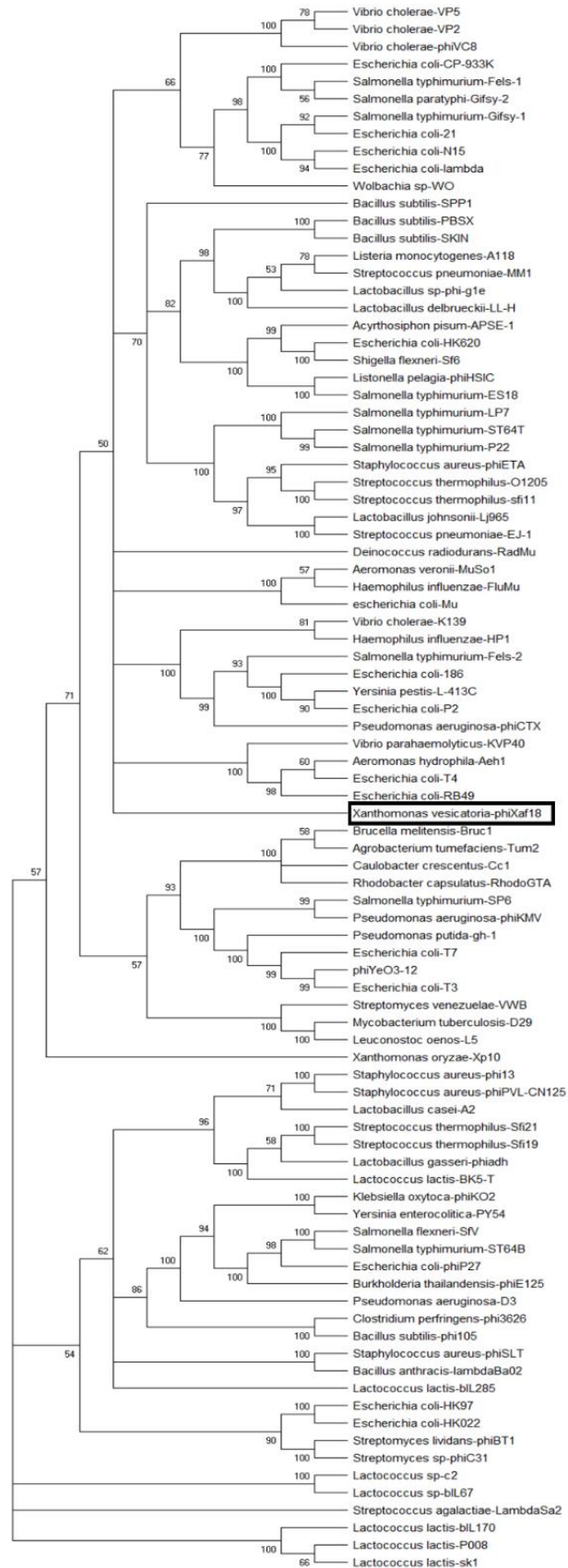
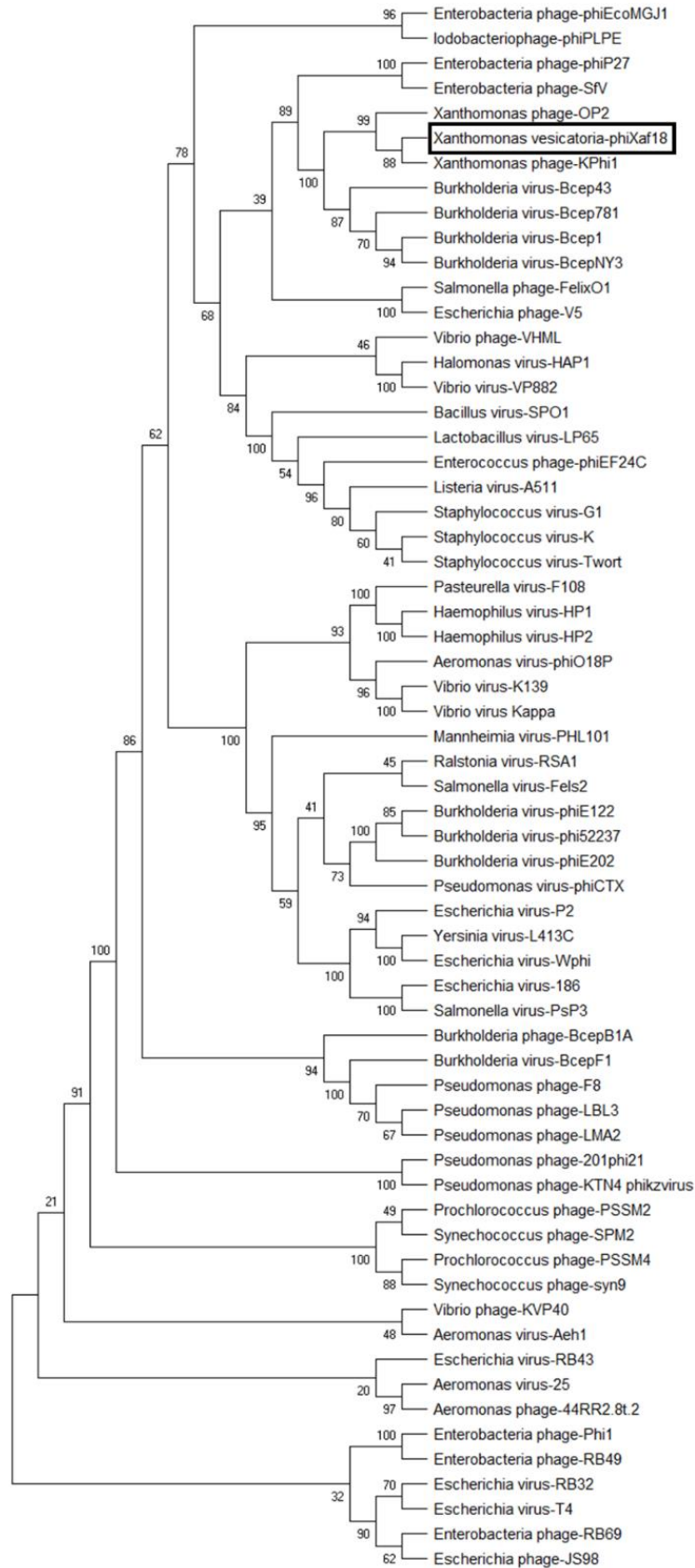


Figura 19. (Página anterior) Árbol filogenético realizado con secuencia de aminoácidos de la terminasa subunidad mayor del bacteriófago Φ XaF18 y de otras secuencias de terminasas de bacteriófagos del orden *Caudovirales*. Parámetros Clustal X 2.1: extensión de hueco de 0.8, distancia de separación de hueco de 5. Parámetros MEGA7: distribución gamma de 10 y 1000 réplicas de bootstrap. El recuadro indica la posición del bacteriofago Φ XaF18.

Figura 20. (Página siguiente) Árbol filogenético realizado con secuencia de aminoácidos de la terminasa subunidad mayor del bacteriófago Φ XaF18 y de otras secuencias de terminasas de bacteriófagos de la familia *Myoviridae*. Parámetros Clustal X 2.1: extensión de hueco de 1.0, distancia de separación de hueco de 5. Parámetros MEGA7: distribución gamma de 10 y 1000 réplicas de bootstrap. El recuadro indica la posición del bacteriofago Φ XaF18.



