

2005 B - 2010 B

005117836

**Universidad de Guadalajara**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**División de Ciencias Biológicas**



**Aislamiento y caracterización de bacteriófagos asociados a la pudrición blanda del agave en el estado de Michoacán."**

**Modalidad de Titulación Tesis e Informes**

**Opción Tesis**

**Para Obtener el Título de**

**Licenciado en Biología**

**Presentada por Alejandro Ochoa Ramírez**

**Guadalajara. Jalisco, Abril 2011**



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**  
*Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología*

COORD-BIO-098/2011

C. ALEJANDRO OCHOA RAMÍREZ  
PRESENTE

Manifetamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción: **TESIS** con el título: "Aislamiento y caracterización de bacteriófagos asociados a la pudrición, blanda del agave en el estado de Michoacán", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a Gabriel Rincón Enríquez. Asesor(a) interno a Ana Lilia Viguera Guzmán.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 06 de junio de 2011.

DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

M.C. GLORIA PARADA BARRERA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Licenciatura en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e informes, opción Tesis con el título: "Aislamiento y caracterización de bacteriófagos asociados a la pudrición blanda del agave en el estado de Michoacán" que realizó el/la pasante Alejandro Ochoa Ramírez con número de código 005117836 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

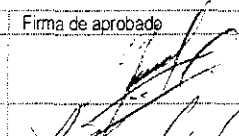
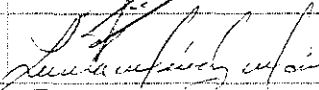

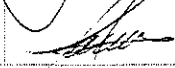
Atentamente  
 Lugar y fecha.

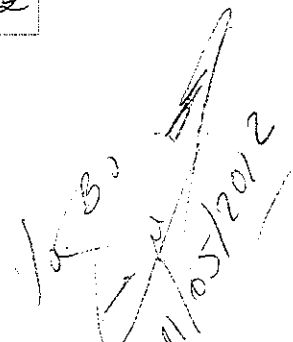
Guadalupe, Jalisco  
 8/05/2012



Firma  
 Nombre Gabriel Rincon Enríquez  
 Director/a del trabajo,

firma  
 nombre Ana Lilia Viguera G.  
 Asesor(es)

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Gil Virgen Calleros		10/05/2012
Dra. Lucila Méndez Morán		07/05/2012
M.C. Margarita Bonilla Moreno Supl.		10/05/2012
Dra. Ana Lilia Viguera Guzmán		09/05/2012

  
 11/05/2012

Universidad de Guadalajara  
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
División de Ciencias Biológicas



“Aislamiento y caracterización de bacteriófagos asociados a la pudrición blanda del agave en el estado de Michoacán.”

Modalidad de Titulación Tesis e Informes

Opción Tesis

Para Obtener el Título de  
Licenciado en Biología

presentada por Alejandro Ochoa Ramírez

Guadalajara, Jalisco, Abril 2011



El trabajo de esta tesis forma parte del proyecto intitulado:

“Utilización de recursos microbianos para el control biológico de la pudrición del cogollo de agave tequilero en la DOT-Michoacán”

Financiado por el Fondo Mixto (FOMIX) del Estado de Michoacán – CONACYT

(Convocatoria 2010). Clave del proyecto MICH-2010-C01-148208

Líder de proyecto Dr. Gabriel Rincón Enríquez

La presente investigación se desarrollo en 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 del Dr. Gabriel Rincón Enríquez.

Dedicatoria:

Cuando comencé mis estudios creía que, al dispersar mi espíritu, encontraría una respuesta que me permitiría pasar mis noches tranquilo, que habría consuelo en la búsqueda de nuevos puertos en los cuales aparejar. Sin embargo no fue así, el tiempo me enseñó a mirar hacia adentro y ver la maquinaria que me propulsaba hasta ese momento. Regresé sobre mis pasos y encontré que mi hogar aún no había sido devorado por la memoria, se mantenía sólido y vivo; llamé a sus cálidas puertas y se me permitió reintegrarme, fui acogido por el código de mi sangre y un rostro nuevo que prometió navegar a mi lado hasta que el fin último me sea desvelado.

A mis amados padres Rosa María y Rodolfo, a mis hermanos Daniel y Jorge, cuyos corazones y curiosidad por el mundo fueron mi primera casa de estudios y sin duda la más importante, aún es la columna vertebral de mi persona.

A mi amada Nayeli, que durante todo este tiempo estuvo al pendiente de la oscilación de mi alma, cuya mano puedo leer claramente a lo largo de este trabajo y a quien prometo dedicar mi alegría y mi fascinación por la vida, nuestro tiempo, juntos, no será una flama que se apague al menor soplo del cambio de estación.

El conocimiento no llenará mis pulmones con el aire de la tranquilidad, el cosmos es tan vasto, que el saber por cuantioso que aparente ser, siempre será miserable. Pero amar con conocimiento, que distinto es para volver a penetrar en el mundo de los sueños.

## Agradecimientos:

Nunca los olvido amigos míos, hemos abrevado de muchas historias como para que algún día logren fugarse de los recovecos de mi mente, no siempre tengo la oportunidad de agradecerles, pero sepan que siempre los tengo presentes: Augusto Javier Peña, Carolina Villanueva (1987- 2009), Jharumi Espejo, Oliver Núñez, Ezequiel Pérez, Sofía Martínez, Monica Andrea Torres, Mónica Ayub, Arturo Salvador Hernández, Miriam Janeth del Rocío Lerma, Oscar Manuel Colín, Monica Rivas, Nayla Campos y Mario Alberto Martínez.

A quienes participaron en este trabajo, sobre todo a Ana Lilia Viguera por estar al pendiente más allá del deber, Gabriel Rincón, Lucila Méndez, Karina Contreras, Diego Eloyr Navarro, Margarita Bonilla y Gil Virgen. Muchas gracias por su ayuda y el conocimiento traspasado.

## Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Cel: Celulasas.

ITS: Intergenic Transcribed Spacer.

KB: medio King *et al.*

NA: medio Agar Nutritivo.

LB: medio Luria Bertani.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

Pel: Pectinasas.

PGA: Polygalacturonic Acid.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism.



# Índice:

	Pág.
1. Resumen.....	10
2. Introducción:.....	11
3. Marco teórico.....	12
3.1 Uso del jugo de agave en la elaboración de bebidas alcohólicas en el estado de Michoacán.....	13
3.2 La pudrición blanda: <i>Erwinia carotovora</i> , <i>E. cacticida</i> , <i>E. Chrysathemi</i> .....	14
3.2.1 <i>Erwinia carotovora</i> .....	14
3.2.2 <i>Erwinia cacticida</i> .....	15
3.2.3 <i>Erwinia chrysanthemi</i> .....	15
3.3 Los bacteriófagos.....	16
3.4 ¿Qué caracteriza a un bacteriófago?.....	17
3.5 Los bacteriófagos en la agricultura.....	18
3.6 Aislamiento y uso exitoso de bacteriófagos para combatir bacterias patógenas en la actualidad.....	20
3.7 Aislamiento, multiplicación y caracterización de bacteriófagos.....	21
3.7.1 Aislamiento y multiplicación de los virus.....	21
3.7.2 Caracterización.....	22
3.8 Aislamiento y caracterización de bacterias.....	23
3.8.1 Postulados de Henle-Koch sobre el aislamiento de un agente patógeno....	23
3.8.2 Aislamiento.....	24
3.8.3 Caracterización bioquímica.....	24
3.8.3.1 Pruebas de producción de celulasas (Cel).....	25
3.8.3.1 Pruebas de producción de pectinasas (Pel).....	25
3.8.4 Caracterización molecular.....	26

3.8.4.1 Intergenic Transcribed Spacer (ITS).....	27
3.8.4.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	27
3.8.5 Caracterización por patogenicidad.....	29
4. Planteamiento del problema.....	30
5. Justificación.....	31
6. Hipótesis.....	32
7. Objetivos.....	33
8. Materiales y métodos.....	34
8.1 Cepas de bacterias testigo usadas durante los experimentos.....	34
8.2 Aislamiento de bacterias.....	35
8.3 Colecta y almacenamiento de muestras.....	35
8.4 Aislamiento de bacterias en medio M-9+PGA.....	36
8.5 Reaislamiento de colonias en medio selectivo con agar a medio nutritivo NA...	36
8.6 Crecimiento en medio Luria-Bertani (LB).....	38
8.7 Criopreservación.....	38
8.8 Caracterización bioquímica: Pruebas enzimáticas.....	38
8.8.1 Pruebas para detección de Pectinasas (Pel).....	38
8.8.2 Pruebas para detección de Celulasas (Cel).....	41
8.9 Caracterización por ITS- Polymerase Chain Reaction (PCR).....	43
8.9.1 Extracción de ADN.....	43
8.9.2 PCR para ITS.....	44
8.9.3 Electroforesis y procesamiento de imagen para ITS-PCR.....	45

8.10 Caracterización por RFLP-PCR.....	46
8.10.1 Extracción de ADN.....	46
8.10.2 PCR para RFLP.....	46
8.10.3 Purificación del ADN.....	46
8.10.4 RFLP.....	46
8.10.5 Electroforesis y procesamiento de imagen para ITS-PCR.....	48
8.11 Pruebas de Patogenicidad.....	48
8.11.1 Infiltración.....	48
8.11.1.1 Preparación de las bacterias.....	48
8.11.1.2 Preparación de las hojas.....	48
8.11.1.3 Infiltración.....	48
8.12 Inoculación de la bacteria usando como vehículo <i>Scyphophorus acupunctatus</i> (picudo negro del agave).....	51
8.12.1 Limpieza y desinfección de los insectos.....	51
8.12.2 Preparación del medio agar con azúcar y bacteria.....	52
8.12.3 Agregado del insecto a <i>A. cupreata</i> .....	52
8.13 Inducción de la enfermedad con una inyección en la base de las hojas de un ejemplar completo <i>A. cupreata</i> .....	53
8.14 Aislamiento y multiplicación de bacteriófagos.....	54
8.14.1 Aislamiento.....	55
8.14.2 Detección de bacteriófagos.....	55
8.14.3 Multiplicación de los virus.....	57
8.14.4 Recuperación de los virus multiplicados.....	57
9. Resultados y discusiones.....	59
9.1 Aislamiento de bacterias.....	59
9.2 Caracterización bioquímica: Pruebas enzimáticas.....	59
9.3 ITS-PCR.....	61

9.4 RFLP-PCR.....	64
9.5 Caracterización de patogenicidad.....	67
9.5.1 Infiltración de <i>S. ionantha</i> y <i>C. endivia</i> .....	67
9.5.1.1 <i>S. ionantha</i> .....	67
9.5.1.2 <i>C. endivia</i> .....	69
9.5.2 Infiltración de <i>A. cupreata</i> .....	70
9.5.3 Infiltración de <i>A. tequilana</i> .....	74
9.6 Inoculación de la bacteria usando como vehículo a <i>S. acupunctatus</i> .....	75
9.7 Inducción de la enfermedad con una inyección en la base de las hojas de un ejemplar completo <i>A. cupreata</i> .....	78
9.8 Aislamiento de Bacteriófagos.....	79
9.8.1 A partir de muestras de tejido vegetal necrosado.....	79
9.8.2 A partir de muestras de suelo.....	79
9.9 Multiplicación de Bacteriófagos.....	80
10. Conclusiones.....	82
11. Perspectivas.....	83
12. Literatura consultada.....	85
13. Anexos.....	93
Anexo I: Componentes de los Medios de Cultivo.....	93
Anexo II: Buffers.....	96

## 1. Resumen:

En el estado de Michoacán, México, la especie *Agave cupreata* Trel y Berger es empleada para la elaboración de un destilado alcohólico llamado mezcal, que se emplea como bebida popular entre los habitantes de la región. La materia prima que se emplea para la elaboración de esta bebida puede provenir cultivos o de especímenes silvestres que son colectados para este propósito, el incremento de la demanda de mezcal ha sometido a este agave a una presión difícil de soportar, en la cual la estabilidad de su población se encuentra amenazada. Aunado a los problemas que la industria del mezcal trae a *A. cupreata*, en los cultivos se han comenzado a detectar problemas fitosanitarios de origen bacteriano, que comienzan a dispersarse entre los miembros de esta especie, dicha enfermedad es conocida como “pudrición blanda”.

Las particularidades del agente causal de la “pudrición blanda” que se presenta en *A. cupreata*, hasta ahora no han sido estudiadas, ni tampoco se han establecido medidas para desarrollar un control que inhiba la expansión de dicha enfermedad. El presente trabajo logró aislar una bacteria a la cual denominó BV311, procedente de ejemplares de *A. cupreata* enfermos, esta bacteria es capaz de causar los síntomas característicos de la “pudrición blanda” y en las pruebas de caracterización morfológicas, bioquímicas y moleculares que se hicieron de BV311 durante la investigación, se encontró además que esta no tenía relación con las bacterias del género *Erwinia*, con quienes más comúnmente se relaciona la “pudrición blanda”.

El presente trabajo también propone el empleo de una tecnología que comienza a repuntar en el campo del combate a las bacterias, esta es el empleo de bacteriófagos, partículas virales que tienen la capacidad de lisar células bacterianas, que podrían dar mejores resultados que los métodos tradicionales para controlar enfermedades bacterianas, como son los antibióticos y los compuestos de cobre. En este sentido se logró estandarizar una técnica para el aislamiento de bacteriófagos asociados a la cepa BV311.

## 2. Introducción

“La plaga no está hecha a la medida del hombre, por lo tanto el hombre se dice que es irreal, es un mal sueño que tiene que pasar” (Camus, 1947)

En México se presentan dos enfermedades que afectan las distintas especies del género *Agave* con uso comercial, destruyendo la materia prima con la cual se elaboraran algunos productos que dejan importantes dividendos para aquellos estados que trabajan con sus productos. Una de estas enfermedades es llamada “marchitez del agave” y la otra “podrición blanda” (Fucikovsky, 2002).

Ambas enfermedades tienen sus propias peculiaridades. Por ejemplo la “marchitez del agave” es causada por el hongo *Fusarium* sp. (Fucikovsky, 2002) y la segunda enfermedad es de naturaleza bacteriana, siendo la bacteria *Erwinia carotovora* Jones, supuestamente responsable. A esta enfermedad se le da el nombre popular de “podrición blanda” (Valenzuela-Zapata, 1994). Aunque Jiménez *et al.* (2004) reportan que más de una bacteria podría estar implicada en la enfermedad, al menos en *Agave tequilana* Weber var. azul, de donde se aisló a la bacteria *Erwinia cacticida* Alcorn.

El presente trabajo se ocupa de la “podrición blanda”, que no es una enfermedad exclusiva del agave, sino de diversas especies vegetales. En esta investigación se buscó aislar a partir de plantas enfermas de *Agave cupreata* Trel y Berger al menos una bacteria responsable de la “podrición blanda” en plantaciones ubicadas en la zona productora de mezcal en el estado de Michoacán, para aislar un virus que causara lisis celular sobre alguna de las bacterias aisladas. A esta clase de virus que causan lisis bacteriana, se les da el nombre de **bacteriófagos**.

### 3. Marco Teórico

#### 2.1 Uso del jugo de agave en la elaboración de bebidas alcohólicas en el estado de Michoacán

Las agaváceas constituyen uno de los grupos vegetales con mayor presencia y número de especies en México, la familia *Agavaceae* es endémica del continente americano y está dividida en 9 géneros con 293 especies (Instituto de Ecología, UNAM, 2011). De estas plantas se pueden obtener diversos subproductos, pero es especialmente uno el que hoy cautiva a la industria, la elaboración de alcohol a partir de sus azúcares. De las bebidas espirituales que se obtienen con la cocción de sus jugos, el tequila es el que más demanda tiene, traduciéndose en un fuerte ingreso económico para los cinco estados de la república mexicana que poseen la denominación de origen de esta bebida (existen dos tipos de tequila el 100% agave azul hecho solo con jugos de la especie *A. tequilana* y el “tequila” que contiene solo un 51% procedente de esta especie y el resto es completado con otras fuentes naturales de azúcar) (CRT, 2011). Un caso aparte es el mezcal, otra bebida que junto con el tequila cuenta con denominación de origen, ambas tienen las puertas abiertas para ser productos de alta rentabilidad, como el tequila actualmente lo es, sin embargo el mezcal en el estado de Michoacán no cuenta con la infraestructura y organización de los tequileros, lo que las convierte en actividades con diferencias muy marcadas a pesar de que ambas laboran con destilados provenientes de agaváceas (Vallejo, 2008; Gallardo, 2008).

De los cuatro estados que poseen la denominación de origen del tequila, Michoacán (30 municipios) es el segundo estado con mayor número de municipios después de Jalisco (128 municipios). La regulación del tequila es administrada por el Consejo Regulador del Tequila con sede en Zapopan Jalisco conglomerando a 180 municipios (Jalisco, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas). La elaboración de tequila es una actividad bien establecida, manejada por grandes corporativos que cuentan con una gran organización y elevados estándares de producción, dentro de la industria de los destilados (CRT, 2011).

La producción del mezcal no podría ser más diferente, en el estado de Michoacán se reportó una producción de 300,000 L en el 2008 (aunque quien reporta el dato advierte que es un dato difícil de comprobar, debido a la naturaleza de su elaboración) con un estimado de 700 productores (Vallejo, 2008). Para la elaboración del mezcal se pueden emplear la mayoría de los tipos de agave no como en el caso del tequila, que solo usa *A. tequilana* Weber variedad azul. Muchos de los mezcaleros de Michoacán son pequeños productores que toman la elaboración de este alcohol como una actividad estacional, solo realizada durante los meses de Octubre a Mayo. El organismo que regula la producción de esta

bebida es el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM). Para el 2008 solo los municipios de Tacámbaro, Tzitzio e Indaparapeo estaban organizados en grupos de trabajo con el que deseaban establecerse como figuras legales (Vallejo, 2008).

La creciente demanda de estos licores, que no solo es exigida al interior de México, está relacionada con la actual pérdida de cultivos por acción del hongo *Fusarium* sp. y a la bacteria que causa la pudrición blanda. ¿Cómo es que la rentabilidad de una bebida pueda ser la causa de que agentes patógenos estén acabando con la estabilidad de un cultivo? Se debe en parte a las prácticas agrícolas con las que se propaga el agave para alcanzar las altas cuotas que el mercado le demanda. Por ejemplo en el 2010, la Cámara Nacional de la Industria Tequilera reportó que se exportaron 152.5 millones de litros y de consumo interno aparente 105 millones de litros (CNIT, 2010).

Las agaváceas son plantas xerófitas que poseen largos ciclos de vida, un factor que podría resultar algo molesto en un proceso masificado de no ser porque estos vegetales además de la reproducción sexual, también cuentan con una variante asexual, al menos para el caso *A. tequilana*. Los miembros de la especie *A. tequilana* tienen una elevada actividad meristemática, que los lleva a producir clones naturalmente, estos pueden provenir de sus inflorescencias (bulbilos) y de sus segmentos intrafoliares (hijuelos) (García, 2007). Gracias a esta cualidad, que la mayoría de las agaváceas poseen, es que los agricultores lograron saltar esa brecha en la que tenían que esperar hasta ocho años para que uno de estos vegetales lograra reproducirse, pero a la par se erigió un cuello de botella genético y actualmente se tienen campos llenos de agaves donde todos sus miembros poseen un material hereditario bastante homogéneo (Padilla-Aviña, 2008; Dalton, 2005).

Por otro lado existen especies de agave, como *Agave cupreata*, que es empleado en Michoacán para la producción de mezcal, también en los estados de Guerrero y Oaxaca, en las que hasta ahora no se han reportado mecanismos de reproducción asexual y que debido a esta característica no ha podido ser cultivada de forma masificada, sus poblaciones naturales son pequeñas y aunque la producción de mezcal no es comparable con la del tequila, la sobre explotación del recurso ya repercute en la especie, que presenta tasas de crecimiento menores a uno, es decir que la especie se encuentra en declive aproximándose a la extinción (Ilsey, 2007). No solo es el hombre el único que afecta a *A. cupreata*, García Meneses (2004) indica, que la especie está teniendo problemas para reproducirse naturalmente, que podría estar ocurriendo por falta de polinizadores o que la especie se encuentra bajo los efectos de una depresión endogámica ocasionada por la expresión de alelos recesivos letales, al haber pocos individuos de *A. cupreata* conformando la población



de esta especie vegetal, las fuentes de acervo genético son limitadas y con poca variabilidad. Por si fuera poco lo anterior, los cultivos de *A. cupreata*, como los de *A. tequilana*, son afectados por “pudrición blanda”, que también disminuye la calidad y estabilidad de este cultivo, aunque nunca se han hecho estudios en *A. cupreata* para caracterizar al fitopatógeno que la ocasiona.

La falta de variantes genéticas en un cultivo propicia el que si llegase a asentarse un fitopatógeno especialmente efectivo en uno de los clones que el productor tiene sembrado, este no encontraría mucha resistencia al intentar propagarse entre el resto de las plantas. Todos los clones son en esencia la misma planta a nivel genético y aunque el patógeno logre encontrar variabilidad fenotípica en el resto de la producción, esta diferencia no será un factor relevante como para evitar que se acomode en un ambiente similar al que halló propicio para su desarrollo en la planta que contrajo la enfermedad por primera vez (Padilla-Aviña, 2008).

El hongo *Fusarium* sp. y las bacterias del género *Erwinia*, son ese tipo de oportunistas que han dañado el escenario de la producción del agave, sobre todo el de *A. tequilana*, donde todo estaba listo para que se extendieran como fuego devorando un pastizal (Hernández *et al.*, 2005). Sin embargo las características que presenta la enfermedad en *A. cupreata* y sus agentes causales, hasta la fecha no ha sido un tema abordado con profundidad, cuya descripción del problema mucho le debe a especulaciones que se hacen de la experiencia obtenida con otras especies de agave que presentan patologías similares, por ejemplo se desconoce al agente causal implicado en la “pudrición blanda” que *A. cupreata* presenta.

## **2.2 La pudrición blanda: *Erwinia carotovora*, *E. cacticida* y *E. chrysanthemi***

**2.2.1 *Erwinia carotovora*:** es una bacteria gram negativa, anaeróbica facultativa que no forma esporas, distribuida alrededor de todo el planeta. *Erwinia carotovora* es un fitopatógeno importante debido a su habilidad para producir enzimas pectolíticas en grandes cantidades, estas enzimas le permiten macerar el tejido parenquimatoso de una amplia gama de especies vegetales (Pérombelon y Kelman, 1980).

*Erwinia carotovora* tiene la capacidad de sobrevivir en el suelo a través de los remanentes vegetales que quedan tras la cosecha, generando la posibilidad de infestar el siguiente cultivo que en dicho suelo se emplee. La humedad es su principal canal de dispersión y penetración, siendo las temperaturas entre el intervalo de los 25– 30°C los ideales para el desarrollo de la enfermedad (OEPP/EPPO, 2008).

En agave la enfermedad que provoca esta bacteria se presenta en las pencas basales y el cogollo, deshabilitando la capacidad del agave para generar nuevas pencas (Granado, 1999). Que solo puede ingresar en la planta a través de un corte expuesto, puede emplear un vector animal para transportarse (sobre todo insectos), también el manejo industrial de las plantas puede ser causante de su difusión al ser difícil de evitar el contacto entre las plantas sanas y las que contienen al fitopatógeno, riego y lluvia también podrían cooperar a extenderla (Guss, 1999).