7.4.5.6. Análisis comparativo de genomas de bacteriófagos de *Xanthomonas*

Al realizar análisis mediante BLASTn para el genoma completo del bacteriófago Φ XaF18, se encontró que presentó gran similitud con el bacteriófago KPhi1, además el BLASTx realizado con cada ORF para detectar proteínas codificantes corrobora esta estrecha relación. Los valores del alineamiento del bacteriófago Φ XaF18 con el bacteriófago KPhi1 fueron 98% de identidad y una cobertura del 92%. El análisis comparativo mediante el programa Mauve mostró que las regiones que no coinciden son muy pocas, se puede observar tres regiones principales de inserción, las cuales se observan en la Figura 21 como huecos en el genoma del fago Φ XaF18 a lo largo del genoma (las que también se pueden interpretar como deleciones en el genoma del bacteriófago KPhi1); por el contrario, si se observa el genoma del fago KPhi1, existen tres inserciones en una región muy cercana y otra pequeña inserción en una región mas alejada (las que pudieran interpretarse como deleciones en el genoma del bacteriófago Φ XaF18) (Figura 21).

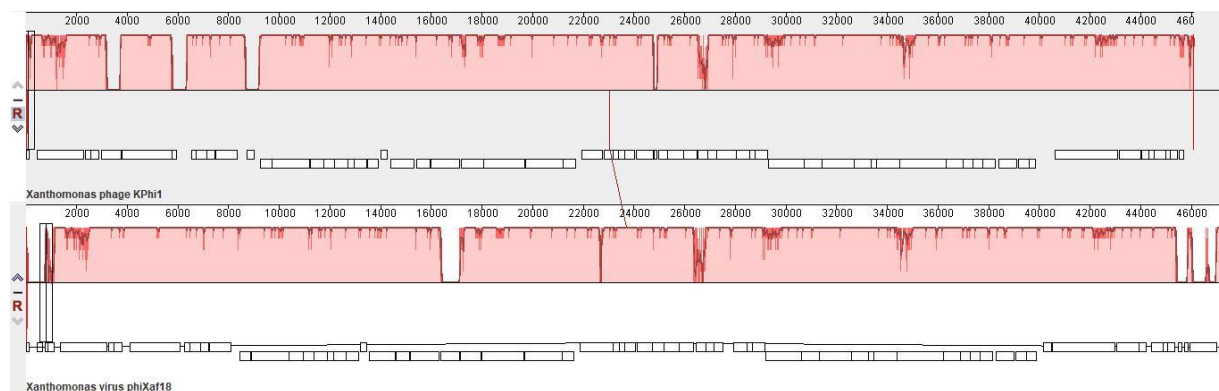


Figura 21. Análisis comparativo del genoma completo del bacteriófago Φ XaF18 con el genoma del bacteriófago KPhi1. Arriba se muestra el genoma del KPhi1 y abajo el genoma del Φ XaF18. Las inserciones se muestran como huecos a lo largo del genoma. Los recuadros blancos representan los ORFs para cada genoma. Figura realizada con el programa Mauve 20150226.

Entre las características más notorias que comparten los fagos Φ XaF18 y KPhi1 son: 1) ambos bacteriófagos pertenecen a la familia *Myoviridae*, 2) ambos tienen como huésped a la bacteria *Xanthomonas vesicatoria*, 3) además, el tamaño del genoma del fago Φ XaF18 es de 47407 pb, y el del fago KPhi1 tiene un genoma de 46077 pb, 4) el bacteriófago Φ XaF18 presenta 67 marcos

abiertos de lectura, mientras que el genoma de KPhi1 posee 66, y por último, 5) el genoma del fago Φ XaF18 posee 63% de contenido G+C y el fago KPhi1 posee 62.9% (Gašić *et al.*, 2018).

7.5. Análisis genético-fenotípico del mecanismo de regulación lisis-lisogénia

7.5.1. Genes implicados en el mecanismo de regulación lisis-lisogénia en el genoma del bacteriófago Φ XaF18

Los resultados obtenidos en el BLASTn para los tres genes clave del mecanismo de regulación lisis-lisogénia indicaron la ausencia de similitud entre dichos genes reportados por Erez *et al.* (2017) y los genes del bacteriófago Φ XaF18. Para los genes *aimP* (codifica el péptido *arbitrium*) y *aimR* (como dímero activa la expresión de *aimX*, en presencia de *arbitrium* no la activa), se obtuvieron valores del valor-*E* muy altos. El valor esperado *E* es un parámetro que describe el número de concordancias que se pueden esperar por casualidad cuando se busca en una base de datos. Por ejemplo, un valor *E* de 1 puede interpretarse como que en una base de datos se podría esperar ver 1 coincidencia con una puntuación similar simplemente por casualidad. Cuanto más bajo es el valor *E*, o cuanto más se acerca a cero, más significativa es la coincidencia, es decir, que es más probable que la coincidencia no sea debido al azar (BLAST NCBI). Por lo tanto, los valores-*E* de 0.65 para *aimP* y 1.9 para *aimR*, resultan ser muy altos si se toma en cuenta que para que se pueda considerar que dos genes presentan similitud se debe tener un valor-*E* igual o menor de e^{-5} (Inoue *et al.*, 2006), y esto indica que no existe similitud entre los genes comparados. Para el gen *aimX*, no se obtuvo ninguna coincidencia. De esta manera se puede interpretar que debido a que ninguno de los tres genes está presente en el genoma del fago Φ XaF18, el mecanismo de regulación *arbitrium* de lisis-lisogénia tampoco está presente en el bacteriófago Φ XaF18.

7.5.2. Péptido *arbitrium* en el genoma del bacteriófago Φ XaF18

Además de no encontrarse el gen *aimX*, y de que los otros dos genes tuvieron muy poca similitud con la secuencia homóloga encontrada en el bacteriófago Φ XaF18, no se encontró presente ninguna secuencia similar a *arbitrium* ni a ninguno de los péptidos homólogos de *arbitrium*. En la Figura 22 se puede observar el perfil de aminoácidos de los péptidos analizados por Erez *et al.* (2017).

Esto apoya la idea de que no existe el mecanismo de lisis-lisogénia en el bacteriófago Φ XaF18, siendo la coincidencia de los genes *aimP* y *aimR* debida únicamente al azar. A pesar de esto se propuso buscar *in vivo* este mecanismo que pudiera estar dado por otro sistema genético homólogo al propuesto por Erez *et al.* (2017).

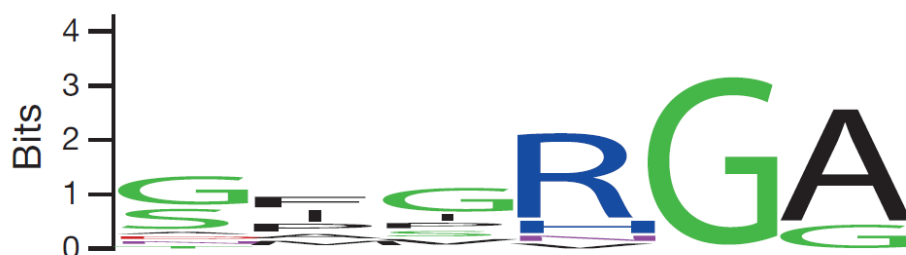


Figura 22. Aminoácidos presentes en los distintos péptidos homólogos al péptido *arbitrium*. (Fuente de la imagen: Erez *et al.*, 2017).