Las medidas que se toman para controlar la enfermedad varían de cultivo a cultivo. Requiriendo un especial cuidado en la higiene y sanidad, durante el desarrollo, de los vegetales con los que se desea trabajar, usualmente con un programa estricto de propagación controlada en el que se produzcan plantas libres de la enfermedad (OEPP/EPPO, 2008).

**2.2.2 *Erwinia cacticida*:** Es un organismo productor de enzimas pectolíticas, gram negativo que no forma esporas, con forma de bastón y capaz de producir una cápsula. Originalmente descubierta como fitopatógena de especies de cactáceas, de ahí el origen de su nombre “cacticida” (Alcorn *et al.*, 1991).

Jiménez *et al.* (2004) reportaron haberla encontrado como agente causal de la “pudrición blanda” que *A. tequilana* presenta, aunque también señalaron que probablemente no era la única bacteria implicada en el cuadro de la enfermedad, pero si la bacteria más patógena para *A. tequilana* de las bacterias que lograron aislar. Toth *et al.* (2001) encontraron que filogenéticamente *E. cacticida* se encuentra más relacionada con *E. carotovora* que con *E. chrysanthemi*.

**2.2.3 *Erwinia chrysanthemi*:** es una bacteria gram negativa, anaeróbica facultativa que no forma esporas, posee una distribución mundial y cualquier tipo de cepa puede desarrollarse en países con temperaturas templadas, donde las plantas sean producidas en campo o invernaderos (OEPP/EPPO, 2008).

Esta bacteria es capaz de producir pudrición blanda, degradando órganos suculentos de un vegetal, tales como raíces y hojas gruesas. Produce marchitez en las partes vasculares de las plantas, colonizando el xilema y volviéndose sistémica dentro del vegetal. Esto último es lo más preocupante cuando se emplea la propagación vegetativa para la producción de algún cultivo, ya que la bacteria se puede dispersar con facilidad al permanecer latente en los tejidos que se usarán para la propagación vegetativa (OEPP/EPPO, 2008).

La detección y métodos de control de *E. chrysanthemi* son similares a los empleados con *E. carotovora*.

### 2.3 Los bacteriófagos

No hay nada más abundante en el planeta que los virus, se les puede encontrar en casi toda el agua disponible en el planeta, además de prácticamente en todas las superficies terrestres. Este tipo de partículas invisibles, compuestas por un ácido nucleico y proteínas, son los causantes de algunas de las enfermedades más problemáticas, además de ser difíciles de controlar, no solo limitándose a perjudicar al hombre mismo, sino también a muchos de los organismos que le prestan un servicio.

Sin embargo pensar en los virus como un mal que debe ser erradicado, es un pensamiento limitado. No fue sino hasta principios de 1900 que se supo de su existencia, irónico que permanecieran ocultos tanto tiempo a nuestro intelecto, tratándose del elemento más abundante dentro de las relaciones biológicas. Y desde el momento en que por accidente hicieron su presentación a la ciencia, se pensó que podrían tener una aplicación práctica, inclusive sin saber en realidad cual era su verdadera naturaleza, pues esto tardaría un poco más en conocerse.

Dos personas dieron con ellos de forma independiente, estas personas son el científico francés D'Hérelle y el inglés Twort. Twort los encontró antes que D'Hérelle en el año de 1915, D'Hérelle daría con ellos hasta 1917. Sin embargo sería este último el que se percataría de que su descubrimiento se trataba de algo nunca antes descrito por el hombre, y también le daría la difusión debida y las primeras aplicaciones prácticas (Duckworth, 1976).

A los virus se les encontró de forma casual, gracias a que ya se había logrado el establecimiento de técnicas para el cultivo de bacterias. Estas técnicas fueron las que llevaron a Twort y D'Hérelle a encontrar virus dentro de algunos cultivos de bacterias con los que estos trabajaban. Los virus ocasionaban lisis sobre las bacterias, y estas lisis eran lo bastante grandes como para dejar calvas o huecos circulares sobre crecimientos uniformes de colonias de bacterias, que eran observables sin el uso de un microscopio. Al principio no sabían que era lo que ocasionaba estas calvas, desconocían si el efecto era debido a otra bacteria presente en el cultivo o alguna enzima producida por las bacterias del medio. Lo único que sabían con certeza, era que el agente que ocasionaba la lisis celular, no era retenido por los filtros disponibles en la época u observable con microscopio alguno. El

primer nombre que se les dio a los virus fue el de bacteriófagos, escogido por D'Hérelle y que quiere decir "que devoran bacterias" (Dublanche y Bourne 2007; Lozano, 2006).

D'Hérelle comprendió que a los virus se les podía dar una aplicación, al colectarlos y emplearlos para destruir colonias de bacterias. Es así como surgió la terapia con bacteriófagos, que apareció en fechas muy cercanas al desarrollo industrial de la penicilina. En occidente los bacteriófagos perdieron la batalla en el mercado contra los antibióticos, debido en parte a que son tratamientos con una alta especificidad, que no permiten que un bacteriófago descubierto pueda ser usado para combatir a varias especies de bacterias, sino solo para un intervalo muy reducido de ellas, mientras que los antibióticos son generalistas y pueden ser aplicados para más de una enfermedad causada por bacterias, ya que no discriminan como lo hacen los bacteriófagos, al no requerir una llave molecular que les permita insertarse en el genoma de las bacterias. Simplemente resultó más sencillo estandarizar el uso de los antibióticos que el de los virus, de los cuales además no se sabía mucho de su estructura y comportamiento. Sin embargo D'Hérelle se empeñó en seguir trabajando con ellos y en sus muchos viajes los llevó a la Unión Soviética, donde serían empleados de forma más amplia y se estandarizarían muchas de las técnicas necesarias para controlarlos (Bunting, 1997).

Con los años caería la Unión Soviética y con ella sus departamentos avocados a la ciencia, en este proceso gran parte de su conocimiento fue sedimentado y olvidado, como sería el caso de los bacteriófagos (Bunting, 1997). Sin embargo en años recientes una nueva generación de científicos occidentales está considerando darle una nueva oportunidad a este tipo de tratamientos, motivados por el desarrollo de resistencia, por parte de las bacterias, a casi cualquier tipo de antibiótico comercial (Phage Therapy Center, 2009).

#### **2.4 ¿Qué caracteriza a un bacteriófago?**

Un bacteriófago es un virus que se caracteriza por escoger células bacterianas como hospederos. Una vez que entra a la célula de la bacteria, puede optar por dos formas de comportamiento, a estas fases se les conoce como lisogénica y lisolítica:

- **Lisogénica:** fase latente que puede adoptar el bacteriófago. El material genético del virus se inserta en la célula bacteriana y a continuación se integra al genoma de la bacteria. Como resultado de este proceso cada que la bacteria realiza la división celular no solo copiará su material genético sino que también el del virus, que se mantendrá indefinidamente unido a la bacteria y pasará a formar parte de la

progenie que llegue a generar. La bacteria no es destruida o muestra algún daño por integrar al bacteriófago, pero puede adquirir nuevas propiedades (Todar, 2008).

- **Lisolítica:** fase destructiva que puede adoptar el bacteriófago. La inserción del material genético es igual que en la lisogénica, pero el bacteriófago secuestra la maquinaria de reproducción genética de la bacteria completamente, avocándola a reproducir solo proteínas y genomas virales, que se ensamblan para formar bacteriófagos nuevos que terminaran por lisar a la bacteria. Una vez que destruyen a la bacteria los nuevos bacteriófagos, salen a buscar más bacterias a las cuales infectar y que también terminarán por destruir. Esta fase es de particular interés para controlar a las bacterias (Todar, 2008) (Figura 1).

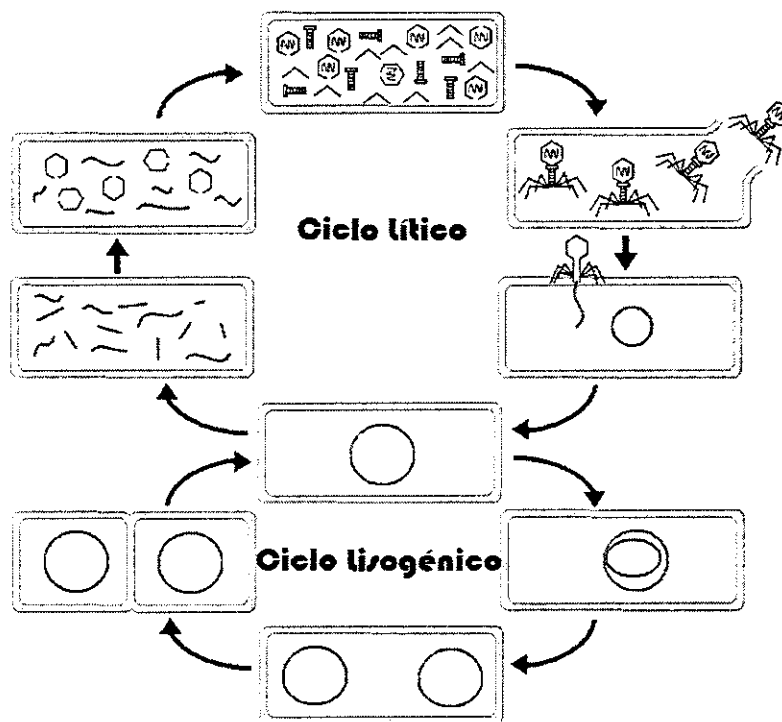


Figura 1. Ciclo biológico de los bacteriófagos (Suñy.12, 2008). Las líneas rojas representan el material genético (ADN) de los virus bacterianos.

## 2.5 Los bacteriófagos en la agricultura

Los bacteriófagos, tras haber sido probados en el campo de la medicina humana, también fueron empleados para combatir plagas agrícolas de origen bacteriano. Mallman y Helmstreet fueron algunos de los primeros en probar dichos tratamientos en el año de 1924 (Tan solo a 9 años del reporte que Twort hizo de su descubrimiento), donde buscaron aislar

bacteriófagos para la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (La bacteria *X. campestris* pv. *campestris* causa una enfermedad común en crucíferas, conocida como “*podrición negra*”), el aislamiento lo hicieron a partir de filtrados de lechugas enfermas, donde con éxito encontraron fagos que ayudaba a inhibir el desarrollo de dicha bacteria (Jones *et al.*, 2007).

El trabajo de Mallman y Hemstreet no fue un caso aislado, sino parte de un verdadero interés de la comunidad científica de principios del siglo XX de experimentar con los bienes que los bacteriófagos podían aportar. Es así como trabajos para controlar plagas propias de la zanahoria, algodón, maíz, entre otros cultivos fueron apareciendo a lo largo de 1900. Pero en general no se consiguió mucho control sobre la técnica, cosechando resultados variables. El entusiasmo y la intuición era lo que tenía en pie a estos trabajos pioneros, y fue la falta de control y entendimiento de los fundamentos del fenómeno lítico lo que terminó por diluir ese entusiasmo. Sin las bases moleculares adecuadas, la búsqueda de un virus para cada patógeno resultaba más exhaustiva que la aplicación de un agente de combate generalista, antibióticos y compuestos de cobre, además de que su aplicación demanda más cuidados, sobre todo en las partes aéreas de las plantas, donde por ejemplo los fagos se vuelven muy vulnerables a radiaciones UV. Los bacteriófagos terminaron por perder la atención del sector industrial, que mejor invirtió en los antibióticos, sellando aparentemente el futuro de las terapias a base de bacteriófagos en el sector agrícola (Jones *et al.*, 2007).

Sin embargo, a principios del siglo XXI la aplicación de bacteriófagos sobre enfermedades causadas por bacterias ha atraído de nuevo la atención, tanto para realizar investigación pública como privada. Debido a la aparición de bacterias más agresivas y de la acción limitada de los tratamientos convencionales. Siendo la agricultura uno de los lugares donde la terapia con bacteriófagos requiere mostrar su validez, pues muchas de las bacterias que hoy presentan resistencia a los antibióticos con que se les combate, aparentemente desarrollan su resistencia en el campo y después pasan infectar a los humanos, a través del consumo y contacto que se tiene con los productos agrícolas (Imal, 2003).

En la agricultura se usan antibióticos de forma abusiva, como métodos preventivos o para el combate directo de las enfermedades, este uso de los antibióticos cada vez está más generalizado, además de que los niveles de antibiótico utilizados para tratar a las bacterias se encuentran siempre en aumento, por la resistencia que estas van desarrollando. Se cree

que de forma indirecta se están generando patógenos humanos más agresivos y resistentes, que pueden estar mezclados entre las bacterias propias de los cultivos a la hora de aplicar los antibióticos y que al estar sometidas a esta presión, también generan resistencia (Imal., 2003). Si los bacteriófagos pudieran mostrar su utilidad en la agricultura, este panorama podría desaparecer y un manejo más saludable del campo se podría conseguir. En el mercado ya comienzan a circular algunos productos elaborados a partir de este principio, como es el caso de la compañía Omnilytics, que dispone de un tratamiento llamado Agriphage contra la bacteria *X. campestris* pv. *campestris* (Omnilytics, 2004). Sin embargo mucho falta por hacer, para incrementar el conocimiento que se tiene en esta área y generar técnicas confiables y fáciles de estandarizar.

## **2.6 Aislamiento y uso exitoso de bacteriófagos para combatir bacterias patógenas en la actualidad:**

Varios son los sectores que actualmente usan terapias a base de bacteriófagos, un ejemplo es el de la acuicultura, donde los bacteriófagos han podido dar uno de los mejores resultados que hasta la fecha son obtenidos, sin duda relacionados con el medio en el cual se desarrolla esta actividad, que es el agua y que resulta un medio idóneo para el mantenimiento y dispersión de los bacteriófagos (Inal, 2003). La acuicultura al igual que la agricultura, antes solo contaba con controles químicos para combatir a las bacterias que la afectaban, estas bacterias con el paso de los años comenzaron a volverse más resistentes y agresivas, al generar resistencia contra los agentes químicos que antes lograban controlarlas y esto trajo consigo pérdidas económicas importantes. La falta de tratamientos alternativos y la urgencia de resolver los problemas que la industria enfrenta, hizo que investigadores como Park *et al.* (2000) Japón, probaran tratamientos a base de bacteriófagos, por ejemplo en el año 2000 estos científicos aislaron dos bacteriófagos para la bacteria *Pseudomonas plecoglossicida* que causa una enfermedad mortal en los peces ayu, cuya crianza es económicamente importante para este país, y concluyeron que un tratamiento en base a estos dos bacteriófagos aislados, evitaba el crecimiento de las poblaciones de *P. plecoglossicida* en el agua, sugiriendo que estos bacteriófagos podrían ser empleados profilácticamente para evitar una transmisión horizontal del patógeno entre las poblaciones de ayu (Park *et al.*, 2000).

No solo en la acuicultura se han podido hacer aislamientos y elaborar tratamientos exitosos con bacteriófagos, actualmente también se han probado para desarrollar tratamientos para humanos, como es el caso de los aislados para la bacteria *Enterococcus*

*faecium* resistente a la vancomicina, que en los hospitales y casas de cuidado de Estados Unidos, resulta un gran problema, al infectar el tracto digestivo de pacientes con un sistema inmunológico deficiente, este trabajo apareció en 2002, obra de los científicos americanos Biswas *et al.*, reportando un 100% de éxito al salvar a los ratones infectados con la bacteria y que fueron probados con el tratamiento, planteando que esta prueba, con las herramientas modernas con las que hoy cuenta la ciencia, podría abrir la posibilidad a nuevos estudios que buscaran bacteriófagos para otras bacterias a las que los antibióticos conocidos ya no les producen ningún efecto. Como es el caso de la muy peligrosa cepa *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina y meticilina (Biswas *et al.*, 2002), que fue por primera vez reportada en el año 2000 en Japón y que causó pánico entre la comunidad médica, al ser el primer caso registrado de una bacteria resistente a la vancomicina (Inal, 2003).

Aún más importante para este trabajo es el que exista un reporte de aislamiento y terapia en base a bacteriófagos para la bacteria *E. carotovora* subsp. *carotovora*, sospechosa de causar la “pudrición blanda” entre las distintas especies de agave del país, el trabajo mencionado fue hecho por Ravensdale *et al.*, en Canadá (2007), que lograron aislar 14 bacteriófagos a partir de soluciones fertilizantes que se empleaban en cultivos de *Zantedeschia* spp., conocidas comúnmente como Callas, que son unas plantas apreciadas por sus flores a las que se les da un valor ornamental. En este estudio Ravensdale *et al.* (2007) lograron reducir los síntomas de la “pudrición blanda” que *E. carotovora* causa en Callas en un 50% o más, mientras que a las bacterias patógenas de Callas lograron reducir su crecimiento hasta en un 97%, siendo esta clase de resultados los que alientan a seguir investigando sobre la materia (Ravensdale *et al.*, 2007). Como estas investigaciones mencionadas, otras tantas están aflorando, solo el trabajo arduo y una mayor dedicación al tema por parte de la comunidad científica, dictaminarán cual será el papel que los bacteriófagos jugarán en la sociedad, aún faltan muchas incógnitas por resolver, antes de que estas partículas virales puedan volverse de uso corriente para las futuras generaciones.

## **2.7 Aislamiento, multiplicación y caracterización de bacteriófagos**

### **2.7.1 Aislamiento y multiplicación de los virus**

Las técnicas de aislamiento de virus en su mayoría tienen características mecánicas, basándose en la diferencia de pesos y densidades que estas moléculas tienen con respecto a las células u otros materiales de los cuales se extraen. Su búsqueda depende de la intuición del investigador, pues no hay metodologías disponibles que permitan rastrear virus líticos que se ajusten a la bacteria para la cual se desean buscar. Idealmente estos virus deberían



encontrarse en los lugares donde la bacteria patógena se distribuye, por lo que las muestras a investigar deberían de estar ligadas al desarrollo de las bacterias con la finalidad de encontrarlos.

Si se tiene éxito y se logra aislar un bacteriófago interesante para la bacteria objetivo, hay que buscar reproducirlo cuantas veces sea posible, para así tener un acervo del agente y otro tanto para pruebas y aplicaciones sobre la bacteria. La forma más sencilla de reproducir al virus, es la de ponerlo en contacto con una colonia de bacterias abundante de la cual es parásito, esto se lleva a cabo en medios de cultivo líquidos para bacterias, de los cuales por metodologías mecánicas al final se podrá obtener un sobrenadante con una población abundante de virus (Van Twest y Kropinski, 2009).

### **2.7.2 Caracterización**

La caracterización más obvia es la de la afinidad que el bacteriófago presentará para una bacteria o grupo de bacterias en particular. También es importante determinar la concentración de partículas virales, la técnica más común para esto es la de ensayos en placas, en donde distintas diluciones de preparados con bacteriófagos son mezclados con colonias de bacterias que sirven de anfitriones, estos después son puestos a crecer juntos en un medio sólido, en el cual las bacterias formarán un tapete que contendrá huecos o claros bien localizados ahí donde los virus hayan llevado a cabo su actividad lítica. Esto no solo permitirá la enumeración de los virus, sino también caracterizar la morfología de su inhibición (forma del halo, tamaño, lisis clara o turbia, etc.) (Kropinski *et al.*, 2009).

También es de gran importancia la caracterización por medio de la microscopía electrónica, que para la visualización de virus fue aplicada en 1940. Es la técnica de tinción negativa para microscopía electrónica, introducida en 1959, la que revolucionaría el estudio de los virus, permitiendo crear una evidencia visual, compararlos, clasificarlos e identificarlos, en ocasiones hasta el nivel de especies. El principio de la técnica de la tinción negativa para microscopía electrónica, consiste en mezclar partículas (bacteriófagos) y una solución densa en electrones de una sal metálica de alto peso molecular y pequeño tamaño molecular. las partículas son integradas a la solución y al ponerlas sobre un fondo oscuro estas se muestran blancas, produciendo un contraste que puede ser fotografiado (Ackermann, 2009).

## 2.8 Aislamiento y caracterización de bacterias

Antes de comenzar con el aislamiento y caracterización de bacteriófagos, hay que tener aislada y caracterizada la bacteria de interés para la cual desean buscarse. Si se desconoce al agente causal, en este caso la bacteria, hay que aislarla a partir de una planta enferma en la cual se sospeche que su enfermedad proviene de una bacteria. Una vez ya aislada hay que proceder a su caracterización e identificación, y posteriormente probar su patogenicidad y virulencia.

Los estudios que se han hecho sobre “*podrición blanda*” en *A. tequilana* ubican a las bacterias *E. carotovora* y *E. cacticida* como los patógenos que causan la enfermedad. Mientras que la especie *Agave cupreata*, que es la especie de interés para este trabajo y que también presenta problemas de “*podrición blanda*”, no posee reportes en donde se haya buscado aislar y caracterizar a la bacteria que ocasiona la enfermedad. Se sospecha que al igual que en *A. tequilana*, la detonante de la enfermedad es *E. carotovora* o alguna otra bacteria del género *Erwinia*, pero hasta la fecha no hay trabajos publicados que corroboren lo anterior.

Para poder hacer un diagnóstico preciso de la enfermedad que *A. cupreata* presenta y no solo hacer especulaciones, hace falta identificar y caracterizar a los agentes causales (Jiménez *et al.*, 2004). Un trabajo que se avocara a esta finalidad, debe tomar en cuenta los postulados propuestos por los científicos Jacob Henle y Robert Koch, que sirven como referencia a cualquier investigación con este propósito.

### 2.8.1 Postulados de Henle-Koch sobre el aislamiento de un agente patógeno

Henle y Koch desarrollaron unos postulados que permiten evaluar la relación causal entre un agente infeccioso y una patología determinada a la cual el agente infeccioso es asociado. Estos postulados fueron presentados entre los años de 1884 y 1890, los tres conceptos básicos de estos postulados pueden ser resumidos de la siguiente manera (Evans, 1976):

- 1) El parásito se presenta en cada uno de los casos de la enfermedad que se está estudiando y bajo circunstancias que toman en cuenta los cambios patológicos y el curso clínico de la enfermedad.
- 2) No se presenta en ninguna otra enfermedad como un patógeno fortuito y no patogénico.
- 3) Después de haber sido completamente aislado del sujeto enfermo y ser continuamente crecido en un medio de cultivo puro, este puede inducir la enfermedad de nuevo.

### 2.8.2 Aislamiento

Para aislar de suelos o tejido vegetal enfermo, en el caso de bacterias del género *Erwinia*, que ocasionan pudrición blanda, se recomienda usar un medio agar selectivo. Esto se hace para restringir la carga de bacterias que pudieran estar presentes en la muestra de la cual se quiere hacer el aislamiento. Si se usara un medio agar rico en nutrientes, como por ejemplo el medio LB, se obtendría una población de bacterias compleja que sería difícil de manejar para el investigador y de las cuales pocas tendrían que ver con la causa de la enfermedad (Cuppels y Kelman, 1973).

El medio a escoger debe estar pensado en base a particularidades que distingan a la bacteria que se está buscando para separarla del resto de las demás. Ingredientes que permitan el crecimiento y desarrollo de la bacteria de interés, pero que restrinjan la aparición de otros organismos más generalistas. Tras terminar esta selección en base a los nutrientes disponibles en el medio, se procede a realizar una caracterización que permite simplificar aún más la muestra de bacterias que se obtuvo durante el aislamiento, que es la caracterización bioquímica, en donde la capacidad de producir ciertas proteínas esenciales para causar un daño tisular en el vegetal es evaluada, estas proteínas son las enzimas celulasa y pectinasa.

### 2.8.3 Caracterización bioquímica

La bacteria que ocasiona la "pudrición blanda" tiene como característica la producción de dos tipos de enzimas, las pectinasas y celulasas, que le ayudan a degradar la pared vegetal. *E. carotovora* produce las enzimas pectato liasa (Pnl), pectin liasa (Pel) y poligalacturonasa (PGL) que le permiten utilizar al pectato (poligalacturonato, PGT) como fuente de carbono, que es un componente importante de las sustancias pécticas que están presentes en las paredes celulares de las plantas superiores (Chatterjee *et al.*, 1985). *E. carotovora* también es capaz de producir celulasa, que no es una enzima conocida por macerar tejidos, pero que sin embargo se cree que contribuye en la virulencia, al aumentar la acción de las pectinasas, ocasionando estrés en aquellas células vegetales que previamente ya fueron dañadas por actividades pectolíticas, y por proveer a la bacteria fuentes de carbono y nitrógeno a través de la degradación de sustancias poliméricas (Murata *et al.*, 1991). La patogenicidad o virulencia de las bacterias fitopatogénicas Gram negativas, depende de la presencia de aparatos de secreción en sus células, a través de los cuales ellas secretan sus proteínas o nucleoproteínas involucradas en la virulencia que son capaces de causar en el apoplasto vegetal o inyectar en la célula anfitriona, al día de hoy cinco de estos sistemas han podido ser descritos, numerados del I al V. En el caso de las enzimas celulasa y pectinasa, ambos

grupos de enzimas son secretados por el Sistema de Secreción Tipo II (T2SS, por sus siglas en inglés) (Buonaurio, 2008).

El sistema de secreción tipo II es codificado por al menos 12 genes y transporta a un grupo de proteínas aparentemente disímiles a través de la membrana externa de la bacteria, en general las proteínas secretadas por este sistema, están relacionadas con la destrucción de varios tejidos, que contribuyen a causar daño celular y enfermedad. La expresión de los genes que codifican para estas proteínas y, en algunas ocasiones, los genes del T2SSII están bajo el control del *Quorum-Sensing* o estrictamente regulados por el ambiente en el sitio donde la bacteria está colonizando. El quorum-sensing es un mecanismo con el cual algunas especies de bacterias controlan la expresión de ciertos genes, en respuesta a su densidad poblacional (Sandkvist, 2001).

Existen dos pruebas sencillas que permiten detectar la presencia de celulasas y pectinasas en una colonia de bacterias. Estas pruebas se llevan a cabo sobre dos medios con agar y la detección de las enzimas se hace por el cambio de coloración que estos sufren durante la prueba. El que permite detectar celulasas es conocido como medio Cel y el que permite encontrar pectinasas se le conoce como Pel.

#### **2.8.3.1 Pruebas de producción de celulasas (Cel)**

Los medios Cel son elaborados con carboximetil celulosa (CMC) y es la degradación de la CMC por las enzimas que pueden producir las bacterias lo que se busca encontrar (Kasana *et al.*, 2008), esta degradación se detecta por medio de un colorante que se une a las moléculas de CMC, dejando sin colorear aquellas zonas que en donde el CMC haya sido degradado (Lamb y Toy, 2005). En los medios empleados en las pruebas Cel se pone a crecer la bacteria que desea ser probada o solo un sobrenadante de un medio donde esta bacteria creció, después estos son bañados con bromuro de amonio hexadeciltrimetil o rojo Congo seguido por cloruro de sodio, según se prefiera. En ambos casos se obtiene una zona de hidrólisis sin colorante, que muestra la acción de la celulasa extracelular (Kasana *et al.*, 2008).

#### **2.8.3.2 Pruebas de producción de pectinasas (Pel)**

Los medios Pel son elaborados con sustratos de pectina o pectato. Y con ellos se detecta la presencia de enzimas pectolíticas o pectinolíticas, al poner a crecer sobre ellos una colonia de bacterias o depositar un sobrenadante que provenga de un cultivo donde las bacterias se desarrollaron, como en las pruebas Cel. La acción de las enzimas puede ser detectada en estos medios observando depresiones en el gel alrededor de donde la colonia crece o donde

el sobrenadante estuvo presente, o con ayuda de una solución precipitante, como el acetato de cobre. Cuando se usa la sustancia precipitante, se forma una zona clara alrededor de las colonias de bacterias capaces de producir pectinasas, donde la sustancia precipitante no pudo hacer su efecto debido a la ausencia de pectina o pectato, mientras que el medio que rodea a las colonias no productoras de pectinasas se torna opaco por acción de la sustancia precipitante, mostrando que la pectina o pectato de estas zonas aún está sin degradar (McFeeters *et al.*, 1992).

#### **2.8.4 Caracterización molecular**

La caracterización bioquímica y fenotípica puede resultar insuficiente a la hora de intentar caracterizar una bacteria. Para eliminar este problema se pueden realizar pruebas que dan un grado mayor de especificidad, entre estas pruebas se encuentra el análisis del espacio intergénico entre los genes altamente conservados que codifican para 16S y 23S y que están presentes en todas las bacterias.

##### **2.8.4.1 ITS “Intergenic Transcribed Spacer”**

Los genes que codifican para 16S y 23S en el ADN ribosomal son comunes en todas las células procariontes y poseen secuencias altamente conservadas, sin embargo la región intergénica entre los genes que codifican para 16S y 23S en el ADN ribosomal, es conocida por ser más variable que los genes estructurales que la flanquean y es por esta característica que es propuesta como una herramienta prometedora para el análisis de varios grupos taxonómicos (Hinrikson *et al.*, 1999). Los genes que codifican para 16S y 23S, al ser comunes y estables, se convierten en un punto de referencia al buscar divergencia entre diferentes organismos a los cuales se desea comparar (Gürtler y Stanisich, 1996). Los métodos que se emplean para el análisis de esta región involucran la amplificación del ADN de la región intergénica entre 16S y 23S, con oligonucleótidos iniciadores dirigidos a regiones altamente conservadas en los genes de 16S y 23S. La región intergénica entre 16S y 23S entre distintas especies puede mostrar una alta heterogeneidad tanto en su longitud, como en la secuencia de sus nucleótidos (Fisher y Triplett, 1999).

Dos técnicas sencillas y disponibles en la mayoría de los laboratorios para el análisis de la longitud de la región intergénica entre 16S y 23S, son las técnicas ITS-PCR y RFLP-PCR. El ITS-PCR (Intergenic Transcribed Spacer) o Espaciador transcrito intergénico es una técnica que permite analizar la región intergénica entre los genes 16S y 23S, por medio de la amplificación de esta región. Aunque solo es una herramienta confiable cuando no se desea profundizar mucho en la filogenia de los organismos con los cuales se trabaja, ya que

la técnica no permite dilucidar bien las diferencias en la región intergénica cuando se trabaja con organismos muy emparentados, como es en el orden de las subespecies, pues la técnica ITS solo muestra la longitud o tamaño total de la secuencia de ADN dentro de la región intergénica, pero no el acomodo de las bases que la conforman (McCullough *et al.*, 1998) (Figura 2).

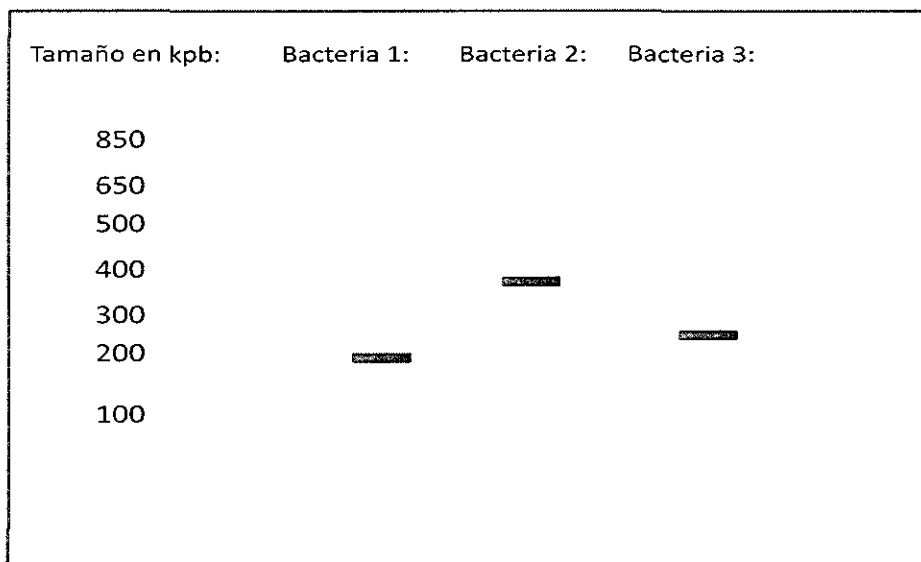


Figura 2. Esquema de una ITS-PCR con tres bacterias hipotéticas, las bacterias supuestamente pertenecen a distintas especies y al ser sometidas a la prueba ITS-PCR, muestran una diferencia notable en el tamaño de su región intergénica 16S-23S.

#### 2.8.4.2 RFLP “Restriction Fragment Length Polymorphism”

Algunas técnicas sencillas de la biología molecular con base en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), como la ITS, permiten caracterizar entre especies que tienen una filogenia muy divergente con facilidad, pero si se desea tener un grado mayor de especificidad resultará insuficiente. Como en el caso de bacterias que posean una filogenia bastante estrecha y que requieran ser analizadas en el orden de las especies o subespecies (Waleron *et al.*, 2002). La técnica RFLP antes ya ha sido utilizada con éxito para la identificación de bacterias pertenecientes al género *Erwinia*, permitiendo clasificarlas en el orden de especies y subespecies de manera práctica y sencilla (Toth *et al.*, 2001) (Figura 3).

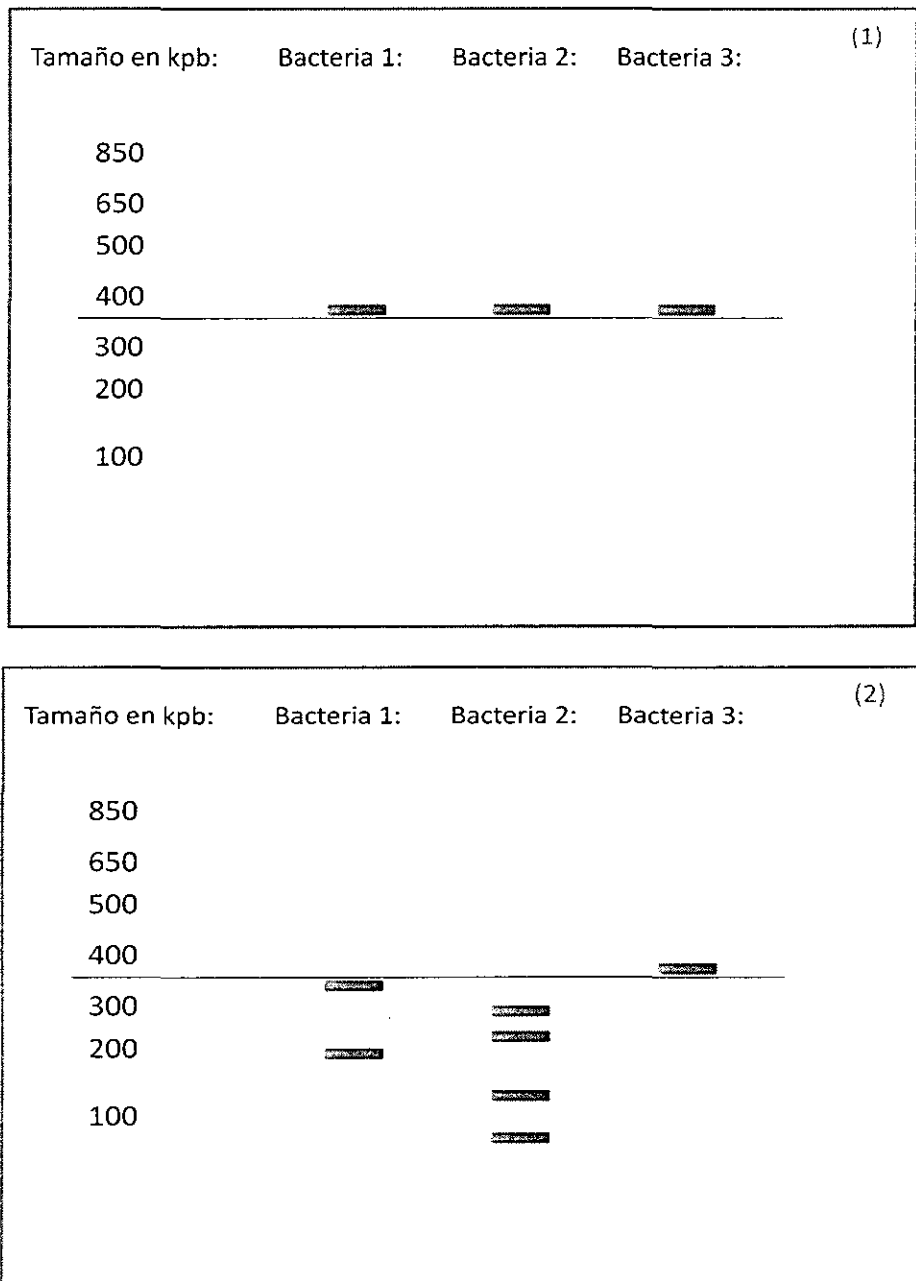


Figura 3. Esquema de la prueba RFLP-PCR. (1) Se muestra a tres bacterias hipotéticas de las que se obtienen fragmentos del mismo tamaño de su región intergénica 16S-23S al utilizar la prueba ITS-PCR y que no permite diferenciarlas entre sí (2) Se muestra tres a las mismas tres bacterias, tras someterse a una prueba RFLP-PCR y usar una enzima de restricción, es posible encontrar diferencias notables entre las tres bacterias hipotéticas.

La técnica del análisis de polimorfismo mediante longitud de fragmentos del polimorfismo (Restricción fragment length polymorphism: RFLP) ayuda a evaluar la variación presente en el ADN sin recurrir a la secuenciación completa de este.

El análisis RFLP emplea enzimas de restricción como su herramienta principal. Las enzimas de restricción son endonucleasas producidas por algunos procariontes. La función natural de estas enzimas es de protección, al destruir moléculas de ADN extrañas que puedan invadir a estos procariontes. Estas enzimas reconocen y cortan secuencias específicas de ADN, que pueden ser de cuatro, cinco o seis bases. La ciencia a estas enzimas les ha dado varias aplicaciones, una de ellas es como herramienta analítica (Weising *et al.*, 2005).

En el análisis RFLP las enzimas de restricción son usadas para digerir una molécula de ADN particular, dando como resultado un juego de fragmentos reproducibles con longitudes bien definidas (Weising *et al.*, 2005).

### **2.8.5 Caracterización por patogenicidad**

Como parte esencial de los postulados de Henle-Koch hay que inocular al agente aislado en un individuo de la misma especie del cual se extrajo, tercer postulado. Para este propósito existen técnicas como la infiltración, en la cual se inyecta a la bacteria, aislada y mantenida en laboratorio, en una hoja modelo del vegetal del cual la bacteria fue aislada y en la que se pueden monitorear todos los eventos que ocurran tras la inoculación (Klement, 1963). Solanilla y Palenzuela proponen que un patógeno exitoso tiene que ser capaz de:

- 1) Entrar en el tejido vegetal a través de aperturas naturales como los estomas o las heridas.
- 2) Sobrevivir en las condiciones desfavorables prevalentes en el apoplasto.
- 3) Utilizar y manipular los recursos de la planta para promover su propio crecimiento (Solanilla y Palenzuela, 2009).



#### 4. Planteamiento del problema

El sistema bajo el que actualmente se produce el agave propició un cuello de botella genético, la aparición de patógenos que pudieran aprovecharse de la situación era fácil de prever. Uno de estos patógenos que apareció es de origen bacteriano, presumiblemente del género *Erwinia*, a quien poco le costó esparcirse entre los cultivos de agave, en el cual está causando pérdidas millonarias.

La zona productora de mezcal del estado de Michoacán es aquejada por esta enfermedad bacteriana, sin que a la fecha se hayan estudiado sus particularidades, la especie *A. cupreata*, de la cual este trabajo se ocupa, es una de las afectadas y su cuadro patológico hasta ahora no ha sido estudiado, cualquier referencia a él se hace en base a lo que ocurre con la especie *A. tequilana*, pero al ser especies distintas, no se puede esperar tener exactamente la misma problemática, hace falta crear una fuente de referencia para la “pudrición blanda” que la especie *A. cupreata* presenta, que no solo ayudaría a comprender mejor a esta especie y el problema con el cual deben lidiar los productores de mezcal, sino también crear un panorama más vasto de esta enfermedad llamada “pudrición blanda” que infecta a las especies de agave presentes en el territorio nacional.

Cuando los cultivos presentan una enfermedad originada por bacterias, el método más común para tratar este tipo de problemas consiste en emplear antibióticos y compuestos de cobre, es costoso y poco efectivo. Además acortan el tiempo por el cual puede ser empleada una tierra de cultivo, ya que limitan el aprovechamiento de los nutrientes del suelo. Estos tratamientos inespecíficos no son solo nocivos para las bacterias que dañan al cultivo, también lo son para el resto de los organismos benéficos con los que el antibiótico o compuesto de cobre entra en contacto. Otros daños colaterales que ocasionan son la destrucción de las comunidades de seres vivos que ayudan a restituir los nutrientes y mantener aireados los suelos, tras su aplicación los antibióticos pueden filtrarse o pasar a cuerpos de agua a los que envenenan, las sustancias también pueden quedar asentadas en el campo por periodos prolongados sin ser degradadas y produciendo intoxicaciones.

El descubrimiento de un grupo de agentes de control específicos y efectivos (bacteriofagos) para las bacterias que causan la pudrición blanda en el agave dentro del estado de Michoacán, podría derivar en la concepción de un tratamiento integral, que ayudaría a prolongar la actividad económica de los mezcaleros y tequileros. Donde se mantendría controlada la “pudrición blanda” causada por bacterias, se reduciría la degradación de los sustratos empleados para la labranza y se protegería la biodiversidad que está asociada al cultivo de esta planta.

## 5. Justificación

Cuando los cultivos presentan una enfermedad originada por bacterias, el método más común para tratar este tipo de problemas consiste en emplear antibióticos y compuestos de cobre, lo que es costoso y poco efectivo. Es importante señalar que una posibilidad es que el mismo medio en donde se produce la pudrición blanda podría contener la respuesta para controlar la enfermedad. Los bacteriófagos representan una respuesta natural a esta demanda, gracias a que son parásitos obligados de bacterias, funcionando como llaves moleculares de alta especificidad que evaden los daños colaterales, que otros agentes contra bacterias pueden causar. Los estudios que se han hecho sobre “*pudrición blanda*” en *A. tequilana* apuntan a las bacterias *E. carotovora* y *E. cacticida* de ocasionar la enfermedad. Mientras que la especie *Agave cupreata*, que es de interés para este trabajo y que también presenta problemas de “*pudrición blanda*”, no posee reportes en donde se haya buscado aislar y caracterizar a la bacteria que ocasiona la enfermedad. Se sospecha que al igual que en *A. tequilana*, la detonante de la enfermedad es *E. carotovora* o alguna otra bacteria del género *Erwinia*, pero hasta la fecha no hay trabajos publicados que corroboren lo anterior.

Por lo anterior en esta investigación se propone describir algunas de las particularidades de la “*pudrición blanda*” que presenta *A. cupreata*, de las cuales no se tiene registro alguno y que ayudaría a los productores a tomar medidas cuando en sus cultivos aparezca, no solo se podría comprender mejor la naturaleza del patógeno bacteriano con este estudio, sino también podría buscarse un bacteriófago asociado a él que podría ayudar a controlar el problema. Esto en base a que la solución disponible en el mercado, alterna a la de los antibióticos y los compuestos de cobre, se vuelve necesario invertir en investigación que proponga nuevas técnicas que capturen el interés de la industria. Por lo que además la investigación para tratamientos en base a bacteriófagos no es una apuesta arriesgada o completamente nueva, ya que su efectividad se ha probado anteriormente para contrarrestar otras enfermedades, con un costo inferior al que se requeriría para el desarrollo de un nuevo antibiótico, sin mencionar las pobres perspectivas que existen de encontrar uno nuevo en un plazo razonable de tiempo.

## **6. Hipótesis**

En los agaves infectados por pudrición blanda en el Estado de Michoacán podrían encontrarse varias bacterias asociadas a la “pudrición blanda” en Agave, cuyo aislamiento y caracterización ayudarán a desarrollar un tratamiento contra la enfermedad al aislar junto con estas a bacteriófagos con una alta actividad lítica.

## 7. Objetivos

Identificar al agente causal de la “pudrición blanda” y aislar bacteriófagos para la bacteria que causa “pudrición blanda” en *A. cupreata* en el estado de Michoacán.

- Colectar tejido de *A. cupreata* enfermo por pudrición blanda en el estado de Michoacán.
- Aislar bacterias a partir de tejido de *A. cupreata* colectados.
- Caracterizar bioquímica, molecular y patogénicamente a las bacterias aisladas.
- Estandarizar técnicas de aislamiento de virus (bacteriófagos).

## 8. Métodos

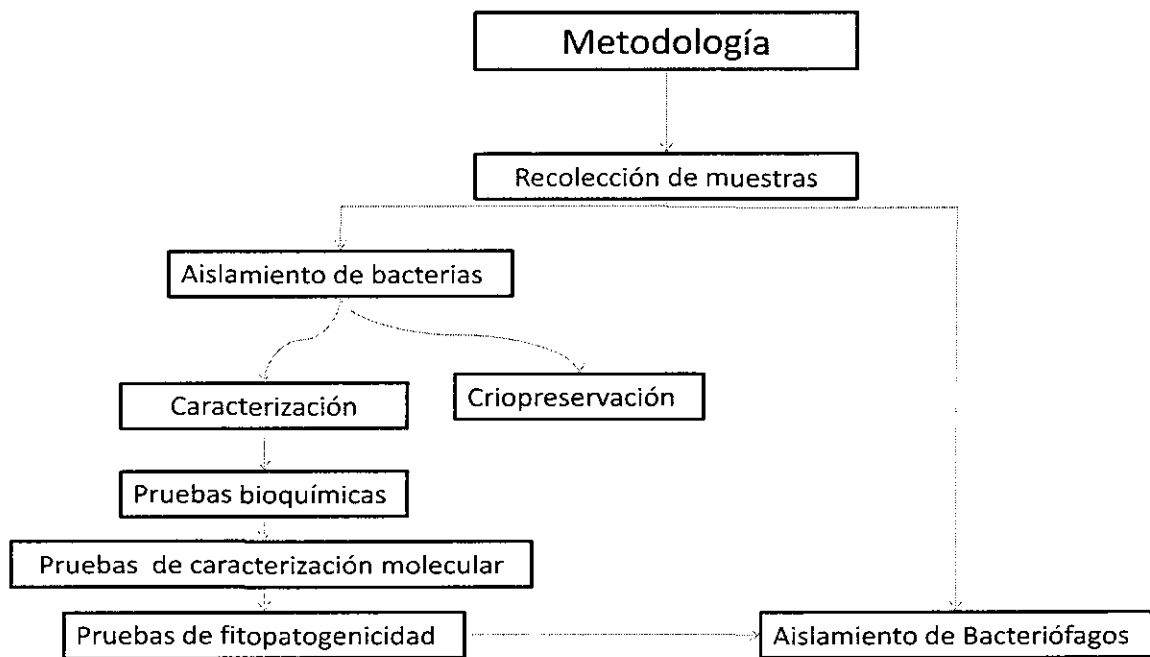


Figura 4. Distintas etapas de la metodología empleada durante esta investigación.