7.5.3. Determinación *in vivo* del mecanismo de decisión lisis-lisogénia del bacteriófago Φ XaF18

Para evaluar la posible presencia de moléculas de señalización se realizó primero el medio condicionado, el cual consistió en cultivar bacteriófagos en interacción con su huésped bacteriano, después de lo cual se filtró el medio, y en este se cultivó nuevamente bacteria y bacteriófago y se evaluó el comportamiento bacteriano mediante curva de crecimiento, se realizaron dos curvas de crecimiento a dos tiempos distintos de inoculación (0 h y 24 h), con el fin de determinar si el tiempo de inoculación influía en las respuesta bacteriana (ver sección 6.5.3. para detalles de la metodología). Los resultados de las curvas de crecimiento de la cepa BV824 de *X. vesicatoria* se muestran en las Figuras 23 y 24.

En la Figura 23 se observa que ambos cultivos con bacteriófago, el condicionado y el control, muestran un nulo crecimiento bacteriano, esto debido precisamente a la presencia del fago; mientras que en ausencia del bacteriófago se presenta crecimiento bacteriano para el cultivo en medio condicionado y el control. Sin embargo, se observan diferencias entre el medio condicionado y el medio control (sin bacteriófago ambos), en el medio control se puede observar que el crecimiento bacteriano es más rápido que en el medio condicionado, retardándose un

poco el crecimiento bacteriano en este último, pareciendo que existe algo en el medio condicionado que inhibe el crecimiento bacteriano. No obstante, al volver a crecer bacteria en medio condicionado para realizar el experimento de inoculación a las 24 h (Figura 24), se observa que dicho retraso en el crecimiento no se repite, indicando que no existen un efecto claro del medio condicionado sobre el crecimiento bacteriano.

En la Figura 24 se muestran los resultados de la comparación del crecimiento bacteriano con y sin bacteriófago inoculado a las 24 h en medio condicionado, donde se observa que al inocular el bacteriófago a las 24 h no hay diferencias en el crecimiento, ya que ambas curvas presentan un comportamiento muy similar. La bacteria se encontraba entrando en fase de muerte celular, y el comportamiento entre la curva de crecimiento con y sin bacteriófago fue igual debido quizá al hecho de que las bacterias por estar muriendo ya no están metabólicamente activas para poder llevar a cabo la replicación de genoma de los bacteriófagos.

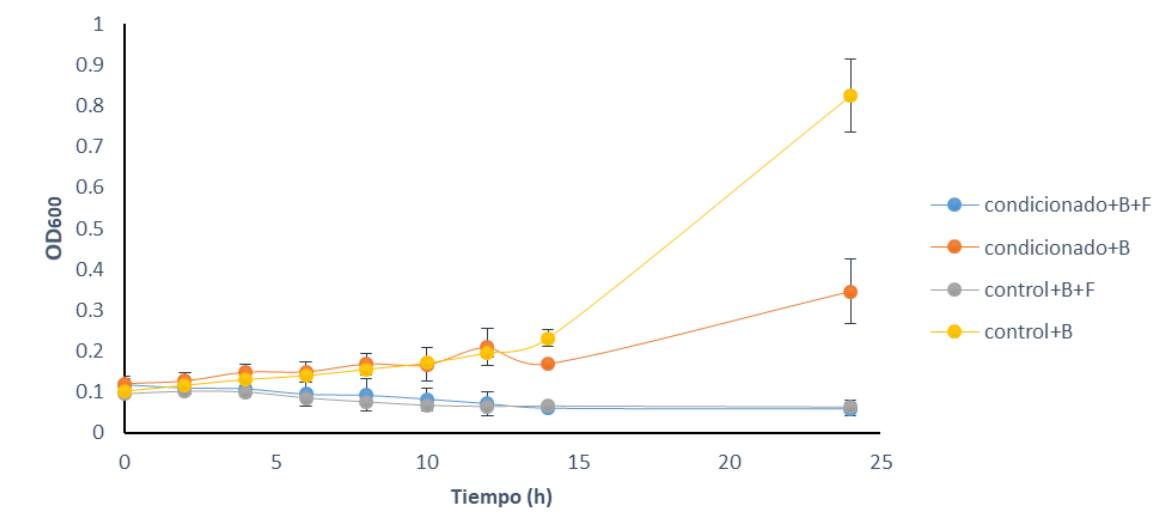


Figura 23. Dinámica de crecimiento de la cepa bacteriana BV824 de *X. vesicatoria* en presencia de medio condicionado (con presencia de bacteria y bacteriófago previa) en comparación con medio control (con presencia de bacteria previa). Inoculación con el bacteriófago a las 0 h. Crecimiento evaluado durante 24 h en agitación a 200 rpm y 28°C. B= bacteria, B+F= bacteria más bacteriófago.

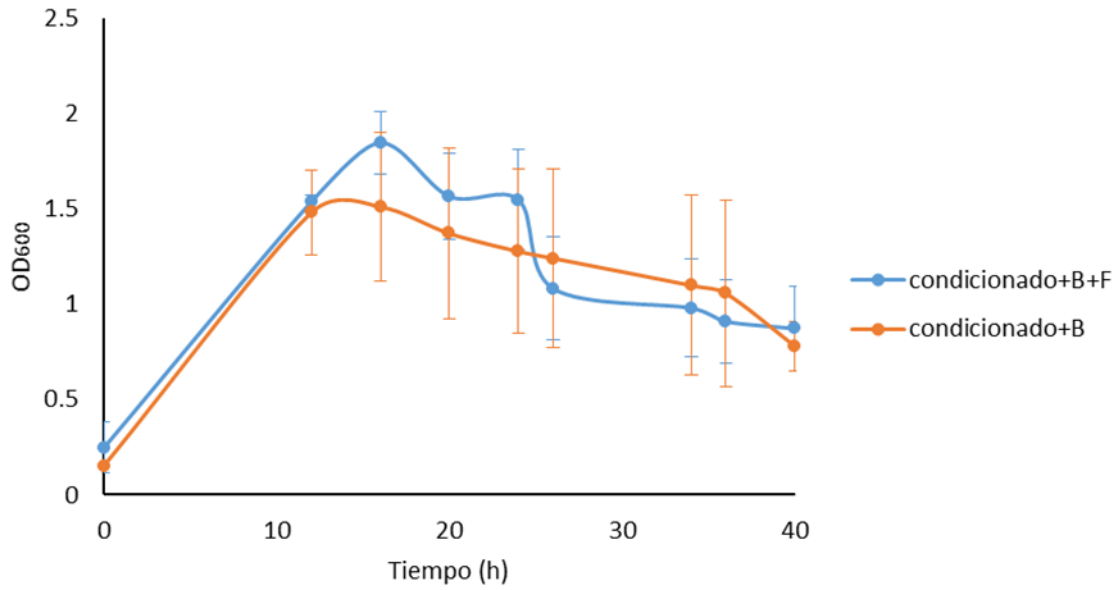


Figura 24. Dinámica de crecimiento de la cepa bacteriana BV824 de *X. vesicatoria* en presencia de medio condicionado (con presencia de bacteria y bacteriófago previa). Inoculación con el bacteriófago a las 24 h. Crecimiento evaluado durante 40 h en agitación a 200 rpm y 28°C. B= bacteria, B+F= bacteria más bacteriófago.