En la Figura 4 se presenta de manera esquemática los pasos generales que se siguieron para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo de investigación.

### 7.1) Cepas de bacterias testigo usadas durante los experimentos:

*Escherichia coli*: cepa de laboratorio (no comercial, aislada y mantenida por el laboratorio de Biotecnología vegetal del CIATEJ), criopreservada junto con medio Luria Bertani (LB) y glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para su crecimiento en medio líquido se usaba medio LB y para su crecimiento en medio sólido LB con agar.

*Dickeya dadantii*: cepa de laboratorio (no comercial, mantenida por el laboratorio de Biotecnología vegetal del CIATEJ) criopreservada junto con medio LB y glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para su crecimiento en medio líquido se usaba medio LB y para su crecimiento en medio sólido LB con agar

*Pseudomonas syringae*: cepa de laboratorio (no comercial, aislada y mantenida por el laboratorio de Biotecnología vegetal del CIATEJ) criopreservada junto con medio King *et al.* (KB) y glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para su crecimiento en medio líquido se usaba medio KB líquido y para su crecimiento en medio sólido KB.

*Pseudomona aureoginosa*: cepa de laboratorio (no comercial, aislada y mantenida por el laboratorio de Biotecnología vegetal del CIATEJ), criopreservada junto con medio Luria Bertani (LB) y glicerol a -80°C. Para su crecimiento en medio líquido se usaba medio LB y para su crecimiento en medio sólido Agar nutritivo (NA).

## 7.2 Aislamiento de bacterias

Antes de comenzar a caracterizar y aislar bacteriófagos, se realizó aislamiento y caracterización de bacterias. el aislamiento de bacterias se hizo a partir de muestras procedentes de agaves enfermos por pudrición blanda, en base a los síntomas característicos como son: un olor fétido, un tejido macerado y un color morado en el cogollo del agave. en algunos casos el daño también se puede extender a la piña del vegetal y en suelos ácidos algunas especies pueden secretar jugo celular (CRT-Comité Técnico Agronómico, 2005).

## 7.3 Colecta y almacenamiento de muestras

Se colectó un total de diez agaves con síntomas de pudrición blanda, todos ellos pertenecían a la especie *A. cupreata*. Procedían de distintos predios ubicados en Michoacán, dedicados a la producción de mezcal. Asimismo se tomaron muestras de suelo en cada uno de estos lugares visitados, con la finalidad de aislar bacteriófagos de ellas. Los predios de los cuales se colectaron los agaves y su ubicación se muestran en el Cuadro 1. La colecta se realizó del 28 de Mayo del 2011 al 2 de Junio del 2011.

Cuadro 1. Predios en los cuales se realizó la colecta del material con el que se trabajaría durante la investigación.

Municipio	Localidad	Predio	Ubicación Geográfica	Altitud (msn m)
Madero	Etúcuaro	El Huizachal	N 19° 25' 31.4'' O 101° 12' 51.4''	1624
Madero	Etúcuaro	Las Campesinas	N 19° 24' 20.1'' O 101° 11' 57''	1537
Morelia- Madero	Tumbisca	El Limón	N 19° 32' 21.4'' O 101° 05' 41.8''	1866
Morelia- Madero	Tumbisca	Agua Dulce	N 19° 32' 4.4'' O 101° 04' 39.4''	2132

#### **7.4 Aislamiento de bacterias en medio M-9+PGA<sup>1</sup>**

Una muestra de tejido enfermo, con un peso de 2 g, fue tomada de los agaves y lavada con una solución solución de agua (90%) e hipoclorito de sodio (10%), tras el lavado fue colocada en un tubo tipo Falcon, con capacidad de 15 mL, junto con agua estéril (aforado a 15 mL) (Mikiciński *et al.*, 2010). El tejido podía estar en estado avanzado de descomposición o medianamente podrido. Los colores de la muestra oscilaban entre varias tonalidades de amarillo y café, en ocasiones el café fue oscuro y de consistencia viscosa. Estas muestras también poseían un penetrante y característico olor a fermento.

Tras colocar el tejido en el tubo con agua, este fue agitado en un vortex por alrededor de 5 min, de este agitado se obtuvo un sobrenadante, del cual se esperaba contuviera bacterias (Mikiciński *et al.*, 2010). Este sobrenadante fue empleado para realizar diluciones seriadas de:  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$  dentro de tubos tipo eppendorf con una capacidad de 2 mL, las diluciones fueron hechas con agua estéril. Al terminar se tomaron 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones y se les colocó sobre cajas de petri con medio selectivo M-9+PGA, donde se les esparcía usando un asa bacteriológica, al terminar la inoculación, se incubaban las cajas de medio con el inóculo durante 3 días.

Pasados los 3 días, se revisaron los cultivos, para observar si presentaban crecimiento de bacterias. Si lo había, se seleccionaban aquellas cajas donde realizar aislamiento de colonias resultara sensato. Ya que se podía llegar a obtener cajas muy saturadas por colonias bacterianas, de difícil diferenciación y de las cuales resultaba casi imposible aislar colonias limpias, sobre todo en aquellos medios M-9 que recibían una inoculación de una muestra sin diluir. Para los aislamientos de colonias se tomaron las últimas diluciones que aún habían provocado crecimiento en el medio, que por lo general contenían colonias mejor diferenciadas y que de cierta forma representaban aquellas que tenían mayor frecuencia poblacional dentro de la muestra. Estas colonias que se tomaron fueron reaisladas a cajas de petri con medio Agar Nutritivo (abreviado NA, por su nombre en inglés Nutrient Agar) (Mikiciński *et al.*, 2010).

#### **7.5 Reaislamiento de colonias en medio selectivo con agar a medio nutritivo NA**

El medio Nutritivo empleado fue de la marca Sigma Aldrich®.<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Para ver los componentes del medio M-9+PGA consultar el Anexo: Componentes de los Medios de Cultivo.

<sup>2</sup> Para ver los componentes del medio NA consultar el Anexo: Componentes de los Medios de Cultivo.

Para el reaislamiento de la colonia y su desarrollo se tomó una colonia con un asa bacteriológica y se hizo una estría en algún punto del medio. después se esterilizó el asa con la ayuda de un mechero. Esterilizada, se hizo otra estría a partir de la última línea trazada con la primera estría, pero en dirección opuesta. Esta operación se repitió una vez más, de forma que al final se obtuvieron tres estrías. Una representación gráfica se observa en la Figura 5.

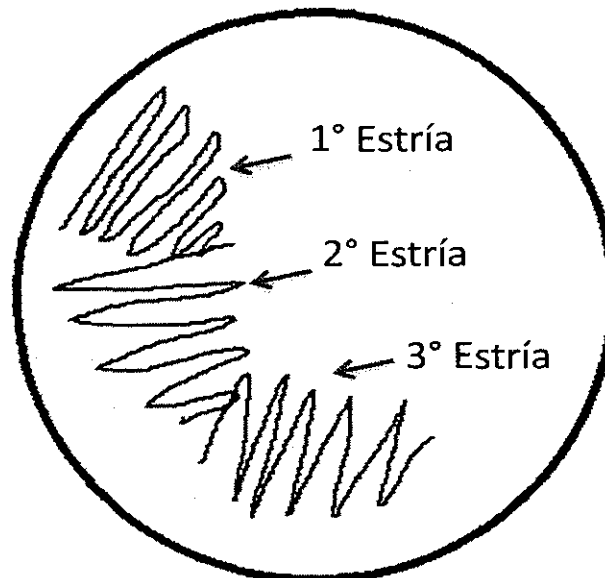


Figura 5. Esquema de las estrías que se hicieron con un asa bacteriológica para sembrar las colonias de bacterias sobre los medios de Agar Nutritivo.

Las estrías en los medios se realizaron para disgregar cualquier asociación de bacterias que pudiera presentarse, ya que en ocasiones lo que se consideraba como una colonia pura, con una sola especie de bacterias conformándola, resultaba en dos o tres asociadas. La primera estría que se trazaba tenía la mayor carga de bacterias, mientras que con las estrías subsecuentes se iba disminuyendo la carga bacteriana, pues se trazaban empleando solo aquellas bacterias que pudieran obtenerse del extremo de la estría anterior, era una especie de dilución de la muestra. Si en efecto aparecía más de una colonia, tan solo se volvían a aislar y se cultivaban en nuevos medios NA hasta desarrollar líneas puras.

Aisladas y purificadas las colonias de bacterias, fueron puestas a crecer en medio líquido LB. A fin de disparar el crecimiento de la colonia y obtener suficientes bacterias como para poder criopreservarlas y hacer pruebas de actividad enzimática.



## 7.6 Crecimiento en medio Luria-Bertani (LB)<sup>3</sup>

En un matraz con capacidad para 125 mL se sirvieron 20 mL de medio LB líquido. Sobre este medio, fue colocada una muestra de las colonias de bacterias obtenidas en el paso de "Reaislamiento de colonias en medio selectivo con agar a medio nutritivo NA". La muestra se tomó con un asa bacteriológica.

Las bacterias en el medio LB líquido, fueron incubadas a 26°C, usando un agitador orbital 200 rpm durante 24 h (ON, overnight), para el crecimiento de las bacterias. El aumento en el número de bacterias permitió obtener suficiente material biológico como para criopreservar una parte y realizar pruebas bioquímicas (Sezonov *et al.*, 2007).

## 7.7 Criopreservación

En viales criogénicos con capacidad para dos mililitros se colocaron 800 µL de glicerol 100% junto con 800 µL de bacterias crecidas durante 24h en medio LB líquido. Al concluir, se agitó para que se mezclaran bien el glicerol y las bacterias, el glicerol evita que cristales de hielo rompan la membrana celular de las bacterias (Hubálek, 2003).

Mezcladas y debidamente etiquetadas, las bacterias fueron guardadas en un ultracongelador (Thermo Scientific, Forma 900 series) a -80°C. Toda muestra fue guardada con una copia, por si el original llega a ser contaminado al trabajar con él.

## 7.8 Caracterización bioquímica: Pruebas enzimáticas

### 7.8.1 Pruebas para detección de Pectinasas (Pel)

Las pruebas para detectar la acción de las pectinasas se realizaron sobre un medio llamado Pel, que fue preparado en forma de gel.<sup>4</sup>

En el medio Pel se hicieron unos orificios empleando un sacabocados. Los agujeros que se hicieron en el medio fueron tantos como bacterias se deseó probar sobre él. En este caso se elaboraron seis agujeros para bacterias desconocidas y dos para bacterias testigo. Las bacterias testigo que se emplearon en todas las pruebas fueron *Escherichia coli* (que fue el control negativo, pues se sabe no produce pectinasas) y *D. dadantii* (que fue el control positivo, conocida como productora de pectinasas). El acomodo de los orificios fue similar al mostrado en la Figura 6.

---

<sup>3</sup> Para consultar los componentes del medio LB, consultar el Anexo: Componentes de los Medios de Cultivo.

<sup>4</sup> Para consultar los componentes del medio Pel, consultar el Anexo: Componentes de los Medios de Cultivo.

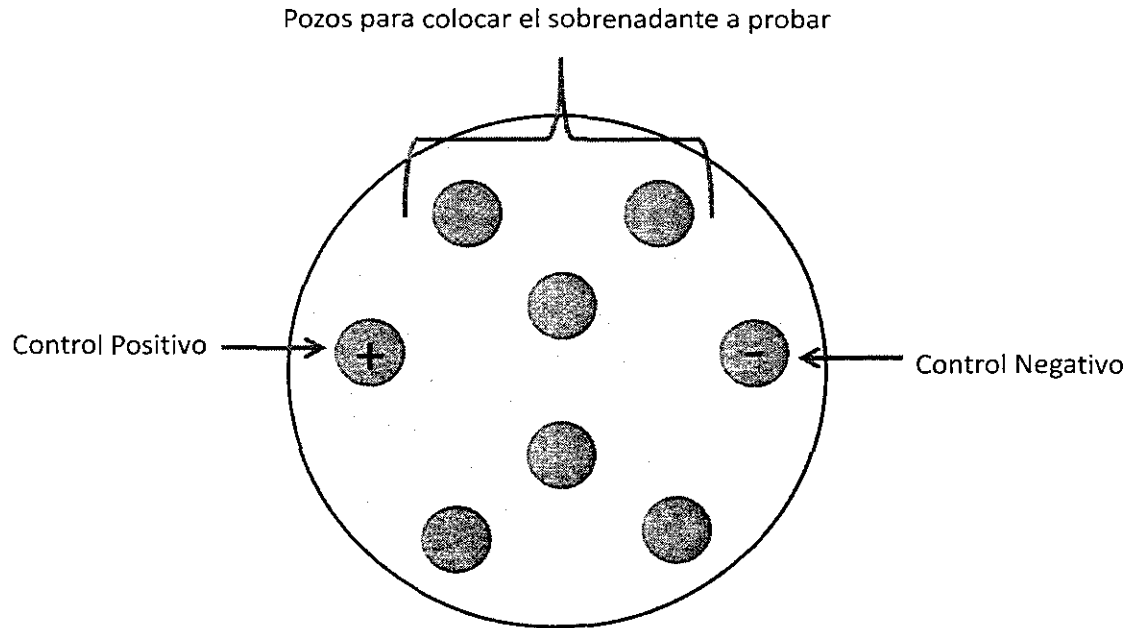


Figura 6. Esquema con el acomodo de los orificios hechos sobre el medio PEL empleando un sacabocados y sobre los cuales se colocó el sobrenadante (control positivo: *D. dadantii*, control negativo: *E. coli*).

En los orificios hechos en los medios Pel se colocó un extracto enzimático. Este extracto se obtuvo haciendo crecer a las bacterias en medio LB líquido durante 24 h, ya crecidas las colonias, de estas se colectaron 1.5 mL que fueron depositados en un tubo tipo eppendorf con capacidad de 2 mL y fueron puestas a centrifugar a 13200 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido fue colocado sobre los pozos, hasta cubrirlos bien, empleando una micropipeta. Se dejó incubar el extracto enzimático en el medio durante 24 h a 26°C. El sobrenadante contenía solo las enzimas de las bacterias, proteínas que fueron separadas por centrifugación, por una diferencia en su densidad, siendo estas menos densas que las células (Ried y Collmer, 1986).

Tras dejar incubar el extracto enzimático por 24h en los orificios del medio Pel, este fue cubierto con Acetato de cobre al 7.5% y dejado en reposo durante 2 h. Concluido el tiempo el acetato de cobre fue removido. El acetato de cobre confirió al medio Pel una coloración azul que permitió detectar la acción de las enzimas pectinasa. Si hubo actividad enzimática alrededor del pozo donde se colocó el extracto, se podía observar un halo color blanco que contrastaba de forma clara con el azul del medio. El halo se generó por la degradación de la pectina del medio, el sulfato de cobre se une a la pectina del medio por lo que no había coloración azul ya que la pectina se degradó, en este caso el acetato de cobre no tiñó pectina (McFeeters *et al.*, 1992). El halo blanco se presentó en todas las pruebas del testigo

positivo *D. dadantii*, mientras que el testigo negativo *E. coli*, no producía halo alguno. La figura que se muestra a continuación representa lo anteriormente descrito, Figura 7.

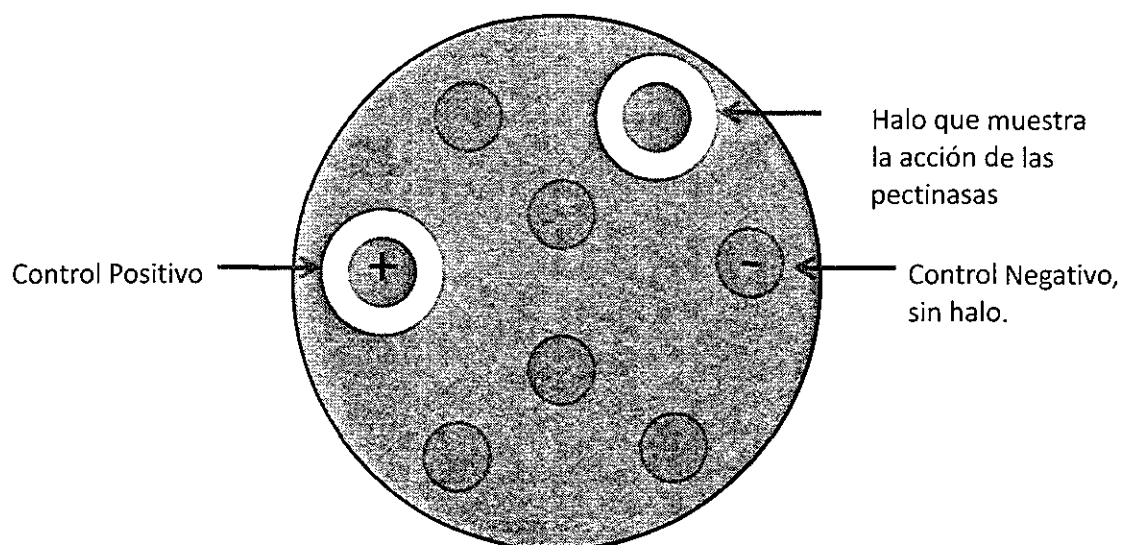


Figura 7. Esquema del revelado de una prueba PEL al terminar la tinción con acetato de cobre, los halos blancos indican actividad enzimática por parte de las pectinasas. La ausencia de halo indicaba que no había actividad de pectinasas (control positivo: *D. dadantii*, control negativo: *E. coli*).

Variante usando medio M9+PGA líquido<sup>5</sup> para el crecimiento de las bacterias:

Esta variante empleó el medio selectivo M9+PGA líquido para crecer a las bacterias, en lugar de emplear el medio rico LB.

Con esta variante se probó la capacidad de producir pectinasas que las bacterias aisladas tenían. Las bacterias al ser probadas en medio LB, donde todos los nutrientes que necesitan les son fácilmente provistos, puede que no reciban un estímulo que les induzca a producir la enzima pectinasa. Si es que tienen la capacidad para producirla. Mientras que al solo darles la opción de obtener su fuente de carbono del PGA que contiene el medio M9+PGA, puede que esta limitante sea el estímulo que las bacterias necesitan para finalmente producir la enzima pectinasa.

Bacterias como *D. dadantii* pueden producir enzimas pectinasa tanto si son crecidas en un medio rico, LB, como si son crecidas en un medio mínimo, M9+PGA. Es decir que las colonias de *D. dadantii* producen las enzimas pectinasa durante todas las etapas de su desarrollo, y no solo cuando reciben un estímulo que les indica que necesitan producirla, es

<sup>5</sup> Para ver los componentes del medio M-9+PGA líquido consultar el Anexo: Componentes de los Medios de Cultivo.

por eso que funciona como control positivo. Pero otras bacterias no funcionan así y requieren de un estímulo para comenzar a producir la enzima pectinasa (Liu *et al.*, 1999).

### 7.8.2 Pruebas para detección de Celulasas (Cel)

Estas pruebas se llevaron a cabo sobre un medio denominado Cel, que fue preparado en forma de gel.<sup>6</sup>

En el medio Cel como en el medio Pel, se hicieron unos orificios empleando un sacabocados. Los agujeros que se hicieron en el medio fueron tantos como bacterias se deseó probar sobre él. Se elaboraron seis agujeros para bacterias desconocidas y dos para bacterias testigo. Las bacterias testigo que se emplearon en todas las pruebas fueron *E. coli* (que fue el control negativo, pues se sabe no produce celulasas) y *D. dadantii* (que fue el control positivo, conocida como productora de celulasas).

Al igual que en las pruebas Pel, sobre estos medios se usó un extracto enzimático que se obtuvo de las bacterias crecidas durante 24h en un medio líquido, LB, y después centrifugadas a 13200 rpm (Ried y Collmer, 1986). Los orificios del medio fueron cubiertos con el sobrenadante y dejados en incubación 24 h. Concluido el tiempo de reposo con el extracto a los medios se les dio un baño con Rojo Congo al 0.2% y se les dejó 1 h con el colorante, pasado este lapso de tiempo se removió el Rojo Congo que no había podido ser absorbido por el medio (Kasana *et al.*, 2008). A continuación se les dio otro baño a los medios, esta vez con ácido clorhídrico (HCL) al 1 M, en cuanto el ácido entró en contacto con el medio ocurrió un oscurecimiento en la coloración, los medios pasaron de ser color rojo, dada por el Rojo Congo, a ser de una tonalidad azul obscuro, se les dejó reposar 5 min con el ácido clorhídrico. Al concluir los 5 min se les retiró el ácido clorhídrico y se les dio un baño final con cloruro de sodio 1 M (NaCl). A los medios se les dejó a reposar 24 h para que secan bien (Sazci *et al.*, 1986).

Finalizadas las 24 h de reposo, las pruebas fueron revisadas. En ellas se apreciaron halos alrededor del control positivo, los halos fueron color azul rey y solo se apreciaron bien a contraluz, si otra bacteria presentaba un halo como el del control, esto indicaba que también esta bacteria tenía la capacidad de producir celulasas, ya que los halos representan los lugares donde la carboximetil celulosa del medio había sido degradada por acción de una enzima celulasa, el control negativo, no presentó halo alguno (Lamb y Toy, 2005) (Figura 8).

---

<sup>6</sup> Para consultar los componentes del medio Cel, consultar el Anexo: Componentes de los Medios de Cultivo.

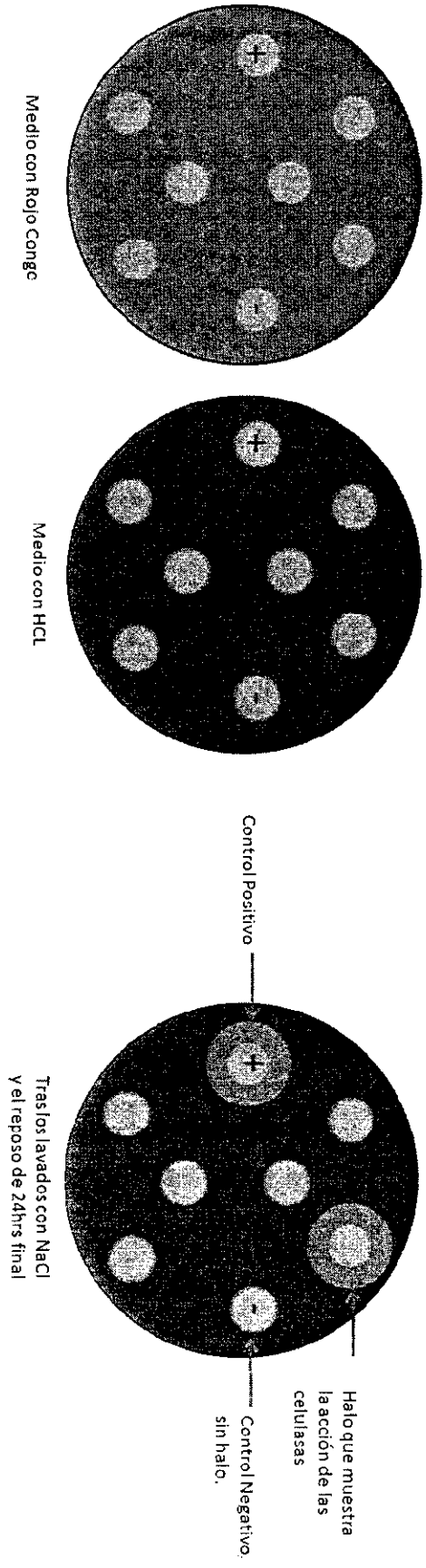


Figura 8. Esquema del revelado de una prueba Cel al terminar la tinción con rojo congo y la posterior coloración que obtenía al bañarla con HCL. Es tras la adición del HCL que los halos aparecían, siendo estos de una tonalidad azul rey, que indicaban la actividad enzimática por parte de las celulasas. La ausencia de halo indicaba que no había actividad de celulasas (control positivo: *D. dadantii*, control negativo: *E. coli*).

Variante usando medio M9+PGA líquido para el desarrollo de las bacterias:

Esta variante empleó el medio selectivo M9+PGA líquido para crecer a las bacterias, en lugar de emplear el medio rico LB.

Que al igual que en la variante que se usó para las pruebas Pel, se usó para causar una situación que estimulara la secreción de enzimas, que en un medio rico como el LB tal vez no se propiciaría ya que todos los nutrientes que necesitan las bacterias para su sobrevivencia y desarrollo les son fácilmente provistos, sin que la bacteria necesite generar alguna proteína que le permita hacerlos asequibles. En el medio M9+PGA, las bacterias ven limitados los recursos de los cuales pueden obtener carbono y esta situación puede llegar a ser el estímulo que lleve a las bacterias a producir la enzima celulasa, que de otra forma, al no necesitarla o recibir señales que induzcan su producción, no sería posible de encontrar (Pardee *et al.*, 1959).

## **7.9 Caracterización por ITS-PCR**

### **7.9.1 Extracción de ADN**

El primer paso que se hizo antes de realizar la prueba ITS-PCR, fue la extracción del ADN, que es el elemento clave para realizar la prueba. Para la extracción se empleó el protocolo de preparación de ADN genómico para bacterias Gram negativas de Wen-ping Chen y Tsong-teh Kuo (1993).

Un volumen de 1.5 mL de cultivo LB saturado de bacterias fueron tomados y depositados en un tubo de 2 mL, y luego centrifugados a 12000 rpm durante 3min. Centrifugada la muestra, se tiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla restante en 200 µL de “*buffer de lisis*”<sup>7</sup>, con el cual se lisaron las células haciendo un pipeteo vigoroso.

Para eliminar la mayor cantidad de proteínas y restos de células posibles, se agregaron 66 µL de una solución de NaCl 5 M y se mezclaron bien. Terminado este paso, la muestra fue sometida nuevamente a centrifugación, 12000 rpm durante 10min a 4°C. Tras la centrifugación se recuperó el sobrenadante y fue transferido a otro tubo de 1.5 mL, ahí se le agregó una cantidad de cloroformo igual a la del sobrenadante obtenido. El cloroformo y el sobrenadante fueron mezclados por medio de inversiones, hasta obtener una solución lechosa, al menos se invirtieron los tubos unas 50 veces. Acabado este paso se centrifugó las muestras, a 12000 rpm durante 3 min, el sobrenadante que se obtuvo fue recuperado y pasado a otro tubo de 1.5 mL, a estos sobrenadantes se les agregó etanol (EtOH) 100% y se

---

<sup>7</sup> Consultar composición de *buffer de lisis* en el Anexo 2: Buffers.

agitó en vortex durante 1 min, con lo cual se precipitó el ADN. Para finalizar se le dieron dos lavados con EtOH 70%, y tras el lavado se dejaron secar, hasta que no quedó alcohol dentro del tubo (Chen y Kuo, 1993). Finalmente el ADN fue redisoluelto con agua ultrapura, esta fue la única variante con respecto a la metodología de Cheng y Kuo (1993), en el cual se redisolvió el ADN en 50  $\mu$ L de 1X TE Buffer.

### 7.9.2 PCR para ITS

Para la ITS se hizo una PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), que es una técnica en la cual se amplifica una secuencia pequeña de ADN. En esta técnica se amplificó una sección selecta de ADN, conocida como “templado”, por medio de un termociclador, que calienta y enfría rápidamente los tubos en los cuales se lleva a cabo la reacción, generando el ambiente propicio para llevar a cabo la reproducción del fragmento. Las reacciones que se realizan dentro del termociclador se pueden agrupar en tres pasos:

- 1) Desnaturalización: La doble cadena del ADN es derretida a una temperatura cercana a los 94°C, de forma que termina separándose en dos cadenas sencillas de ADN.
- 2) Alineamiento: El termociclador pasa a una temperatura media (54°C), y es en este paso en que los oligonucleótidos empleados en la reacción se alinean al templado (la secuencia de ADN que se desea copiar). Terminado el alineamiento de los oligonucleótidos, la polimerasa se une al templado y comienza a copiarlo.
- 3) Amplificación: El termociclador alcanza una temperatura de 72°C, y es a esta temperatura en que la polimerasa muestra mayor eficiencia.

Por PCR se amplificó la sección intergénica que se encuentra entre los genes 16S y 23S altamente conservados. En la amplificación se usó los oligonucleótidos o iniciadores G1 (5'-GAAGTCGTAACAAGG-3') cuyo alineamiento se encuentra corriente arriba, en una sección inmediatamente adyacente al espaciador entre 16S y 23S, a 30 o 40 nucleótidos corriente arriba del límite del espaciador y el L1 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3' que es la más preservada en 23S) que se alinea corriente abajo a unas 20 bases del límite del espaciador (Toth *et al.*, 2001).

Las reacciones de PCR se hicieron en volúmenes de 25  $\mu$ L, para cada uno de los ADN de bacterias que fueron sometidos a este procedimiento, empleando una concentración 100 ng-  $\mu$ L<sup>-1</sup> de ADN. El Cuadro 2 muestra los componentes de la reacción y la cantidad que representaron dentro del volumen total:

Cuadro 2. Componentes de la reacción PCR, volumen y concentración final que representaban dentro de la reacción.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración
Buffer DreamTaq™ 10x	2.5	(consultar Anexo II)
Mezcla de dNTP's	2	0.2 mM
Oligonucleótido G1	2	0.5 mM
Oligonucleótido L1	2	0.5 mM
Templado de ADN(100 ng- $\mu\text{L}^{-1}$ )	1	100 ng
ADN polimerasa DreamTaq™	0.2	1.25 u <sup>8</sup>
Agua ultrapura	15.3	-
Volumen total	25	-

La reacción se planeó usando como referencia el instructivo del proveedor de la ADN polimerasa termoestable, “*DreamTaq™ DNA polymerase*” (Fermentas). Las temperaturas, tiempos y ciclos programados en el termociclador empleados fueron los que se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. temperaturas, tiempos y ciclos programados en el termociclador para la prueba PCR.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	1 min 30 s	1
Desnaturalización	95°C	30 s	36
Alineamiento	53°C	30 s	36
Amplificación	72°C	1 min	36
Amplificación final	72°C	5 min	1

### 7.9.3 Electroforesis y procesamiento de imagen para ITS-PCR

Para la electroforesis se elaboró un gel de agarosa al 0.8%, que fue colocado junto al buffer TAE<sup>9</sup> 1X en una cámara de electroforesis. Las ITS-PCR fueron colocadas en sus respectivos pozos junto a un buffer de carga y una escalera de ADN de 1 kb (Sigma-Aldrich) con las que serían comparadas, para cuantificar su tamaño, a continuación se realizó la migración de las muestras, aplicando un voltaje de 80 volts para este propósito, durante 40 min.

<sup>8</sup> u: unidad, una unidad de la enzima catalisa la incorporación de 10 nmol de dextrinucleótidos en una fracción polinucleótida (absorbida en DE-81) en 30 min a 70°C.

<sup>9</sup>Consultar composición de *buffer TAE* en el Anexo 2: Buffers.



Terminada la electroforesis se hizo el procesado de la imagen, primero se puso el gel en una solución de bromuro de etidio, y se le dejó reposar 30 min, se lavó con agua y se colocó en un transiluminador marca BIO-RAD™ modelo Universal Hood II, la imagen de bandas obtenida se analizó con el programa Quantity One™.

## 7.10 Caracterización por RFLP-PCR

### 7.10.1 Extracción de ADN

Se usó la metodología descrita en el apartado 7.9.1

### 7.10.2 PCR para RFLP

Para tener suficiente ADN con el cual trabajar se hizo una PCR, en donde se copio la sección intergénica entre los genes que codifican para 16S y 23S, altamente conservados. Para esta amplificación se usaron los oligos G1 (5'-GAAGTCGTAACAAGG-3') y L1 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3'), al igual que en la PCR para ITS-PCR (Toth *et al.*, 2001). Solo que las reacciones se prepararon al doble de volumen, es decir 50  $\mu\text{L}$  para cada uno de los ADN probados, la concentración del ADN empleada también fue de 100 ng-  $\mu\text{L}^{-1}$ . Para consultar los componentes de la reacción consultar el Cuadro 2, que se encuentra en el apartado 7.8.2.

Los tiempos y ciclos de la PCR se describen en el Cuadro 3, ubicado en el apartado 7.9.2.

### 7.10.3 Purificación del ADN

Para la purificación del ADN se usaron columnas de purificación, comercialmente conocidas como *Wizard® PCR Preps DNA Purification System* (Promega).

### 7.10.4 Restriction Length Polymorphism (RFLP)

La enzima seleccionada para la RFLP fue *HinFI* (Biolabs), cuyo sitio de restricción es el siguiente:

5'...G'ANTC...3'

3'...CTNA,G...5'<sup>10</sup>

---

<sup>10</sup> La letra "N" dentro de la secuencia representa una región variable, es decir que ese lugar lo puede ser ocupado por cualquiera de las siguientes bases: Guanina, Adenina, Citocina y Timina

La enzima HinFI se seleccionó por su disponibilidad en el laboratorio y porque era una enzima de restricción común para la región intergénica de los genes que codifican para 16S y 23S de las bacterias que se usaban como testigos en la prueba (*D. dadantii*, *Pseudomona psyringae* y *E. coli*).

HinFI genera un total de 6 fragmentos en *D. dadantii* (tamaño de los fragmentos: 509, 255, 248, 169, 105 y 90 kpb) aunque como 4 de ellos tienen tamaños similares (255 y 248 kpb, 105 y 90 kpb) puede que al hacer la electroforesis y su revelado solo se vean 4 fragmentos finales, formando un solo bloque aquellos que tienen un tamaño similar. En *P. psyringae* se generan 2 fragmentos (tamaño de los fragmentos: 414 y 137 pb) y para *E. coli* 5 fragmentos (tamaño de los fragmentos: 440, 228, 194, 154 y 93 kpb).

Para hacer la digestión del ADN de las bacterias con la enzima HinFI, se hizo la preparación que se encuentra en el Cuadro 4, en un volumen de 25  $\mu$ L para cada reacción.

Cuadro 4. Componentes, volumen y concentraciones necesarios para llevar a cabo la digestión del ADN.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)	Concentración
NEBuffer 4 <sup>11</sup>	2.5	(consultar Anexo II)
ADN (100 ng/ $\mu$ L)	18	5.6 $\mu$ g
HinFI (10000 U/ $\mu$ L)	1.12	112 u <sup>12</sup>
Agua ultrapura	3.38	-
Volumen total	25	-

La reacción se llevó a 37°C y se incubó durante 1h. Terminado el tiempo de reposo, en el cual se esperaba la enzima HinFI digiriera el ADN, se migraron las muestras a través de una electroforesis.

<sup>11</sup>Consultar composición de *buffer NEBuffer 4* en el Anexo 2: Buffers.

<sup>12</sup> u: unidad, una unidad es definida como la cantidad de enzima requerida para digerir 1  $\mu$ g de  $\lambda$  ADN en 1 h a 37°C en una reacción total de 50  $\mu$ l.

### 7.10.5 Electroforesis y procesamiento de imagen para RFLP-RFLP

El procedimiento y equipo fue el mismo que se usó en la “Electroforésis y procesamiento de imagen para ITS”, que se encuentra en el apartado 7.9.3, con la excepción de la concentración del gel de Agarosa, que para la RFLP-PCR fue del 2%.

## 7.11 Pruebas de patogenicidad

### 7.11.1 Infiltración

#### 7.11.1.1 Preparación de las bacterias

Las bacterias que se emplearon para la infiltración fueron crecidas previamente, en medio LB líquido, durante 24 h en un agitador orbital a 200 rpm a 26°C.

Una vez crecidas las colonias, fueron tomadas y su densidad óptica ajustada a 2 en un tubo de 1.5 mL. Ajustada la densidad óptica se centrifugaron, el sobrenadante fue retirado con una micropipeta y la pastilla con bacterias resuspendida en buffer fosfato de potasio<sup>13</sup> a una concentración 50 mM, empleando una micropipeta. De este concentrado de bacteria en buffer de fosfato de potasio a una densidad óptica de 2, se hacían dos diluciones seriadas ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ). La dilución final ( $10^{-2}$ ) fue la dilución con la que se hizo la infección de las hojas.

#### 7.11.1.2 Preparación de las hojas

Las hojas que fueron seleccionadas para la prueba fueron lavadas delicadamente en una solución de agua (95%) e hipoclorito de sodio (5%), tras el lavado se enjuagaron 2 veces con agua destilada. Finalmente se secaron y etiquetaron según su tratamiento.

#### 7.11.1.3 Infiltración

*Saintpaulia ionantha* Wendl (Violetas Africanas)

Con una aguja estéril se hizo una perforación en el haz de la hoja, la perforación fue hecha con delicadeza y sin que atravesara por completo la hoja. La perforación se hizo cerca de su base, al lado izquierdo de su enervadura (Figura 9).

En el lugar de la perforación se colocaron 10 µL del inóculo preparado a partir de la segunda dilución de bacteria ( $10^{-2}$ ), que se explicó en “preparación de bacteria”. Finalmente se monitoreó la hoja.

<sup>13</sup>Consultar composición de *buffer fosfato de potasio* en el Anexo 2: Buffers.

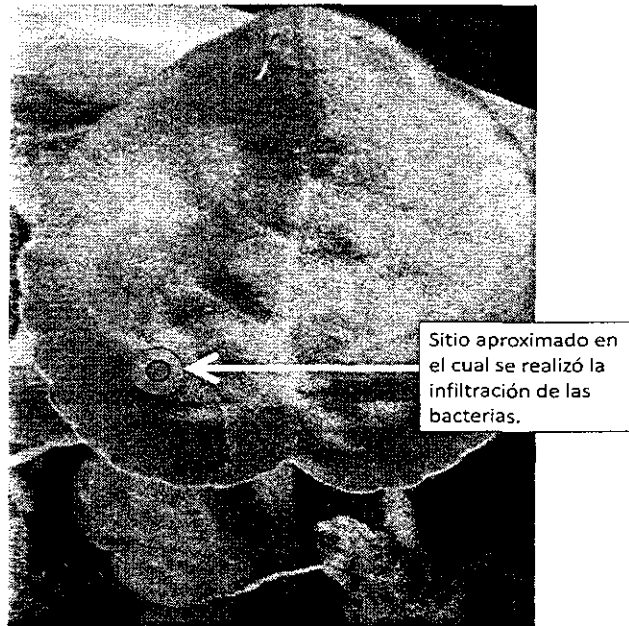


Figura 9. Sitio en el que se realizaron las infiltraciones, en las hojas de violeta africana, las bacterias que se infiltraron fueron *D. dadantii*, *P. aureoginosa*, BV264, BV311 y BV313.

Las bacterias usadas para esta prueba fueron BV264, BV313 y BV311, como testigo positivo se empleo a *D. dadantii* y como testigo negativo a la bacteria *Pseudomona aureoginosa*. De la prueba se hicieron un total de 10 repeticiones (50 plantas en total), sobre una hoja de ejemplares completos.

#### *Cichorium endivia* L. (Endivias)

En el haz de la hoja de endivia se hizo una perforación con una aguja estéril, a mitad de la longitud de la hoja y sobre la enervadura, la perforación fue hecha delicadamente y sin traspasar la hoja (Figura 10).

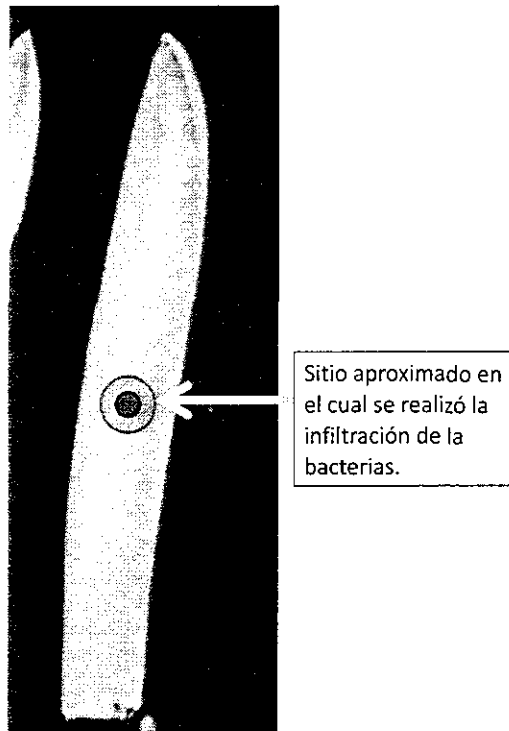


Figura 10 Sitio en el que se realizaron las infiltraciones, en las hojas de endivia, las bacterias que se infiltraron fueron *D. dadantii*, *P. aureoginosa*, BV264, BV311 y BV313.

Sobre la perforación se colocaron 10  $\mu$ L de la segunda dilución de bacteria, como en las violetas africanas.

BV264, BV313 y BV311 fueron las bacterias que se probaron. su testigo positivo fue la bacteria *D. dadantii* y su testigo negativo la bacteria *P. aureoginosa*. Se hicieron 10 repeticiones de la prueba (50 hojas en total), usándose solo hojas del vegetal y no organismos completos.

#### *Agave tequilana* y *Agave cupreata*

Las perforaciones fueron igualmente hechas sobre el haz de la hoja, a mitad de la longitud de esta, procurando que quedara lo más centrada posible (Figura 11).

La cantidad de bacteria diluida que se colocó en la perforación era la misma que la de violetas africanas y endivias.

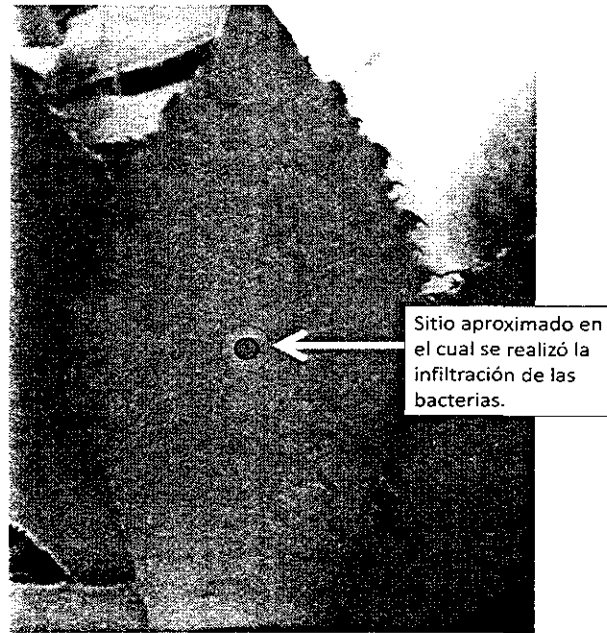


Figura 11 Sitio en el que se realizaron las infiltraciones, en las hojas de *A. cupreata*, las bacterias que se infiltraron fueron *D. dadantii*, *P. aureoginosa*, BV264, BV311 y BV313.

BV264, BV313 y BV311 fueron las bacterias que se probaron. su testigo positivo fue la bacteria *Dikeyudadantii* y su testigo negativo la bacteria *P. aureoginosa*. A la prueba además se agregó otra cepa de bacterias desconocidas, llamada BV07. Se hicieron 20 repeticiones de la prueba (120 hojas en total), usándose solo hojas del vegetal y no organismos completos.

## 7.12 Inoculación de la bacteria usando como vehículo *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhaal (picudo negro del agave)

### 7.12.1 Limpieza y desinfección de los insectos

A los escarabajos *S. acupunctatus* se les dieron lavados con una solución de agua destilada estéril e hipoclorito de sodio al 10%, primero se bañó a los insectos sumergiéndolos en la solución de agua e hipoclorito de sodio durante 5 seg aproximadamente, después fueron enjuagados en agua destilada estéril, este procedimiento se hizo por triplicado con cada insecto. Finalmente se dejaron secar y reposar durante 24 h.

Tras la primera sesión de baños se realizó una segunda etapa de limpieza, esta vez empleando antibióticos, ampicilina y cloramfenicol. Para la limpieza con antibióticos se preparó una solución 150 mL de agua destilada con 300  $\mu$ g de ampicilina y otra solución con 150 mL de agua destilada con 75  $\mu$ g de cloramfenicol, a los insectos primero se les bañó en la solución con ampicilina y después se le enjuagó con agua destilada estéril, el

procedimiento se hizo por triplicado. tras esta sesión de desinfección se dejó reposar a los insectos, a continuación se les volvió a bañar, esta vez con cloramfenicol, también esta parte se hacía por triplicado. A los insectos se les dejó reposar 24 h para su uso posterior, ya fuera como testigos de las pruebas, limpios y desinfectados, o como escarabajos a los que se les haría ingerir un medio con bacteria.

### **7.12.2 Preparación del medio agar con azúcar y bacteria que se dio como alimento a los insectos**

Las bacterias que fueron usadas para la prueba fueron crecidas en medio LB líquido durante 24 h en un agitador orbital (200 rpm, 28°C), tras crecer se ajustó su densidad óptica a 1 y fueron agregadas a un medio agar con azúcar cuando la temperatura de este tras ser preparado era lo suficiente como para no solidificar, pero no muy alta como para matar a las bacterias, los medios fueron preparados a un volumen final de 30 mL.<sup>14</sup>

Tras la solidificación del medio, los insectos fueron tomados y agregados a este, dejando que ellos se alimentaran 24 h (Figura 12).



Figura 12. *S. acupunctatus* en medio agar con azúcar y bacteria inoculada, del cual se están alimentando.

### **7.12.3 Tratamiento del insecto inoculado con bacterias en *A. cupreata***

---

<sup>14</sup> Para consultar los componentes del medio agar con azúcar y bacteria, consultar el Anexo: Componentes de los Medios de Cultivo.

Los agaves de la prueba fueron lavados y preparados en cajas donde fueron mantenidos junto a los insectos, los insectos fueron tomados con delicadeza y colocados sobre las hojas de las plantas sanas, se colocó un insecto por planta. Las cajas fueron selladas y monitoreadas durante dos semanas.