Todo lo anterior confirma el hecho de que el mecanismo *arbitrium* no se encuentra presente en el bacteriófago Φ XaF18, ya que el comportamiento esperado reportado por Erez *et al.* (2017), no se reproduce en el fago del presente estudio.

Además, aunque no se descarta que esté presente en otros grupos, el sistema *arbitrium* ha sido reportado únicamente dentro de fagos que infectan bacterias del orden *Bacillales* (Stokar-Avihail *et al.*, 2019).

Por otro lado, cuando se analizan los genomas de los fagos, la ausencia de secuencias codificantes para proteínas integrasas, transposasas o excisionasas indica que el bacteriófago de interés es un fago lítico (Lu *et al.*, 2013), y dado que en el presente análisis bioinformático no se encontraron ninguna de estas secuencias mencionadas, esto apoya la hipótesis de que el bacteriófago Φ XaF18 es lítico exclusivamente.

8. CONCLUSIONES

El bacteriófago Φ XaF18 es un virus con un genoma de 47407 pares de bases dividido en cuatro módulos funcionales, contiene 67 marcos abiertos de lectura, de los cuales 17 tienen función determinada. Posee ADN de doble cadena lineal y el cual fue circularmente permutado con extremos redundantes y no presenta un sitio *pac*. Filogenéticamente se determinó que pertenece al orden *Caudovirales* y a la familia *Myoviridae*. Respecto al mecanismo de lisis-lisogénica, no se encontró algún mecanismo similar al sistema *arbitrium*, sin embargo, la información genética obtenida en el presente estudio puede ser empleada para diseñar distintas estrategias biotecnológicas para la solución de problemas, en este caso, fitosanitarios, así como para su posible mutagénesis.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedon S T, Duffy S, Turner P E (2009) Bacteriophage Ecology. Environmental Microbiology and Ecology. In: Schaechter M (ed), Encyclopedia of Microbiology. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-012373944-5.00022-5.
- Abo-Senna A S M (2017) Occurrence of *Bacillus thuringiensis* bacteriophages in the egyptian arid soil. International Journal of virology and molecular biology 6(1): 1–8. doi: 10.5923/j.ijymb.20170601.01.
- Ackermann H W (2003) Bacteriophage observations and evolution. Research in Microbiology 154:245–251. doi:10.1016/S0923-2508(03)00067-6.
- Ackermann H W (2009) Phage classification and characterization. En: M R J Clokie, A M Kropinski (eds), Bacteriophages: Methods and protocols. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6 13 Springerprotocols.com. 127–140.
- Adams MH. 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York, NY.
- Adams R L P y Burdon RH (1985) The function of DNA methylation of bacteria and phage. En: Rich A (ed) Molecular biology of DNA methylation. Springer-Verlag New York Inc. doi: 10.1007/978-1-4612-5130-9_6.
- Ahern S J, Das M, Bhowmick T S, Young R, Gonzalez C F (2014) Characterization of Novel Virulent Broad-Host-Range Phages of *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas*. Journal of Bacteriology. 196 (2): 459–471. doi:10.1128/JB.01080-13.
- Alkhalaf L M y Ryan K S (2015) Biosynthetic Manipulation of Tryptophan in Bacteria: Pathways and Mechanisms. Chemistry & Biology 22:317–328. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.02.005.
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y and Wishart DS (2016) PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Research 44:16–21. doi: 10.1093/nar/gkw387.
- Balogh B, Jones J B, Momol M T, Olson S M, Obradovic A, King P, y Jackson L E (2003) Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. Plant Disease 87: 949–954. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.8.949.

- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA and Pevzner PA (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19: 455–477. doi: 10.1089/cmb .2012.0021.
- Black L W (1989) DNA packaging in dsDNA bacteriophages. *Annual Review of Microbiology* 43: 267–292. doi: 10.1146/annurev.mi.43.100189.001411.
- BLAST NCBI (2019).
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=FAQ#expect. Acceso 9 Nov 2019.
- Born Y, Bosshard L, Duffy B, Loessner M J, y Fieseler L (2015) Protection of *Erwinia amylovora* bacteriophage Y2 from UV-induced damage by natural compounds. *Bacteriophage* 5:4. doi: 10.1080/21597081.2015.1074330.
- Botstein D (1980) A theory of modular evolution for bacteriophages. *Annals New York Academy of Sciences* 484–491.
- Bouzar H, Jones J B, Stall R E, Louws F J, Schneider M, Rademaker J L W, de Bruijn F J, y Jackson L E (1999) Multiphasic Analysis of *Xanthomonads* Causing Bacterial Spot Disease on Tomato and Pepper in the Caribbean and Central America: Evidence for Common Lineages Within and Between Countries. *Phytopathology* 89 (4): 328–335. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.4.328.
- Braun V, Jr, Hertwig S, Neve H, Geis A, Teuber M (1989) Taxonomic differentiations of bacteriophages of *Lactococcus lactis* by electron microscopy, DNA-DNA hybridization, and protein profiles. *Journal of General Microbiology* 135: 2551–2560. doi: 10.1099/00221287-135-9-2551.
- Brüssow H, Hendrix R W (2002) Phage genomics: Small Is Beautiful. *Cell* 108:13–16. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00637-7.
- 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). doi: 10.3389/fmicb.2017.00034.
- Campbell A (2003) The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews | Genetics* 4: 471–477. doi: 10.1038/nrg1089.

- Carrillo-Fasio J A, García-Estrada R S, Allende-Molar R, Márquez-Zequera I, Millán-Ocampo S y Gaxiola-Espinoza G (2001) Sensibilidad a Cobre de Cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19 (1): 72–77.
- Casey E, Mahony J, O’Connell-Motherway M, Bottacini F, Cornelissen A, Neve H, Heller K J, Jean-Paul Noben J P, Bello F D, van Sinderen D (2014) Molecular Characterization of Three *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Phages. *Applied and Environmental Microbiology* 80 (18): 5623–5635. doi: 10.1128/AEM.01268-14.
- Casjens S R (2005) Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Current Opinion in Microbiology* 8: 451–458. doi: 10.1016/j.mib.2005.06.014.
- Chen J y Xie J (2011) Role and Regulation of Bacterial LuxR-Like Regulators. *Journal of Cellular Biochemistry* 112: 2694–2702. doi: 10.1002/jcb.23219.
- Clokic M R J, Millard A D, Letarov A V, Heaphy S (2011) Phages in nature. *Bacteriophage* 1(1): 31–45. doi: 10.4161/bact.1.1.14942.
- Comeau A M, Tremblay D, Moineau S, Rattei T, Kushkina A I, Tovkach F I, Krisch H M, Ackermann H W (2012) Phage Morphology Recapitulates Phylogeny: The Comparative Genomics of a New Group of Myoviruses. *PLoS ONE* 7(7): e40102. doi: 10.1371/journal.pone.0040102.
- Darling A C E, Mau B, Blattner F R y Perna N T (2004) Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Research* 14 (7): 1394–1403. doi: 10.1101/gr.2289704.
- d’Hérelle F (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Hebd Seances Acad Sci Ser D* 165:373-375.
- Desnues C, Rodriguez-Brito B, Rayhawk S (2008) Biodiversity and biogeography of phages in modern stromatolites and thrombolites. *Nature* 452: 340–345. doi:10.1038/nature06735.
- Doidge EM (1921) A tomato canker. *Annals of Applied Biology* 7: 407–430. doi: 10.1111/j.1744-7348.1921.tb05528.x.
- Doublet S, Ellenberger T (1998) The mechanism of action of T7 DNA polymerase. *Current Opinion in Structural Biology* 8: 704–712.