Para el experimento se formó un total de 3 grupos, cada grupo estaba formado por 6 ejemplares sanos de *A. cupreata* y a cada uno de ellos se les depositó un escarabajo *S. acupunctatus*, es decir un total de 6 escarabajos por grupo (uno por cada planta). Los grupos eran diferentes en cuanto a la preparación de los insectos (Figura 13).

Los insectos del 1° grupo fueron alimentados con un medio agar con azúcar que contenía a la bacteria *D. dadantii*, los del 2° grupo fueron alimentados con un medio agar con azúcar que contenía a la bacteria BV311 y los escarabajos del 3° grupo no fueron alimentados con ningún medio o bacterias, estos fueron desinfectados y su función era la de ser testigos de la prueba.

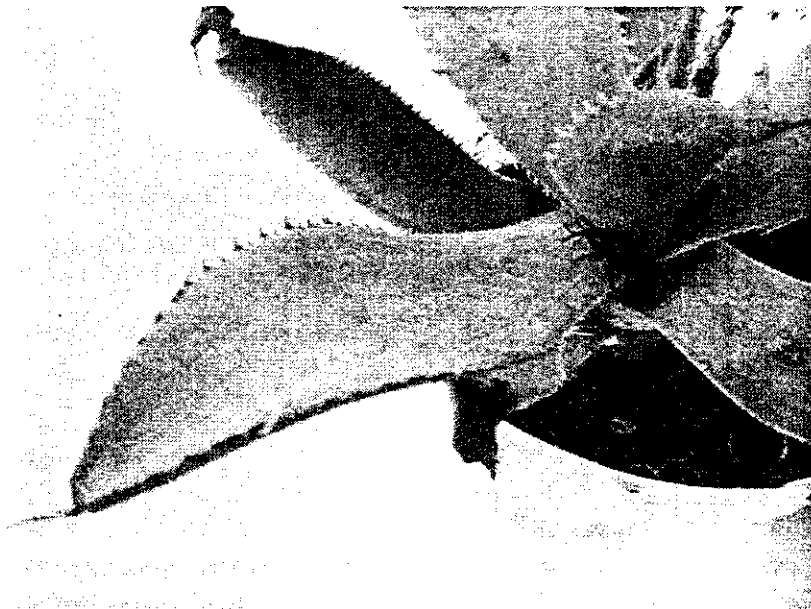


Figura 13. *S. acupunctatus* depositado sobre una planta sana de *A. cupreata*.

### **7.13 Inducción de la enfermedad por infiltración en la base de las hojas de un ejemplar completo *Agave cupreata***

Las bacterias que se probaron fueron puestas a crecer durante 24 h en medio LB líquido, empleando un agitador orbital a 200 rpm y 28°C. Terminado el tiempo de desarrollo de las colonias programado, se preparó una solución con las bacterias a una densidad óptica de 2, esta solución fue hecha con las bacterias crecidas durante 24 h y LB líquido. Con una



jeringa se tomaron 31  $\mu\text{L}$  de la solución con bacteria, que después fueron infiltrados en la base de las hojas de la planta, procurando introducir por completo la jeringa antes de liberar el líquido (Figura 14). Finalmente se monitoreó el progreso del experimento durante dos semanas.

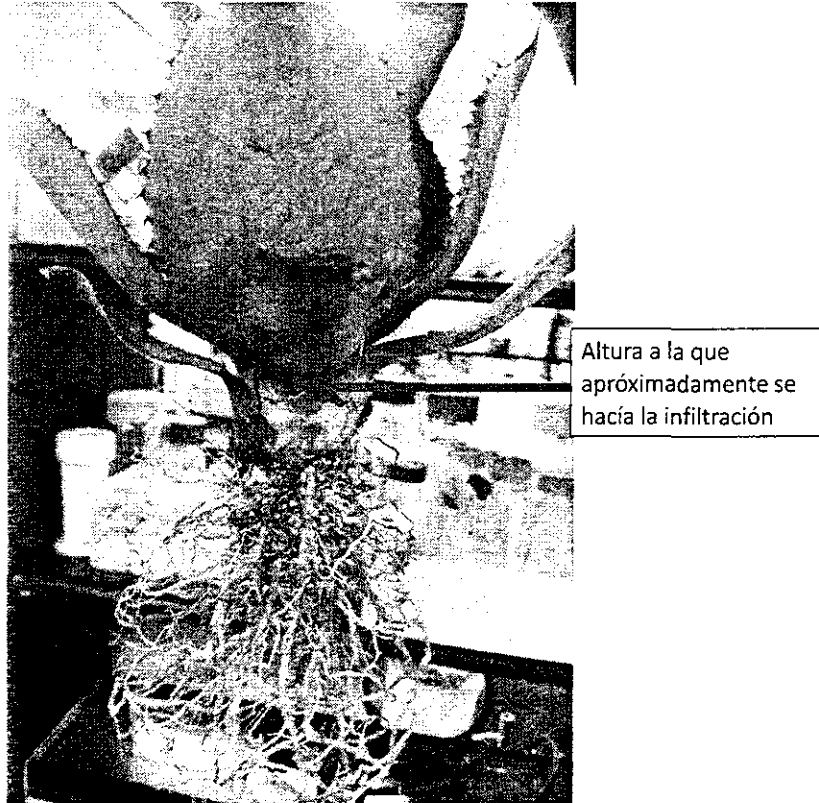


Figura 14. Sitio donde se realizaron las infiltraciones con bacteria en ejemplares sanos de *A. cupreata*.

Para el experimento se formaron 2 grupos, cada uno con 6 ejemplares sanos de *A. cupreata*, el primer grupo recibió una infiltración que contenía a la bacteria *D. dadantii* y el segundo grupo una inyección con BV311.

#### 7.14 Aislamiento y multiplicación de bacteriófagos

En la Figura 15 se presenta de manera esquemática los pasos generales que se siguieron para realizar el aislamiento y multiplicación de bacteriófagos para las bacterias aisladas durante la investigación.

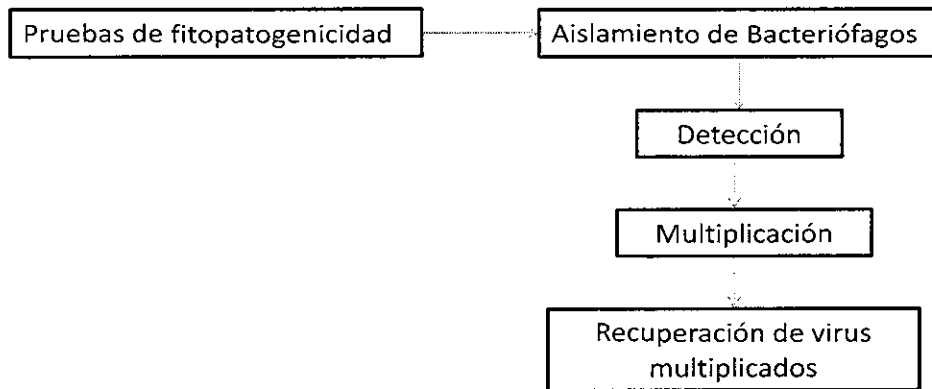


Figura 15. Distintas etapas de la metodología empleada para el aislamiento y multiplicación de bacteriófagos.

### 7.14.1 Aislamiento de virus

De acuerdo a Williamson *et al.* (2003) los procedimientos para el aislamiento de virus a partir de muestras de suelos y de muestras vegetales fueron hechos por duplicado.

A partir de muestras de suelo:

Se tomaron 5 g de suelo y estos fueron depositados en un tubo para centrifugado tipo falcon con capacidad de 50 mL. Además se le agregaron 20 mL de agua destilada (Janowitz, 2004). La mezcla final resultante se agitó en vortex durante 30 seg a máxima velocidad y se dejó en reposo por al menos una hora (Williamson *et al.*, 2003).

Terminado el tiempo de reposo, se centrifugó la muestra a 10000 rpm durante 12 min a 4°C, con la finalidad de sedimentar el suelo y dejar cualquier partícula viral que pudiera estar contenida flotando en el agua superficial (Van Twest y Kropinski, 2009). El sobrenadante que resultó de este proceso fue tomado con una jeringa y pasado por un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ , el filtrado obtenido fue depositado en un recipiente de vidrio estéril y guardado a 4°C. El filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  se usó para retener todas las células posibles, de forma que a través de él solo pasaran las posibles partículas virales que hubiera en la muestra (Williamson *et al.*, 2003).

A partir de muestras vegetales:

Cinco gramos de tejido vegetal enfermo fueron pesados y mezclados con 20 mL de agua dentro de un tubo tipo falcon con capacidad de 50 mL, la mezcla se agitó en vortex durante 50 seg a máxima velocidad, a la mezcla ya licuada se centrifugó a 10000 rpm durante 12 min a 4°C. De forma que el tejido y otras partículas grandes se sedimentaron, el sobrenadante que resultó de este proceso fue tomado con una jeringa estéril y pasado a

través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Finalmente el filtrado se guardó a 4°C en frascos de vidrio estériles.

#### 7.14.2 Detección de bacteriófagos

Para esta se utilizó la metodología del "Doble agar", que permitió saber si en los filtrados hechos con la metodología que aparece en el apartado 7.13.1, en efecto contenían bacteriófagos para las bacterias a las cuales se les deseaban buscar. La técnica del doble agar, consiste en la preparación de un medio con dos capas de geles distintas, la capa de la base lleva más agar y por lo tanto tiene una consistencia sólida, mientras que la capa superficial lleva un gel con menor contenido de agar, que le permite tener una consistencia acuosa (Figura 16).

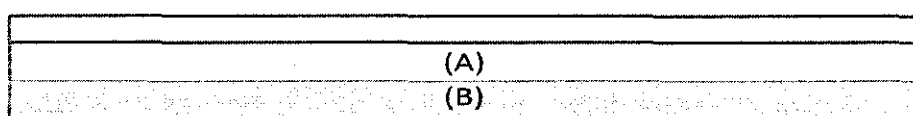


Figura 16. Representación esquemática de una caja de petri con la metodología del "Doble agar" vista de forma horizontal. (A) Capa superficial del medio con un gel que contiene una menor proporción de agar, que la vuelve acuosa. (B) Capa base que contiene una proporción mayor de agar a la superficial, que le confiere solidez.

Una cepa de bacterias para la cual deseaba encontrarse bacteriófagos fue tomada y puesta a crecer en LB durante 24 h (200 rpm y 28°C), terminado este paso se tomó 1 mL de las bacterias crecidas en LB y se les colocó en tubos con 15 mL de capacidad, en los cuales se les adicionó 1 mL de los filtrados hechos con la metodología que se encuentra descrita en el apartado 7.13.1, estos filtrados podían provenir de muestras de suelo o de tejido vegetal enfermo, se les dejó en reposo 1 h. Transcurrida la hora recibieron 3 mL de medio NA diluido con un 50% de agua, para volver el medio acuoso y permitir mayor capacidad de dispersión a las posibles partículas virales, el tubo fue agitado manualmente y su contenido se vació en cajas de petri, que contenían medio NA sin diluir. La mezcla de filtrado, bacterias y NA con un 50% de agua fue esparcido cuidadosamente en toda la superficie de la caja de petri. Finalmente se le dejó solidificar y reposar durante 24 h (Kropinsky *et al.*, 2006).

Al terminar el reposo de 24 h se revisó el medio, que presentó un crecimiento de bacterias uniforme en toda su superficie y era en este crecimiento uniforme en que se debían de notar inconsistencias o huecos, a estos huecos se les llama calvas y representan halos de inhibición que muy probablemente contienen bacteriófagos (Figura 17).

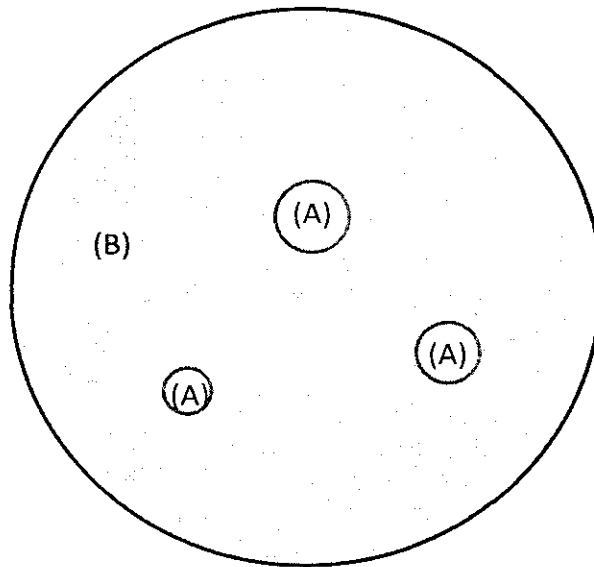


Figura 17. Representación de un medio con caídas. (A) Caída o zona donde hay inhibición del crecimiento de bacterias (B) Zona cubierta por bacterias.

### 7.14.3 Multiplicación de los virus

Se tomó una muestra de una colonia de bacterias a las cuales se les buscó encontrar fagos específicos para infectarlas. La colonia fue puesta a crecer en 5-10 mL de medio líquido LB y se le puso en un agitador orbital durante 24 h (200 rpm y 28°C) para que se desarrollara.

Terminada la etapa de crecimiento, se tomaron 3 mL de los filtrados que se hicieron en el paso de "Aislamiento de virus" y se depositaron en el matraz que contenía a las bacterias. Mezcladas las bacterias junto al filtrado, estas volvían a ser dejadas en agitación por 24 h (200 rpm y 28°C).

Este paso se hizo con la finalidad de multiplicar aquellos elementos que pudieran ser escasos en los filtrados. Es decir, si hubiera presencia de un virus con potencial lítico en el filtrado, pero este estuviera presente en cantidades casi insignificantes, se esperaría que tras pasar por este procedimiento pudiera encontrar bacterias que le sirvieran de anfitriones para su fase reproductiva y así volver común aquello que era escaso (Van Twest y Kropinski, 2009).

### 7.14.4 Recuperación de los virus multiplicados

Si al transcurrir las 24 h del paso anterior se percibía un descenso importante de la población de bacterias que se puso a crecer junto a 3 mL del filtrado vegetal o de suelo. A este descenso se le podía tomar como indicador de que probablemente se había logrado

reproducir algún bacteriófago y que la siguiente acción a realizar debía ser intentar recuperarlo.

Los medios con bacteria y posibles bacteriófagos fueron pasados de los matraces a tubos tipo Falcon de 50 mL y puestos a centrifugar a 11000 rpm durante 10 min, para sedimentar todas las células y solo dejar las posibles partículas virales flotando en el sobrenadante. Después de la centrifugación el sobrenadante fue tomado con una jeringa estéril y pasado por un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Ya filtrado, el sobrenadante era guardado a 4°C o se volvía a utilizar para intentar seguir reproduciendo los virus.

La metodología de “Multiplicación de virus y la de la recuperación de los virus multiplicados”. se pueden repetir cuantas veces sean necesarios, hasta terminar con un sobrenadante que tenga suficientes virus como para matar a las bacterias de forma rápida. Para cada repetición hay que usar el último sobrenadante obtenido (Van Twest y Kropinski, 2009).

## 9. Resultados y discusiones

### 8.1 Aislamiento de bacterias

Durante la investigación se lograron aislar y criopreservar 72 bacterias, estas bacterias serían sometidas a pruebas bioquímicas y de fitopatogenicidad, que permitirían ver si alguna de ellas era capaz de provocar “pudrición blanda” en *A. cupreata* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de cepas de bacterias aisladas en cada sitio de los cuales fueron aisladas de cada sitio de colecta en la zona productora de Mezcal en el estado de Michoacán.

Sitio	Coordenadas	Altitud (msn m)	Núm. de cepas aisladas
El Huizachal	N 19° 25' 31.4'' O 101° 12' 51.4''	1624	49
Las Campesinas	N 19° 24' 20.1'' O 101° 11' 57''	1537	11
El Limón	N 19° 32' 21.4'' O 101° 05' 41.8''	1866	18

### 8.2 Caracterización bioquímica: Pruebas enzimáticas

De las 72 cepas aisladas solo 4 resultaron de interés para continuar con la investigación, pues solo 4 eran capaces de producir enzimas, ninguna de estas bacterias fue capaz de producir enzimas celulasa, pero sí enzimas pectinasa (Cuadro 6)

Cuadro 6. Cepas de interés encontradas durante la caracterización bioquímica, *E. Coli* y *D. dadantii* fueron las bacterias testigo positivas y negativas respectivamente (+: positivo para prueba bioquímica, -: negativo para prueba bioquímica).

Cepa	Medio de cultivo			
	Rico (LB)		Mínimo (M9+PGA)	
	Prueba Pel	Prueba Cel	Prueba Pel	Prueba Cel
BV264	+	-	+	-
BV311	+	-	-	-
BV312	+	-	-	-
BV313	+	-	+	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-
<i>D. dadantii</i>	+	+	+	+

Las bacterias BV264, BV311, BV312 y BV313 aisladas de *A. cupreata* son las únicas bacterias aisladas durante esta investigación que poseen el potencial de causar maceración del tejido vegetal, debido a que son capaces de producir enzimas pectinasa, que son proteínas involucradas en la pudrición, excretadas por el sistema de secreción tipo II y que permiten degradar todas las sustancias pécticas contenidas en la pared vegetal. Sin embargo ninguna de estas bacterias fue capaz de producir enzimas celulasa, que aunque las enzimas celulasa no causan maceración de la pared vegetal, si contribuyen a aumentar la virulencia de un patógeno capaz de producirlas, potenciando el efecto de las enzimas pectinasa, como es en el caso de *D. dadantii* (Murata *et al.*, 1991). La naturaleza cristalina de la celulosa, hace que esta sea degradada lentamente, es esta característica la que hace que los patólogos vegetales no consideren particularmente importantes a las celulasas en los procesos de patogénesis, ya que la degradación de la celulosa, si es que se llega a dar, se da tarde dentro de la infección (Cooper, 1984). Sin embargo cuando a bacterias fitopatógenas como *Xanthomonas campestris* pv *campestris* o *Pseudomonas solanacearum*, se les interrumpen genes relacionados con su producción de celulasas, se encuentra que disminuyen sus niveles de virulencia (Gough *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988). Cabe la posibilidad de que la incapacidad de BV264, BV311, BV312 y BV313 para producir enzimas celulasa disminuya su efecto patogénico y que al ser puestas a prueba en ensayos de fitopatología solo ocasionen una maceración moderada o muy lenta, al ser comparadas con organismos modelo de maceración vegetal, como *D. dadantii*.

Las colonias de las bacterias de interés presentaron las características morfológicas mostradas en el Cuadro 7. Se observó que morfológicamente BV264 y BV313 fueron muy similares entre sí y que BV311 y BV312 visualmente semejaban ser la misma colonia, al ser puestas a crecer en medio NA. Por lo que se decidió hacer una prueba de caracterización molecular sobre las bacterias aisladas, que permitiera hacer una diferenciación más clara de las mismas que una simple apreciación visual (Cuadro 7).

Cuadro 7. Morfología colonial de las cepas positivas para la prueba PEL.

Cepa	Morfología colonial en medio NA	Color
BV264	Forma: irregular Superficie: rugosa Borde: lobulado	Amarillas en la superficie y en su base un amarillo un poco
BV311	Forma: circular	Un color ligeramente amarillo en las

	Superficie: convexa Borde: redondeado	orillas y hacia el centro un blanco azulado.
BV312	Forma: circular Superficie: convexa Borde: redondeado	Un color ligeramente amarillo en las orillas y hacia el centro un blanco azulado.
BV313	Forma: irregular Superficie: rugosa Borde: lobulado	Amarillas en la superficie y en su base un amarillo un poco

### 8.3 ITS-PCR

Al revelar el gel sometido a electroforesis con los ITS de BV264, BV313, BV311 y BV312 y sus testigos *Pseudomona aureoginosa*, *Pseudomona syringaea*, *E. coli* y *D. dadantii*, se obtuvieron los fragmentos y patrones mostrados en la Figura 18 de la amplificación de su región intergénica 16S-23S.

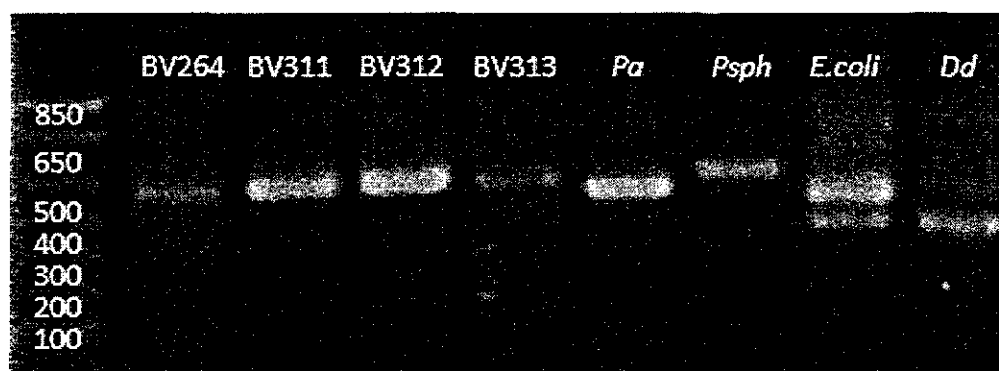


Figura 18. Caracterización molecular de las cepas aisladas de *A. cupreata* con pudrición blanda mediante la técnica ITS-PCR (BV264, BV313, BV311 y BV312, con sus testigos Pa: *P. aureoginosa*, Psp: *P. syringae*, *E. coli* y Dd: *D. dadantii*).

Tomando en cuenta el número de fragmentos y su tamaño en kilopares de bases (Kbp) obtenidos mediante la ITS-PCR de la secuencia ubicada en la región intergénica 16S-23S de cada una de las bacterias, se hizo un análisis de conglomerados, que permitió agrupar a aquellas bacterias que tenían más homogeneidad en el tamaño y patrón de sus secuencias y separando a aquellas bacterias que divergían en cuanto al tamaño y patrón de sus secuencias, el dendograma que representa este análisis puede apreciarse en la Figura 19.