- Dunn J J, Studier F W (1983) Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *Journal of Molecular Biology* 166: 477–535. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80282-4.
- Elbreki M, Ross R P, Hill C, O’Mahony J, McAuliffe O y Coffey A (2014) Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. *Journal of Viruses*. doi: 10.1155/2014/382539.
- EPPO (2013) PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 43 (1): 7–20
- EPPO (2017) <https://gd.eppo.int/taxon/XANTVE>. Acceso 18 Dic 2017.
- Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, Doron S¹, Stokar-Avihail A, Peleg Y, Melamed S, Leavitt A, Savidor A, Albeck S, Amitai G y Sorek R (2017) Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature* 541: 488–493. doi:10.1038/nature21049.
- Garcia-Diaz M y Bebenek K (2007) Multiple functions of DNA polymerases. *Critical reviews in plant sciences* 26 (2): 105–122. doi: 10.1080/07352680701252817.
- Gardner M W y Kendrick J B (1923) Bacterial spot of tomato and pepper. *Phytopathology* 13: 307–315. doi: 10.1111/mpp.12244.
- Garneau J R, Depardieu F, Fortier L C, Bikard D y Monot M (2017) PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data. *Nature* 7: 8292. doi: 10.1038/s41598-017-07910-5.
- Gašić K, Kuzmanovic N, Ivanovic M, Prokic A, Šević M, Obradovic A (2018) Complete Genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* Specific Bacteriophage Kphi1, Its Survival and Potential in Control of Pepper Bacterial Spot. *Frontiers in Microbiology* 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02021.
- Golais F, Hollý J y Jana Vítková J (2012) Coevolution of bacteria and their viruses. *Folia Microbiologica*. doi: 10.1007/s12223-012-0195-5.
- Griffiths-Jones S, Bateman A, Marshall M, Khanna A and Eddy SR. 2003. Rfam: an RNA family database. *Nucleic Acids Research* 31 (1): 439–441. doi: 10.1093/nar/gkg006.
- Haft D H, Selengut J, Mongodin E F, Nelson K E (2005) A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Computational Biology* 1 (6): e60. doi: 10.1371/journal.pcbi.0010060.

- Hankin E H (1896) L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Annales de l'Institut Pasteur* (in French). 10: 511–523.
- Hargreaves K R, Kropinski A M, Clokie M R J (2014) What Does the Talking? Quorum Sensing Signalling Genes Discovered in a Bacteriophage Genome. *PLoS ONE* 9(1): e85131. doi:10.1371/journal.pone.0085131.
- Hatfull G F (2008) Bacteriophage genomics. *Current Opinion in Microbiology* 11: 447–453. doi:10.1016/j.mib.2008.09.004.
- Hatfull G F, Sarkis G J (1993) DNA sequence, structure and gene expression of mycobacteriophage L5: a phage system for mycobacterial genetics. *Mol Microbiology* 7: 395–405. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01131.x.
- Hendrix R W (2002) Bacteriophages: evolution of the majority. *Theoretical Population Biology* 61: 471–480. doi:10.1006/tpbi.2002.1590.
- Hendrix R W, Smith M C M, Burns R N, Ford M E y Hatfull G F (1999) Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 2192–2197. doi: 10.1073/pnas.96.5.2192.
- Henn M R, Sullivan M B, Stange-Thomann N, Osburne M S, Berlin A M, Kelly L, Yandava C, Kodira C, Zeng Q, Weiland M, Sparrow T, Saif S, Giannoukos G, Young S K, Nusbaum C, Birren B W, Chisholm S W (2010) Analysis of high-throughput sequencing and annotation strategies for phage genomes. *PLoS ONE* 5 (2): e9083. doi: 10.1371/journal.pone.0009083.
- Ibarra G (2019) Control biológico de la mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*) en el cultivo de chile mediante bacteriófagos formulados (Tesis de Maestría). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. Zapopan, Jalisco.
- ICTV (2018) <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acceso 07 Oct 2019.
- Inoue Y, Matsuura T, Ohara T y Azagami K (2006) Sequence analysis of the genome of OP₂, a litic bacteriophage of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of general plant pathology* 72: 104–110. doi: 10.1007/s10327-005-0259-3.

- Iriarte F B, Balogh B, Momol M T, Smith L M, Wilson M y Jones J B (2007) Factors Affecting Survival of Bacteriophage on Tomato Leaf Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (6): 1704–1711. doi:10.1128/AEM.02118-06.
- Ito J y Braithwaite D K (1991) Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Research* 19 (15): 4045–4057. doi: 10.1093/nar/19.15.4045.
- Jankowsky E (2011) RNA Helicases at work: binding and rearranging. *Trends in biochemical sciences* 36 (1): 19–29. doi:10.1016/j.tibs.2010.07.008.
- Ji X, Sun Y, Liu J, Zhu L, Guo X, Lang X y Feng S (2016) A novel virulence-associated protein, vapE, in *Streptococcus suis* serotype 2. *Molecular Medicine Reports* 13: 2871–2877. doi: 10.3892/mmr.2016.4818.
- Jończyk E, Klak M, Międzybrodzki R y Górski A (2011) The influence of external factors on bacteriophages review. *Folia Microbiologica* 56: 191–200. doi: 10.1007/s12223-011-0039-8.
- Jones J B, Jackson L E, Balogh B, Obradovic A, Iriarte F B y Momol M T (2007) Bacteriophages for Plant Disease Control. *Annual review of phytopathology* 45: 245–62. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411.
- Kanamaru S, Kondabagil K, Rossmann M G y Rao V B (2004) The Functional Domains of Bacteriophage T4 Terminase. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (39): 40795–40801. doi: 10.1074/jbc.M403647200.
- Klucar L, Stano M and Hajduk M. 2010. phiSITE: database of gene regulation in bacteriophages. *Nucleic Acids Research* 38: 366–370. doi: 10.1093/nar/gkp911.
- Knizewski L, Kinch L N, Grishin N V, Rychlewski L y Ginalski K (2007) Realm of PD-(D/E) XK nuclease superfamily revisited: detection of novel families with modified transitive meta profile searches. *BMC Structural Biology* 7: 40. doi: 10.1186/1472-6807-7-40.
- Koonin E V, Galperin M Y (2003) Chapter 1, Genomics: From phage to human. In: *Sequence-evolution-function: computational approaches in comparative genomics*. Boston: Kluwer Academic.
- Kumar S, Stecher G and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution* 33 (7): 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

- Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Stærfeldt H-H, Rognes T and Ussery DW. 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research* 35 (9): 3100–3108. doi: 10.1093/nar/gkm160.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson TJ, Higgins D G (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Larsen T and Krogh A. 2003. EasyGene – a prokaryotic gene finder that ranks ORFs by statistical significance. *BMC Bioinformatics* 4:21. doi: 10.1186/1471-2105-4-21.
- Lee Y, Sung A, Liu T, Lee Y (2009) Combination of chromogenic differential medium and *estA*-Specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (21): 6831–6838. doi: 10.1128/AEM.01653-09.
- Letarov A V y Kulikov E E (2017) Adsorption of Bacteriophages on Bacterial Cells. *Biochemistry (Moscow)* 82 (13): 1632–1658. doi: 10.1134/S0006297917130053.
- Li X, Cengiz, C, Kühner P, Stierhof Y D, Krismer B, Enright M C, Penadés J R, Wolz C, Stehle T, Cambillau C, Peschel A y Xia G (2016) An essential role for the baseplate protein Gp45 in phage adsorption to *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports* 6: 26455. doi: 10.1038/srep26455.
- Lima-Mendez G, Toussaint A y Leplae R (2011) A modular view of the bacteriophage genomic space: identification of host and lifestyle marker modules. *Research in Microbiology* 162: 737–746. doi: 10.1016/j.resmic.2011.06.006.
- López-Vielma, M C J (2016) Control biológico de la mancha bacteriana del cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) mediante bacteriofagos (Tesis de maestría). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. Zapopan, Jalisco.
- Lowe TM y Eddy SR (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research* 25 (5): 955–964. doi: 10.1093/nar/25.5.955.
- Lu S, Le S, Tan Y, Zhu J, Li M, Rao X, Zou L, Li S, Wang J, Jin X, Huang G, Zhang L, Zhao X y Hu F (2013) Genomic and Proteomic Analyses of the Terminally Redundant

- Genome of the *Pseudomonas aeruginosa* Phage PaP1: Establishment of Genus PaP1-Like Phages. *PLoS ONE* 8 (5): e62933. doi: 10.1371/journal.pone.0062933.
- Macmaster R, Sedelnikova S, Baker P J, Bolt E L, Lloyd R G y Rafferty J B (2006) *RusA* Holliday junction resolvase: DNA complex structure—insights into selectivity and specificity. *Nucleic Acids Research* 34 (19): 5577–5584. doi: 10.1093/nar/gkl447.
- Mallmann W y Hemstreet C (1924) Isolation of an inhibitory substance from plants. *Journal of Agricultural Research* 28: 599–602.
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 614–629. doi: 10.1111/J.1364-3703.2012.00804.X.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C and Bryant SH. 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research* 43: 222–226. doi: 10.1093/nar/gku1221.
- Marco GM, Stall RE (1983) Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* 67:779–781. doi: 10.1094/PD-67-779.
- McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW y Jones AL (2002) Antibiotic Use In Plant Agriculture. *Annual review of phytopathology* 40: 443–65. doi: 10.1146/anurev.phyto.40.120301.093927.
- McNair K, Zhou C, Dinsdale EA, Souza B and Edwards RA. 2019. PHANOTATE: a novel approach to gene identification in phage genomes. *Bioinformatics* 1–6. doi: 10.1093/bioinformatics/btz265.
- Medina L Q, Morales J Y, Palomar L y Rico G (2016) Bioestadística en virología: índice multiplicidad de infección (MOI). Octavo congreso internacional sobre la enseñanza y aplicación de las matemáticas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mayo 2016.
- Mirik M, Aysan Y (2009) Detection of *Xanthomonas Axonopodis* Pv. *Vesicatoria* In Naturally Infected Pepper Seeds In Turkey. *Journal of Plant Pathology* 91 (2): 433–436.

- Nagy J K, Király L y Schwarczinger I (2012) Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Central European journal of biology* 7 (1): 1–12. doi: 10.2478/s11535-011-0093-x.
- Naville M, Ghuillot-Gaudeffroy A, Marchais A and Gautheret D. 2011. ARNold: A web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. *RNA Biology* 8 (1): 11–13. doi: 10.4161/rna.8.1.13346.
- NCBI (2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=10239&host=bacteria> . Acceso 17 Dic 2017.
- Obradovic A, Jones J B, Momol M T, Balogh B y Olson S M (2004) Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Disease* 88: 736–740. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.7.736.
- Oppenheim A B, Kobilier O, Stavans J, Court D L y Adhya S (2005) Switches in bacteriophage Lambda development. *Annual Review of Genetics* 39: 409–429. doi: 10.1146/annurev.genet.39.073003.113656.
- Pires D, Cleto S, Sillasnkorva S, Azeredo J y Lu T K (2016) Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80: 523–543. doi: 10.1128/MMBR.00069-15.
- Poteete A R y Hardy L W (1994) Genetic Analysis of Bacteriophage T4 Lysozyme Structure and Function. *Journal of Bacteriology* 176 (22): 6783–6788.
- Raney K D, Byrd A K y Aarattuthodiyil S (2013) Structure and Mechanisms of SF1 DNA Helicases. *Advances in experimental medicine and biology* 767. doi:10.1007/978-1-4614-5037-5_2.
- Rath D, Amlinger L, Rath A y Lundgren M (2015) The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie* 117: 119e128. doi: 10.1016/j.biochi.2015.03.025.
- Ritchie D F y Dittapongpitch V (1991) Copper- and Streptomycin- Resistant Strains and Host Differentiated Races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Disease* 75: 733–736.
- Rohwer F, Segall A, Steward G F, Seguritan V, Breitbart M, Wolven F y Azam F (2000) The complete genomic sequence of the marine phage Roseophage SIO1 shares homology

- with nonmarine phages. *Limnology and Oceanography* 45: 408–418. doi: 10.4319/lo.2000.45.2.0408.
- Sadunishvili T, Kvesitadze E, Kvesitadze G (2015) Chapter 3 *Xanthomonas vesicatoria* specific virus and its potential to prevent tomato bacterial spot disease. In: Camesano T A (ed) *Nanotechnology to aid chemical and biological defense*. doi: 10.1007/978-94-017-7218-1_3.
- Sambrook J and Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Romero M A, Cota I y Casadesús J (2015) DNA methylation in bacteria: from the methyl group to the methylome. *Current Opinion in Microbiology* 25: 9–16. doi: 10.1016/j.mib.2015.03.004.
- Sanger F, Air G M, Barrell B G, Brown N L, Coulson A R, Fiddes C A, Hutchison C A, Slocombe P M y Smith M (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687–695. doi: 10.1038/265687a0.
- Sanger F, Coulson A R, Hong G F, Hill D F y Petersen G B (1982) Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *Journal of Molecular Biology* 162: 729–773. doi: doi.org/10.1016/0022-2836(82)90546-0.
- Schoenfeld T, Patterson M, Richardson P M, Wommack E, Young M y Mead D (2008) Assembly of viral metagenomes from yellowstone hot springs. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4164–4174. doi: 10.1128/AEM.02598-07.
- Sechaud J, Streisinger G, Emrich J, Newton J, Lanfor H, Reinhold H y Stahl M M (1965) Chromosome Structure in Phage T4, II. Terminal Redundancy and Heterozygosity. *Genetics* 54: 1333–1339.
- Serwer P, Hayes S J, Thomas J A y Hardies S C (2007) Propagating the missing bacteriophages: a large bacteriophage in a new class. *Virology Journal* 4: 21. doi:10.1186/1743-422X-4-21.
- Shao Y y Wang I N (2008) Bacteriophage Adsorption Rate and Optimal Lysis Time. *Genetics* 180: 471–482. doi: 10.1534/genetics.108.090100.
- Shenge K C, Mabagala R B, Mortensen C N y Widra K (2014) Resistance of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* isolates from Tanzania to copper and implications for