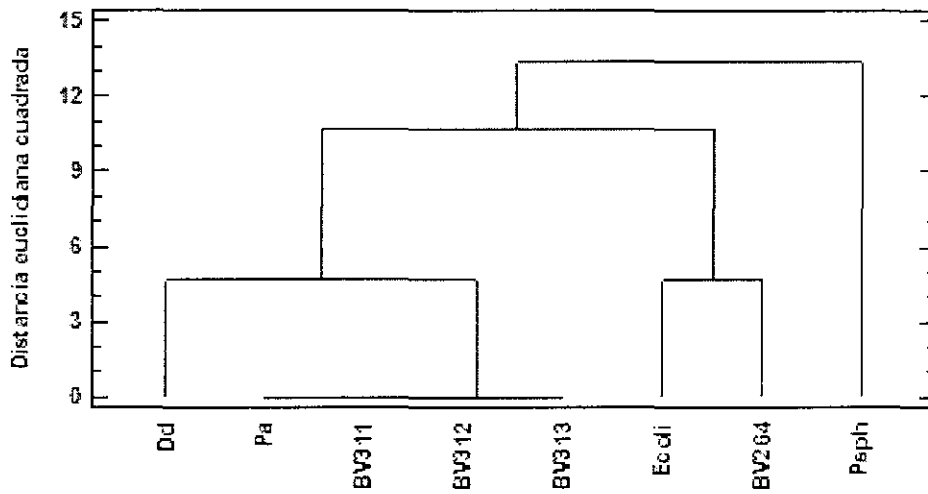


Figura 19. Relaciones de similaridad de diferentes bacterias aisladas de agave mezcalero con pudrición según el análisis de conglomerados del tamaño y patrón de los fragmentos obtenidos de la prueba ITS-PCR mediante el método de UPGM. (BV264, BV313, BV311 y BV312, con sus testigos Pa: *P. aureoginosa*, Pspsh: *P. syringae*, *E. coli* y Dd: *D. dadantii*)

Las bacterias BV264, BV311, BV312 y BV313 durante la prueba de ITS-PCR no mostraron ninguna semejanza con respecto a los testigos *E. coli*, *D. dadantii* y *P. syringae* (Figura 20). Pero las bacterias BV311, BV312 y BV313 resultaron iguales a su testigo *P. aureoginosa*. BV264 resultó ser la única bacteria diferente de todas las bacterias aisladas en cuanto al número de Kbp que conforman su región intergénica 16S-23S.

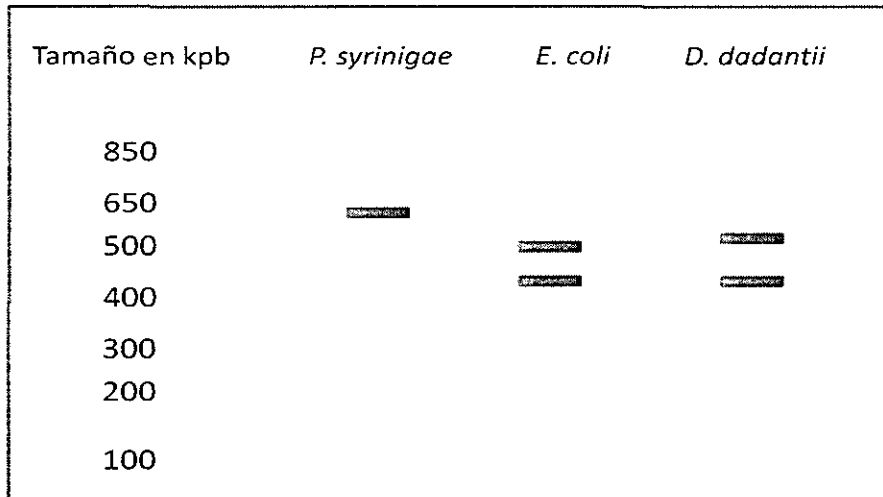


Figura 20. Representación del tamaño y número de fragmentos que se esperaba obtener de las bacterias testigo en la prueba ITS-PCR, según el análisis *in silico* de su genoma y un análisis de restricción realizado con el programa NEBcutter V2.0.

La prueba constató a nivel intergénico, que las bacterias testigo *E. coli*, *D. dadantii* y *P. syringae* eran diferentes a las bacterias aisladas en esta investigación, algo que ya resaltaba con los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas y la morfología de las colonias que se encontró al poner a crecer estas bacterias en medio NA. Pero esta prueba no solo permitió saber que tan divergentes eran estas bacterias con respecto a sus testigos, sino para comparar a las bacterias BV264 con la BV313 y la BV311 con la BV312, que al ser crecidas en medio NA mostraron una morfología colonial guardan similar, formulando las siguientes preguntas, ¿existe la posibilidad de que la bacteria BV264 y la BV313 pertenezcan a la misma especie y que las bacterias BV311 y BV312 son también ambas de la misma especie?, ¿a qué especie de bacterias pertenecerán?

La prueba de ITS-PCR para esta investigación no resultó concluyente, esto concuerda con lo reportado por Toth *et al.*, (2001) quienes al emplear esta metodología para probar su efectividad en la identificación de distintas especies de *Erwinia* que provocan “pudrición blanda”, encontraron que los resultados eran claros cuando se probaban bacterias de especies muy disímiles, pero que cuando estaban estrechamente relacionadas generaban tamaños y patrones de bandas muy similares, que no podían considerarse concluyentes para una prueba de esta naturaleza. Si en esta investigación solo se emplearan los resultados obtenidos con la ITS-PCR para caracterizar a las bacterias aisladas, se concluiría que BV264 resultó ser la bacteria más disímil de todas las aisladas, encontrándose más emparentada con *E. coli* en cuanto al tamaño y patrón de su región intergénica 16S-23S, que con el resto de las bacterias. Por otro lado también se concluiría que BV311, BV312 y

BV313 resultaron iguales a *P. aureoginosa*, y que por lo tanto BV311, BV312 y BV313 eran todas *P. aureoginosa* (Figura 19), cosa que claramente no era cierta al apreciar la morfología colonial de estas bacterias o los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas. Otro punto en el cual se puede apreciar un error, es en que en el análisis de conglomerados de esta prueba, se obtuvo que *P. aureoginosa* es muy distinta a *P. syringae*, situación que no debería presentarse, tratándose de bacterias que pertenecen al mismo género. Es por esto que no se debe confiar tan solo en el tamaño de la secuencia ubicada en la región 16S-23S, ya que podría abrirse la puerta a un error grave en una investigación de este tipo, también es importante analizar el orden y las bases que conforman a esta secuencia. El problema del nivel de discriminación que la ITS-PCR posee no es único de las bacterias, también los investigadores McCullough *et al.*, (1998) reportaron tener problemas al intentar diferenciar especies cercanas de levaduras altamente emparentadas del género *Saccharomyces*. Por lo tanto, si esta prueba no dejó claro el problema que se quería responder, ¿no valdría la pena realizar otra prueba que proveyera un grado mayor de precisión en sus resultados?, una prueba como la RFLP-PCR.

#### 8.4 RFLP-PCR

Los fragmentos obtenidos a través de la prueba RFLP-PCR de las bacterias aisladas, empleando la enzima *HinFI* se pueden observar en la Figura 21.

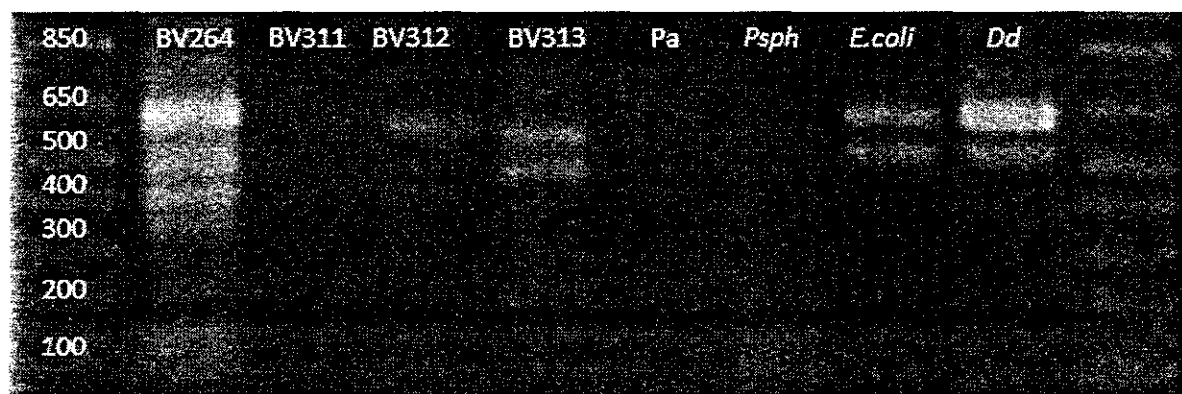


Figura 21. Caracterización molecular de las cepas aisladas de *A. cupreata* con pudrición blanda mediante la técnica RFLP-PCR (BV264, BV313, BV311 y BV312, con sus testigos Pa: *P. aureoginosa*, PspH: *P. syringae*, *E. coli* y Dd: *D. dadantii*).

Con base al número de fragmentos y su tamaño en Kbp, obtenidos tras la digestión de la secuencia ubicada en la región intergénica 16S-23S con la enzima *HinFI* de cada una de las bacterias, se hizo un análisis de conglomerados, que permitió agrupar a aquellas bacterias que tenían más homogeneidad en el tamaño y patrón de sus fragmentos y separando a

aquellas bacterias que divergían en cuanto al tamaño y patrón de sus fragmentos, el dendograma que representa este análisis puede apreciarse en la Figura 22.

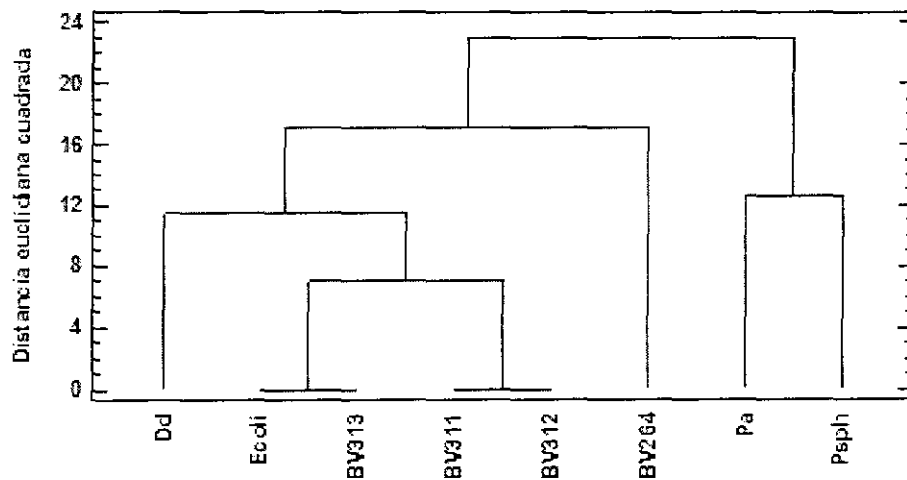


Figura 22 Relaciones de similitud de bacterias aisladas de *A. cupreata* con pudrición blanda según el análisis de conglomerados del tamaño y patrón de los fragmentos obtenidos de la prueba RFLP-PCR de acuerdo al método UPGM. (BV264, BV313, BV311 y BV312, con sus testigos Pa: *P. aureoginosa*, Psph: *P. syringae*, *E. coli* y Dd: *D. dadantii*)

Los testigos de la prueba *D. dadantii*, *P. syringae* y *P. aureoginosa*, fueron diferentes a cualquiera de las bacterias aisladas (BV264, BV311, BV312 y BV313), pero *E. coli* presentó el mismo número de fragmentos y tamaño de estos que los que se obtuvieron con la enzima *HinFI* de la región 16S-23S para BV313 (Figura 23).

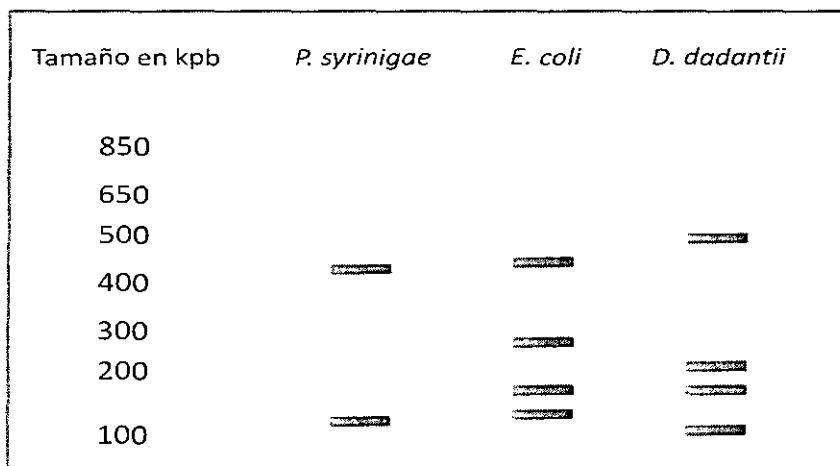


Figura 23. Representación del tamaño y número de fragmentos que se esperaba obtener de las bacterias testigo en la prueba RFLP-PCR según el análisis *in silico* de su genoma y un análisis de restricción realizado con el programa NEBcutter V2.0.

La prueba RFLP-PCR mostró sus ventajas sobre la ITS-PCR al permitir un análisis sencillo y rápido de la región intergénica 16S-23S, tal y como lo proponían los autores Toth *et al.*, (2001) en su artículo y en base al cual se hizo esta prueba. Que descartó la idea de que la bacteria BV264 y BV313 eran el mismo tipo de bacteria y que corroboró que BV311 y BV312 se trataban del mismo tipo de bacteria (Figura 22), pues no solo sus colonias fueron morfológicamente similares y dieron los mismos resultados para las pruebas bioquímicas, sino que su región intergénica resultó poseer el mismo tamaño y sitios de digestión para la enzima HinFI.

En la ITS-PCR las bacterias aisladas BV311, BV312, BV313 y su bacteria testigo *P. aureoginosa*, dieron el mismo resultado, mostrando un número y tamaño de fragmentos igual en su región intergénica. Si la investigación solo se enfocara en esta prueba molecular para caracterizar a las bacterias o determinar si eran diferentes, se habría concluido que eran iguales, a pesar de que su morfología colonial y pruebas bioquímicas supusieran otra cosa.

La prueba RFLP-PCR fue concluyente en cuanto a constatar si las bacterias aisladas eran o no parecidas entre ellas a nivel intergénico, demostrando que las secuencias de la región intergénica de estas bacterias pueden ser similares en tamaño, pero no en el orden y las bases que las conforman. Si bien pudo resolver la pregunta que se planteó en la discusión de los resultados de la ITS-PCR: ¿no será que la bacteria BV264 y la BV313 pertenecen a la misma especie y que las bacterias BV311 y BV312 son también ambas de la misma especie?, no dio una respuesta clara para la segunda pregunta ¿a qué especie de bacterias pertenecerán?, mostrando que esta técnica también tiene sus limitaciones, pues no nos permite conocer por completo la naturaleza genética de estos organismos, es decir el conocimiento de su secuencia base por base. Además también mostró que la bacteria BV313 era igual que su testigo *E. coli* y si solo se usaran estos datos para caracterizar a la bacteria BV313, se concluiría que es una cepa de *E. coli*, lo cual resulta poco probable por el simple hecho de que BV313 es capaz de producir pectinasas.

Waleron *et al.*, (2002) emplearon la enzima HinFI para analizar diferentes especies del género *Erwinia* con la técnica RFLP-PCR de la región intergénica 16S-23S, concluyendo que es un método rápido, que no solo permite identificar a las especies dentro del género *Erwinia*, sino también estudiar la diversidad entre especies en relación a el rango de anfitriones que pueden usar y su distribución geográfica (Waleron *et al.*, 2002). Sin embargo no proporcionan en su publicación el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada una de las bacterias, tan solo el número de fragmentos, lo cual no permitió compararlo

con la investigación aquí realizada, por ejemplo la bacteria *Erwinia cacticida* por ellos analizada y que ha sido aislada de un especie emparentada con *A. cupreata*, que es *A. tequilana* por Jiménez *et al.* (2004) habría servido de referencia para comparar con las bacterias que en esta investigación se analizaron, lo mismo para la bacteria *E. carotovora*, que menciona Fucikovsky (2002) es probablemente responsable de la “pudrición blanda” que se presenta en distintas especies de agave a lo largo del país, para ver si tienen alguna relación con lo aquí encontrado.

## **8.5 Caracterización de patogenicidad**

Las pruebas bioquímicas y moleculares para caracterizar a las bacterias permitieron delimitar el trabajo, dejando solo a tres bacterias de interés para la investigación, estas bacterias fueron BV264, BV311 y BV313. Estas tres fueron las únicas bacterias aisladas de ejemplares de *A. cupreata* enfermos por “pudrición blanda”, capaces de producir una enzima implicada en la aparición de los síntomas, esta enzima fue de tipo pectinasa. Sin embargo no se sabía si el tener la capacidad de producir enzimas pectinasa, era suficiente como para desencadenar la patología llamada “pudrición blanda”. Es por eso que a las bacterias se les sometió a pruebas de fitopatogenicidad, pues como Solanilla y Palenzuela (2009) proponen, un patógeno exitoso debe ser capaz de sobrevivir a las condiciones desfavorables del apoplasto y de utilizar y manipular los recursos de la planta para su propio crecimiento. Para el propósito BV264, BV311 y BV313 fueron inoculadas en ejemplares sanos de *A. cupreata*, pero también en otras tres especies vegetales diferentes, para saber si su hospedero estaba limitado a *A. cupreata* o si además tenían el potencial de dañar a otras especies vegetales modelo.

### **8.5.1 Infiltración de *S. ionantha* y *C. endivia***

#### **8.5.1.1 *S. ionantha***

BV264, BV313 y BV311 no fueron capaces de macerar la superficie completa de ninguna hoja de *S. ionantha* durante el experimento, a lo más, hubo un ligero daño tisular, pero nunca llegaron a causar maceración completa, lo mismo fue para el testigo negativo *P. aureoginosa*, mientras que el testigo positivo maceró 215.7 mm<sup>2</sup> en promedio por hoja en la cual fue inoculado (Figura 22).

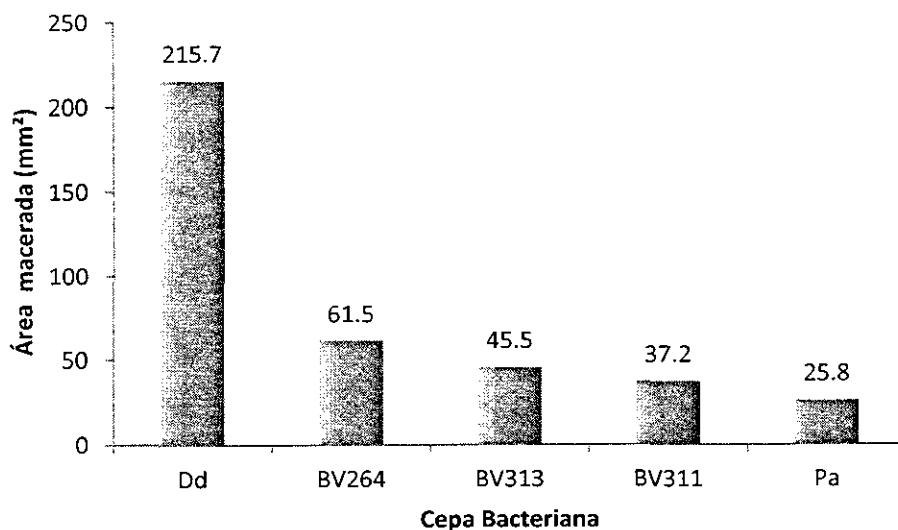


Figura 24. Promedio del área total macerada de hojas de ejemplares de *S. ionantha*, en mm<sup>2</sup>, por las bacterias (BV264, BV313 y BV311, junto a sus testigos Dd: *D. dadantii* y Pa: *P. aureoginosa*).

*D. dadantii* fue 71.5% superior al ser comparado con la bacteria BV264 que fue la bacteria que más daño tisular llegó a causar después de *D. dadantii* en el experimento (Figura 25), con un promedio de 61.5 mm<sup>2</sup> de área macerada por hoja.

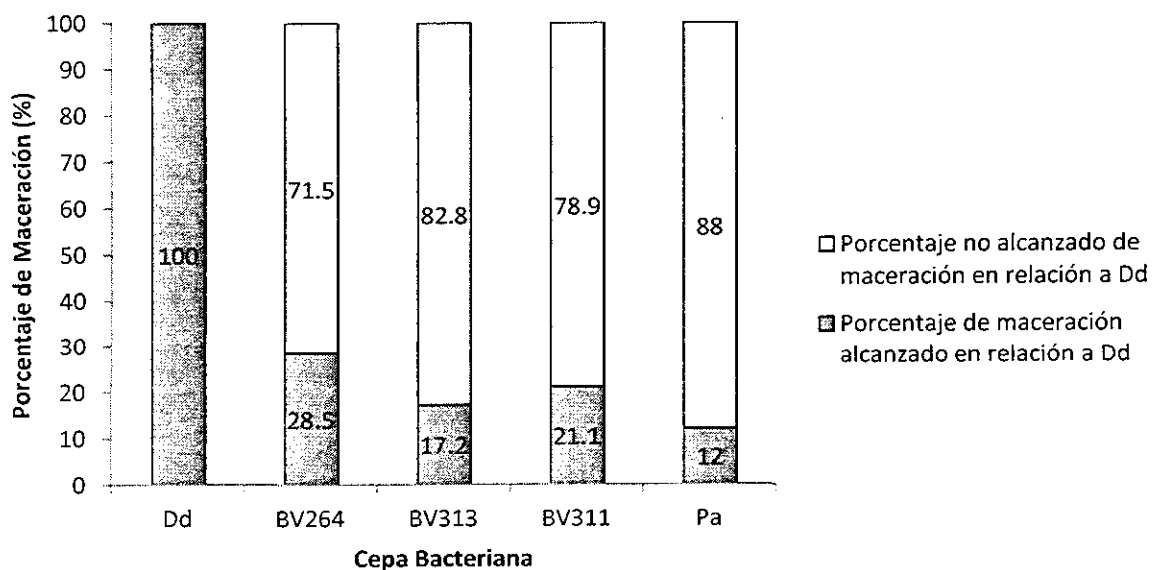


Figura 25. Porcentaje de maceración de cepas bacterianas aisladas de tejido de *A. cupreata* con pudrición blanda en relación a *D. dadantii* (Dd), en hojas de violeta africana. (Pa: *P. aureoginosa*).

### 8.5.1.2 *C. endivia*

BV264, BV313 y BV311 no lograron causar maceración alguna, de igual forma el testigo negativo *P. aureoginosa*. La bacteria *D. dadantii* que fungía como testigo positivo maceró un promedio de 2761 mm<sup>2</sup> por hoja probada (Figura 26).

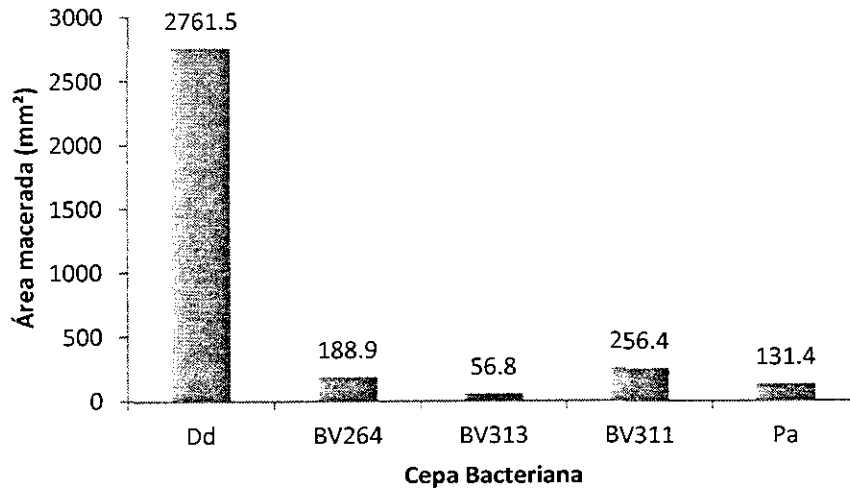


Figura 26. Promedio del área total macerada de hojas de *C. endivia*, en mm<sup>2</sup>, por las bacterias (BV264, BV313 y BV311, junto a sus testigos Dd: *D. dadantii* y Pa: *P. aureoginosa*).