- bacterial spot management. *African Journal of Microbiology Research* 8 (30): 2881–2885. doi: 10.5897/AJMR2013.5836.
- Sigrist JA, Cerutti L, de Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Bulliard V, Bairoch A and Hulo N. 2010. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Research* 38: 161–166. doi:10.1093/nar/gkp885.
- Solís-Sánchez A, Hernández-Chiñas U, Navarro-Ocaña A, De la Mora J, Xicohtencatl-Cortés J y Eslava-Campos C (2016) Genetic characterization of ØVC8 lytic phage for *Vibrio cholerae* O1. *Virology Journal*. doi: 10.1186/s12985-016-0490-x.
- Stokar-Avihail A, Tal N, Erez Z, Lopatina A y Sorek R (2019) Widespread Utilization of Peptide Communication in Phages Infecting Soil and Pathogenic Bacteria. *Cell Host & Microbe* 25: 746–755. doi: 10.1016/j.chom.2019.03.017.
- Stothard P (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. *BioTechniques* 28 (6): 1102–1104. doi: 10.2144/00286ir01.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z y Morris J G JR (2001) Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (3): 649–659. doi: 10.1128/AAC.45.3.649–659.2001.
- Sun S, Gao S, Kondabagil K, Xiang Y, Rossmann M G y Rao VB (2012) Structure and function of the small terminase component of the DNA packaging machine in T4-like bacteriophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (3): 817–822. doi/10.1073/pnas.1110224109.
- Suttle C A (2005) Viruses in the sea. *Nature*. 437 (7057): 356–61. doi: 10.1038/nature04160.
- Tewfik T A, Desoky S M (2015) Biocontrol of *Xanthomonas axonopodis* causing bacterial spot by application of formulated phage. *Annals of Agricultural Science* 53 (4): 615–624.
- Twort FW (1915) An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* 186: 1241–1243. doi: 10.1016/S0140-6736(01)20383-3.
- Valbuzzi A, Gollnick P, Babitzke P y Yanofsky C (2002) The Anti-*trp* RNA-binding Attenuation Protein (Anti-TRAP), AT, Recognizes the Tryptophan-activated RNA Binding Domain of the TRAP Regulatory Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (12): 10608–10613. doi: 10.1074/jbc.M111813200.

- Van Domselaar G H, Stothard P, Shrivastava S, Cruz J A, Guo A, Dong X, Lu P, Szafron D, Greiner R and Wishart D S (2005) BASys: a web server for automated bacterial genome annotation. *Nucleic Acids Research* 33: 455–459. doi:10.1093/nar/gki593.
- Wang I N (2006) Lysis Timing and Bacteriophage Fitness. *Genetics* 172: 17–26. doi: 10.1534/genetics.105.045922.
- Waters C M y Bassler B L (2005) Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 319–46. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001
- Weigel C y Seitz H (2006) Bacteriophage replication modules. *FEMS Microbiol Reviews* 30: 321–381. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00015.x.
- Weinbauer M G (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 127–181. doi: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.
- Wichels A, Biel S S, Gelderblom H R, Brinkhoff T, Muyzer G y Schütt C (1998) Bacteriophage diversity in the north sea. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4128–4133.
- Wittebole X, De Roock S y Opal S M (2014) A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 5 (1): 226–235. doi: 10.4161/viru.25991.
- Ye J, McGinnis S and Madden TL (2006) BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Research* 34: 6–9. doi: 10.1093/nar/gkl164.
- Yoon S S, Barrangou-Pouey R, Breidt F, Klaenhammer T R y Fleming H P (2002) Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2): 973–976. doi: 10.1128/AEM.68.2.973-976.2002.
- Zeng L, Skinner S O, Zong C, Sippy J, Feiss M y Golding I (2010) Decision making at a subcellular level determines the outcome of bacteriophage infection. *Cell* 141: 682–691. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.034.

ANEXOS

Anexo 1. Artículo enviado a revisión a la revista *Microbiology Resource Announcements*:

1 Complete genome sequence of the Φ XaF18 bacteriophage of *Xanthomonas*
2 *vesicatoria*; a contribution to the biocontrol of bacterial spot of pepper in Mexico
3 Marcela Ríos-Sandoval,^a Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar,^a Guillermo
4 Alejandro Solís-Sánchez,^a Jhony Navat Enríquez-Vara,^{a,b} Gabriel Rincón-
5 Enríquez,^a

6 ^aLaboratorio de Fitopatología, Unidad de Biotecnología Vegetal, ^bCONACYT, Centro
7 de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
8 (CIATEJ) Zapopan-Jalisco, México

9 *Corresponding author: grincon@ciatej.mx

10 ABSTRACT

11 The bacteriophage Φ XaF18 infects *Xanthomonas vesicatoria*, which is the causal
12 agent of bacterial spot in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and pepper (*Capsicum*
13 *annuum* L.). In this announcement, we present the complete genome of the Φ XaF18
14 bacteriophage of *X. vesicatoria*, a 47,407 bp genome with 67 protein-coding genes.

15 ANNOUNCEMENT

16 *Xanthomonas vesicatoria* is a Gram-negative bacterium that causes bacterial spot
17 in tomato and pepper plants. Here we describe the complete genome of the Φ XaF18
18 bacteriophage of *X. vesicatoria*, isolated from soil cultivated with pepper plants
19 (Yurecuaro, México) that showed symptoms of bacterial spot. The bacteriophage
20 was propagated in bacterial cells of the BV824 strain of *X. vesicatoria*.

21 The Φ XaF18 bacteriophage was propagated in the BV824 strain using the double-
22 agar-layer technique in NYG at 28°C (1). The phage morphology was visualized
23 using negative staining with 2% uranyl acetate (2) and observing the samples under
24 a transmission electron microscope (FEI/PHILIPS/M-268/Morgagni) at 80 kV. The

25 genomic DNA of the phage was extracted using the phenol-chloroform method (3).
26 The genomic phage library of Φ XaF18 was prepared according to the instructions
27 included in the Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina, USA). The quality
28 of the library was verified using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). High
29 performance sequencing was done using a synthesis protocol (MiSeq, Illumina). The
30 sequencing was performed in the Sequencing Laboratory of the UCB-UAZ. De novo
31 assembly was performed using SPADIS 3.12.0 (4). The protein-coding genes were
32 predicted using the EasyGene 1.2b Server, Basys (Bacterial Annotation System),
33 Phaster (Phage Search Tool Enhanced Release), SMS Orf finder (Sequence
34 Manipulation Suite), Phanotate 0.13.0 (5-9) and the NCBI ORFfinder (Open Reading
35 Frame Finder) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). The comparison with the
36 NCBI database was performed using BLASTx to determine the coding ORFs (10).
37 In addition, we searched for conserved domains using ProSite and the Conserved
38 Domain Search Service (CD Search) of NCBI (11, 12).
39 Promoters and operators were predicted using Phisite; rho-independent terminators
40 were predicted using ARNold and Phisite (13, 14). The search for transfer and
41 ribosomal RNA was performed using tRNAscan-SE, RNAmmer and Rfam (15-17).
42 The type of viral DNA ends and the packing mode were determined using the
43 PhageTerm program (18). A phylogenetic analysis of terminase large subunits was
44 performed using MEGA7 (19).
45 The Φ XaF18 phage has a 47,407 bp genome, with a coding density of 91.2% and
46 G C content of 63%. The genome is double-stranded DNA. The analysis predicted
47 67 protein-coding genes, 16 of which with a predicted function. Twenty hypothetical

48 promoter sequences and 13 rho-independent terminators were found. No transfer or
49 ribosomal RNA was found.

50 It was determined that the genome of bacteriophage Φ XaF18 is circularly permuted
51 and terminally redundant; the genome is packed through a headful packaging
52 mechanism (18). The phylogenetic analysis showed that Φ XaF18 is close to the
53 *Xanthomonas* phage OP2, in the *Myoviridae* family, which was confirmed by the
54 morphological results obtained under the microscope. The bacteriophage Φ XaF18
55 measured 62.5 nm from apex to apex of the capsid, 57 nm from side to side of the
56 capsid, 85.7 nm in length of the tail, and 157.5 nm in total length.

57 Data availability. The genome sequence and the associated data of phage Φ XaF18
58 were deposited under GenBank accession number [MN461279](#). The raw sequence
59 reads can be found in bioproject [PRJNA566170](#). The data are available in the
60 Sequence Read Archive (SRA) database with the accession number [SRX6866383](#).

61 ACKNOWLEDGMENTS

62 This research was supported by a CONACyT grant (APN-2015-01-338) to Gabriel
63 Rincón-Enríquez. We thank CONACYT for the master's scholarship granted to
64 Marcela Ríos-Sandoval (CVU: 781740). Drs. Evangelina Esmeralda Quiñones-
65 Aguilar and Guillermo Alejandro Solís-Sánchez participated as director and co-
66 director of this research project, respectively. We also acknowledge the Unidad de
67 Ciencias Biológicas of the Universidad Autónoma de Zacatecas for providing
68 sequencing services.

69 REFERENCES

70 1. Adams MH. 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York, NY.

Anexo 2. Secuencia genómica completa.

La secuencia genómica fue depositada bajo el número de acceso de GenBank MN461279 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN461279>)

Xanthomonas virus phiXaf18, complete genome

GenBank: MN461279.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: 

```
LOCUS       MN461279                47407 bp    DNA    linear    PHG 28-OCT-2019
DEFINITION  Xanthomonas virus phiXaf18, complete genome.
ACCESSION  MN461279
VERSION    MN461279.1
KEYWORDS   .
SOURCE     Xanthomonas virus phiXaf18
  ORGANISM  Xanthomonas virus phiXaf18
            Viruses; unclassified viruses; unclassified bacterial viruses.
REFERENCE  1 (bases 1 to 47407)
  AUTHORS  Rios-Sandoval,M., Quinones-Aguilar,E.E., Solis-Sanchez,G.A.,
            Enriquez-Vara,J.N. and Rincon-Enriquez,G.
  TITLE    Complete nucleotide sequence of Xanthomonas phage phiXaf18
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 47407)
  AUTHORS  Rios-Sandoval,M., Quinones-Aguilar,E.E., Solis-Sanchez,G.A.,
            Enriquez-Vara,J.N. and Rincon-Enriquez,G.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (13-SEP-2019) Plant Biotechnology, Centro de
            Investigacion y Asistencia en Tecnologia y Diseno del Estado de
            Jalisco, A.C., Camino Arenero 1227, Zapopan, Jalisco 45019, Mexico
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Assembly Method      :: SPAdes v. 3.11.1
            Sequencing Technology :: Illumina
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
   source   1..47407
            /organism="Xanthomonas virus phiXaf18"
```

Anexo 3. Constancias de participación en congresos

Constancia por la ponencia de cartel con el tema: Caracterización molecular del bacteriófago Φ Xaf18 asociado a la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*. En la XXXI Reunión Científica - Tecnológica, Forestal y Agropecuaria. Veracruz 2018. Boca del Río, Veracruz, 24-26 octubre de 2018.



Reconocimiento por la presentación oral nivel Estudiante con el tema: **Genoma del bacteriófago Φ Xaf18 asociado a la bacteria fitopatogena *Xanthomonas vesicatoria***. En el XXI Congreso Internacional y XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Morelia, Michoacán, 2019. 24-28 agosto de 2019.



**SOCIEDAD MEXICANA
DE FITOPATOLOGÍA A.C.**

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a

**Marcela Ríos-Sandoval, Gabriel Rincón-Enríquez,
Alejandro Solís-Sánchez, Evangelina Quiñones-Aguilar**

Por su destacada participación en la categoría de presentación oral nivel Estudiante con el tema:

Genoma del bacteriófago Φ XaF-18 asociado a la bacteria fitopatogena *Xanthomonas vesicatoria*

**XXI Congreso Internacional
& XLVI Congreso Nacional**
del 24 al 28 de agosto 2019
Morelia, Michoacán


Dra. Sylvia Fernández Pavía
Presidente
Mesa Directiva 2018 - 2020



Constancia por el segundo lugar en la modalidad de cartel nivel Estudiante con la presentación: **Interacción del bacteriófago Φ Xaf18 con la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria* en condiciones *in vitro*.** En el XXI Congreso Internacional y XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Morelia, Michoacán, 2019. 24-28 agosto de 2019.



**SOCIEDAD MEXICANA
DE FITOPATOLOGÍA A.C.**

Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

**Marcela Ríos-Sandoval, Gabriel Rincón-Enríquez,
Alejandro Solís-Sánchez, Evangelina Quiñones-Aguilar**

Por haber obtenido el segundo lugar en la modalidad de cartel nivel Estudiante con la presentación:

**INTERACCIÓN DEL BACTERIÓFAGO Φ Xaf-18 CON LA
BACTERIA FITOPATÓGENA *Xanthomonas vesicatoria* EN
CONDICIONES *in vitro*.**

**XXI Congreso Internacional
& XLVI Congreso Nacional**
del 24 al 28 de agosto 2019
Morelia, Michoacán



Dra. Sylvia Fernández Pavia
Presidente
Mesa Directiva 2018 - 2020



Anexo 4. Medios de cultivo y buffers

Medio de cultivo NYG

Peptona	5 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Glycerol	20 mL/L

Medio de cultivo NYGA

Peptona	5 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Glycerol	20 mL/L
Agar	16 g/L

Medio de cultivo NYGA suave

Peptona	5 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Glycerol	20 mL/L
Agar	6 g/L

Buffer SM

MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g/L
Tris-HCl 1M (pH 7.5)	50 mL/L