*D. dadantii* maceró un 90.71% más que la bacteria aislada que más daño tisular llegó a causar, que fue la bacteria BV311 que en promedio dañó 256.4 mm<sup>2</sup> (Figura 27).

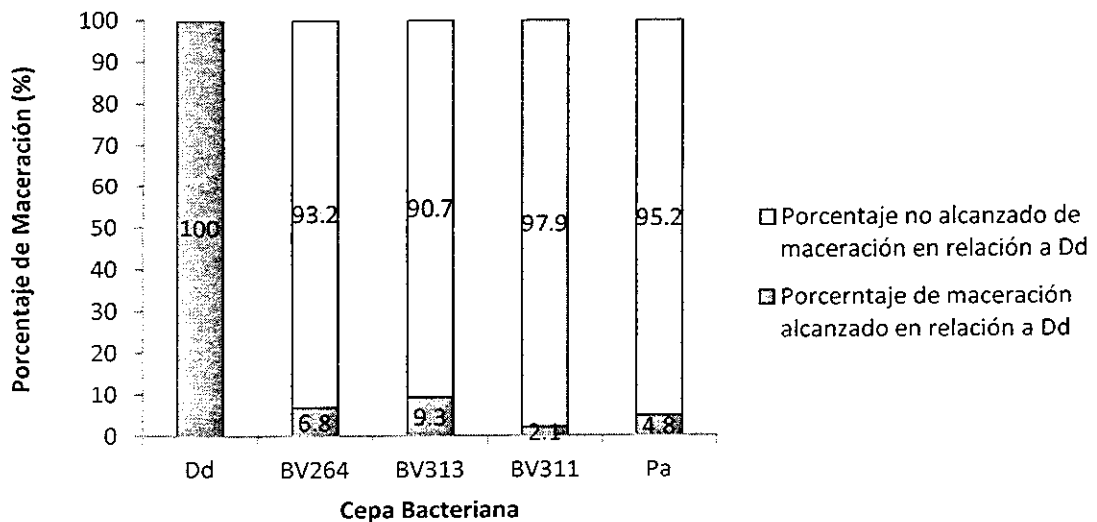


Figura 27. Porcentaje de maceración de cepas bacterianas aisladas de tejido de *A. cupreata* con pudrición blanda en relación a *D. dadantii* (Dd), en hojas de endivia. (Pa: *P. aureoginosa*).



El que las bacterias aisladas puedan producir enzimas que degradan la pectina no determina la sobrevivencia y reproducción de dichas bacterias al lograr entrar en un vegetal. Un factor clave para que un patógeno tenga éxito, es que este sea capaz de sobrevivir a las condiciones inhóspitas del apoplasto y no solo sobrevivir a este, sino también poder emplearlo en su favor para proliferar (Solanilla y Palenzuela, 2009). Es claro que las bacterias aisladas carecen de otros factores de virulencia que *D. dadantii* si poseé. un ejemplo es su incapacidad para producir celulasas, que fue un factor, que se pensó, las pondría en desventaja al ser comparadas con *D. dadantii*.

Para que las bacterias puedan ser patógenas de un organismo vegetal determinado tiene que existir una coevolución que permita la interacción entre la bacteria y la célula vegetal (Alfano y Colmer, 1996). Es claro que las bacterias aisladas no poseen mecanismos que les permitan emplear a *S. ionantha* y *C. endivia* como hospederos para su desarrollo, si los tuvieran se barajaría la posibilidad de que las bacterias aisladas fueran bacterias pectolíticas con una amplia distribución mundial y un gran rango de hospederos, como *D. dadantii* o *P. syringae* más bien se trata de bacterias con un rango de hospederos y distribución limitados.

Si las bacterias BV264, BV311, BV312 y BV313 son capaces de causar alguna enfermedad vegetal, se esperaría que la causaran en ejemplares de *A. cupreata*, que es la especie de la cual se extrajeron y la cual podría ser su hospedero específico. Para poder causar una enfermedad las bacterias tienen que sobrepasar dos líneas de defensa en los vegetales, primero un reconocimiento de los patrones de la superficie celular y segundo una línea de defensa cualitativa en la que el hospedero reconoce a los efectores, los genes que codifican para proteínas efectoras están en una relación uno a uno con los genes de resistencia de los vegetales, de tal manera que si una proteína efectora secretado por la bacteria no llega a ser reconocida por el producto del gen de resistencia del hospedero, esto conllevaría a una infección exitosa (Bent y Mackey, 2007). Las bacterias aisladas y probadas sobre hojas de *S. ionantha* y *C. endivia* probablemente no posean proteínas efectoras que pasen las defensas que proveen los productos de sus genes de resistencia, pero puede que esto no suceda en *A. cupreata* y también habría que probar en una especie genéticamente más emparentada a *A. cupreata*, como podría ser *A. tequilana*.

### **8.5.2 Infiltración en *A. cupreata***

En el experimento que se hizo con hojas de *A. cupreata* las bacterias BV264 y BV313 no causaron daño alguno en las 20 repeticiones que se hicieron del experimento, por lo que pueden quedar descartadas como posibles fitopatógenos a pesar de tener la habilidad de producir pectinasas (Figura 28). Sin embargo la bacteria BV311 tuvo un comportamiento

diferente al ser inoculada en las hojas de *A. cupreata*, si bien solo logró macerar 4 hojas de 20 repeticiones (17%), esto ya la separa de BV264 y BV313 que no lograron macerar ninguna. *D. dadantii*, que es una bacteria conocida por su gran capacidad para macerar tejido vegetal, durante el experimento consiguió macerar 6 hojas de 20 repeticiones (23%), apenas dos hojas más que BV311, en este experimento *D. dadantii* solo fue un 6% más efectiva que BV311 en 20 repeticiones (Figura 29).

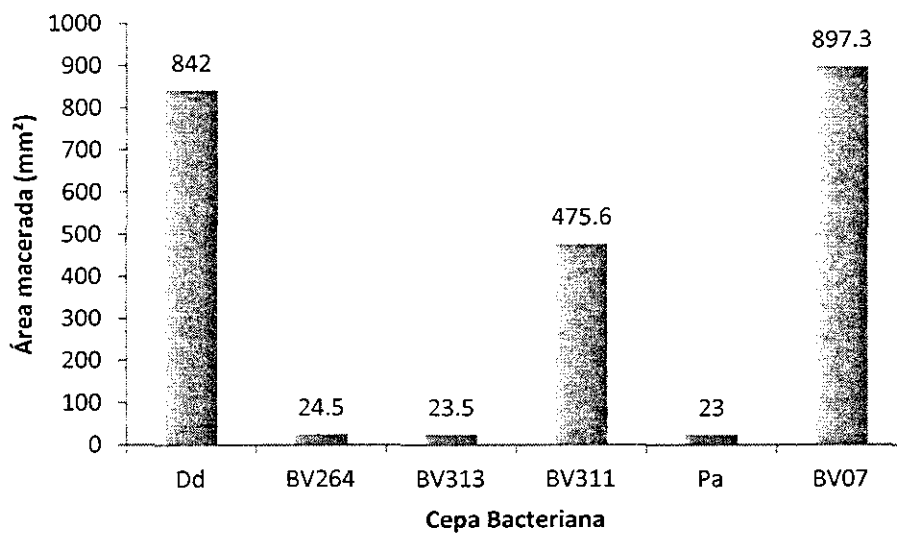


Figura 28. Promedio del área total macerada de hojas de *A. cupreata*, en mm<sup>2</sup>, por las bacterias (BV264, BV313 y BV311, junto a sus testigos Dd: *D. dadantii*, Pa: *P. aureoginosa* y BV07).

Del total de plantas probadas en el experimento, solo 6 hojas (23%) fueron completamente maceradas por *D. dadantii*, 4 (17%) por la bacteria BV 311 y 7 (26%) por la bacteria BV07 (Figura 30). La bacteria BV311 solo se distanció en un 6% de *D. dadantii*, que es una bacteria modelo para este tipo de maceración, en cuanto a BV264 y BV311 no resultaron ser bacterias patógenas para esta especie vegetal.

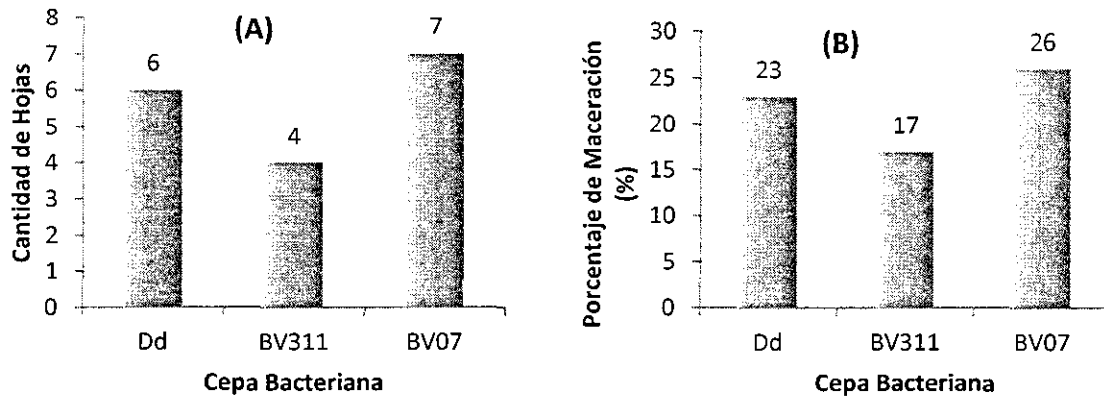


Figura 29. (A) Cantidad de hojas que fueron maceradas por completo (B) Porcentaje de hojas que fueron maceradas por completo con respecto al número total de hojas probadas en el experimento (Bacterias Dd: *D. dadantii*, BV311 y BV07).

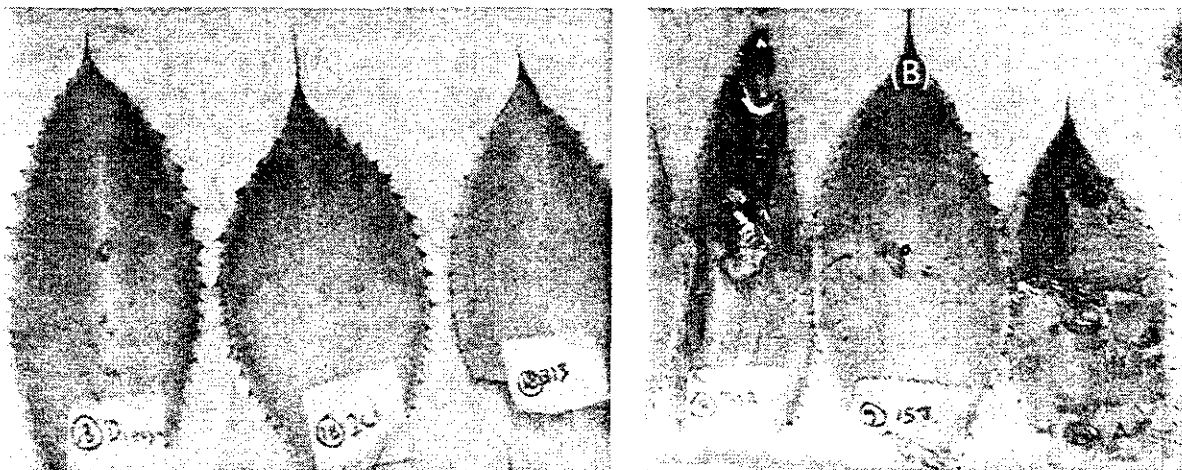


Figura 30. Vista general de la evolución del desarrollo de los síntomas de la pudrición blanda sobre hojas de *A. cupreata*. (A) Hojas de *A. cupreata* en el momento de la inoculación. (B) Hojas de *A. cupreata* tras 16 días de la inoculación de las bacterias.

La inhabilidad de BV264 y BV313 para causar una infección en *A. cupreata* de nuevo muestra que un patógeno exitoso emplea más de un mecanismo para aprovecharse de los recursos de un organismo vegetal. La producción de enzimas pectinasa que BV264 y BV313 poseen, es por ejemplo uno de varios mecanismos de los cuales *D. dadantii* se vale para atacar al vegetal.

Aunque la producción de enzimas pectolíticas (liasas pectato y poligalacturonas) de *D. dadantii* son el factor más importante de su virulencia, también posee otros factores que

la convierten en un patógeno efectivo, tales como la producción de enzimas celulasa que le suministran fuentes alternativas de carbono (Murata *et al.*, 1991), los sistemas de hierro mediados por el sideróforo, que son receptores ubicados en la membrana externa de la bacteria que se unen a complejos sideróforo-hierro específicos y que promueven su transporte activo en el periplasma (Braun *et al.*, 1998) y los genes *hrp*, que regulan el sistema por el cual la bacteria inyecta proteínas involucradas en la virulencia a la célula vegetal (efectores T3SS) (Buonaurio, 2008). La expresión de cualquiera de estas funciones están reguladas para responder a distintos estímulos que la bacteria puede llegar a encontrar en el apoplasto, como la presencia de sustancias pécticas, un pH ácido, baja disponibilidad de hierro y magnesio y la presencia de sustancias antibacteriales (Venkatesh *et al.*, 2006).

*D. dadantii* muestra que la relación patógeno-hospedero es más compleja, que tener una enzima que ayuda a degradar la pectina no asegura la supervivencia y colonización en el apoplasto. El reconocimiento de un anfitrión por el patógeno dispara modificaciones en el metabolismo celular necesarias para la sobrevivencia del patógeno y que este puede hacer una colonización exitosa de su anfitrión, que comúnmente involucra una interacción compleja de múltiples factores regulatorios (Venkatesh *et al.*, 2006). Quizá las bacterias BV264 y BV313 son bacterias oportunistas, que aparecieron sobre el tejido necrosado de *A. cupreata* cuando la enfermedad ya se encontraba en un estado avanzado, siendo ambas bacterias capaces de aprovechar la pectina del vegetal cuando los sistemas de defensa ya hubieran sido sobrepasados por otro agente patógeno, pero estas serían incapaces de detonar la enfermedad.

Un caso diferente resultó el de la bacteria BV311, que si bien no tuvo la misma efectividad que *D. dadantii* (fue un 6% inferior), si fue capaz de detonar la enfermedad. Se trata de una bacteria que posee la capacidad de sobrevivir en el apoplasto y que produce una o varias proteínas efectoras que no pueden ser contrarrestadas por los genes de resistencia de *A. cupreata* (Bent y Mackey, 2007). Otro punto importante es que BV311 no pudo enfermar a los vegetales endivia y violeta africana, otra diferencia con respecto a *D. dadantii*, que sugiere que es un patógeno con un rango más limitado de hospederos y que quizá sea capaz de infectar a otros vegetales filogenéticamente cercanos, como *A. tequilana*, que tiene mayor importancia económica y registra más pérdidas por “pudrición blanda”.

### 8.5.3 Infiltración de *A. tequilana*

Las tres hojas que presentaron maceración, completa, recibieron un inóculo con *D. dadantii*. Es decir que del 100% de las hojas probadas solo un 2.5% presentó maceración y de las bacterias desconocidas, no se obtuvo ni siquiera un daño tisular relevante, más allá del que se causó con la aguja empleada para inocular las bacterias (Figuras 31 y 32).

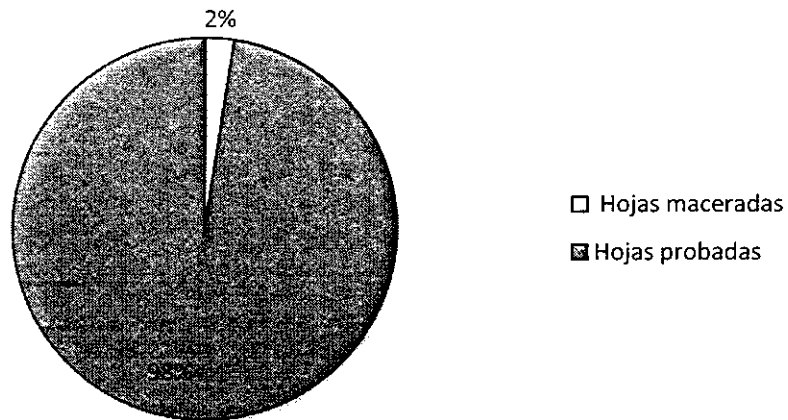


Figura 31. Porcentaje de hojas de *A. tequilana* maceradas por la bacteria *D. dadantii*.

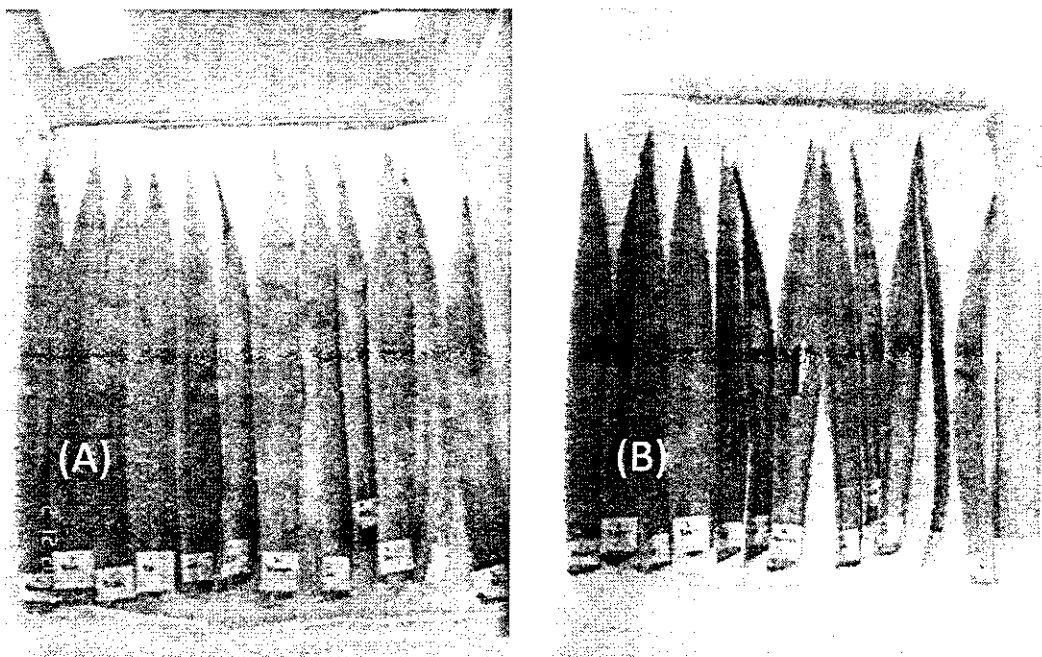


Figura 32. Vista general de la evolución del desarrollo de los síntomas de la pudrición blanda sobre hojas de *A. tequilana*. (A) Hojas de *A. tequilana* en el primer día del experimento. (B) El mismo grupo de hojas a los 17 días del arranque de la prueba.

En el año de 1994 Valenzuela-Zapata *et al.* sugirieron que la bacteria responsable de causar la “pudrición blanda” en *A. tequilana* pertenecía al género *Erwinia*. en concreto mencionaron a la bacteria *E. carotovora* (Valenzuela-Zapata *et al.*, 1994). Usar a esta planta como modelo para estudiar la fitopatogenicidad de las bacterias aisladas era importante, pues es una especie filogenéticamente cercana a *A. cupreata* y permitiría ver si estas bacterias eran capaces de emplear a plantas de otras especies como anfitriones, autores como Jiménez *et al.* ya habían sugerido que en la “pudrición blanda” que *A. tequilana* presentaba estaban involucradas más de una especie de bacterias (Jiménez *et al.*, 2004). Sin embargo ninguna de las bacterias aisladas en la presente investigación fue capaz de infectar a *A. tequilana*, ni siquiera BV311, que logró expresar los síntomas de la “pudrición blanda” en *A. cupreata*. Pero también es cierto que *E. carotovora* u otras especies de *Erwinia* y *Pseudomonas* como Jiménez *et al.* (2004) encontraron, tampoco pudieron ser aisladas en *A. cupreata*, abriéndose las puertas a la posibilidad de que la enfermedad que *A. cupreata* presenta es de naturaleza diferente a la de *A. tequilana* Weber, que implica a otros patógenos cuyos síntomas pueden ser parecidos a los causados por *E. carotovora* u otras especies de *Erwinia* y *Pseudomonas*, pero que poseen un comportamiento y desarrollo únicos.

#### **8.6 Inoculación de la bacteria usando como vehículo a *S. acupunctatus***

Fueron tres los grupos probados en este experimento, con seis ejemplares de *A. cupreata* cada uno, para ver las características de estos grupos con más detalle acudir al apartado 7.11.3 de este trabajo. A los 14 d del inicio de este experimento se obtuvieron los siguientes resultados: El primer grupo (*S. acupunctatus* con *D. dadantii*) presentó un total de cuatro plantas con algún grado de maceración, esta poseía tonalidades café oscuro o amarillas, las otras dos plantas restantes no presentaron daño alguno. El segundo grupo (*S. acupunctatus* con BV311) presentó tres plantas con maceración y otras tres sin daño alguno. Finalmente el tercer grupo (*S. acupunctatus* desinfectado), que era el grupo testigo de la prueba, no presentó maceración alguna, ocasionados por los hábitos alimenticios de los escarabajos. El total y el promedio de mm<sup>2</sup> macerados por cada grupo y el número total y el promedio de hojas dañadas se puede observar en las Figuras 33, 34 y 35.

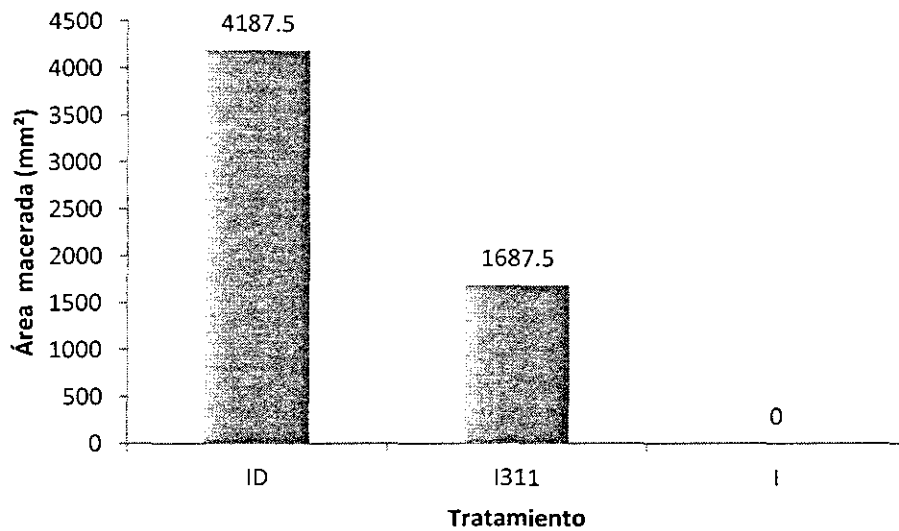


Figura 33. Promedio de mm<sup>2</sup> macerados por los distintos tratamientos probados en el experimento (ID: Insecto alimentado con *D. dadantii*, I311: insecto alimentado con BV311 e I: Insecto sin bacteria).

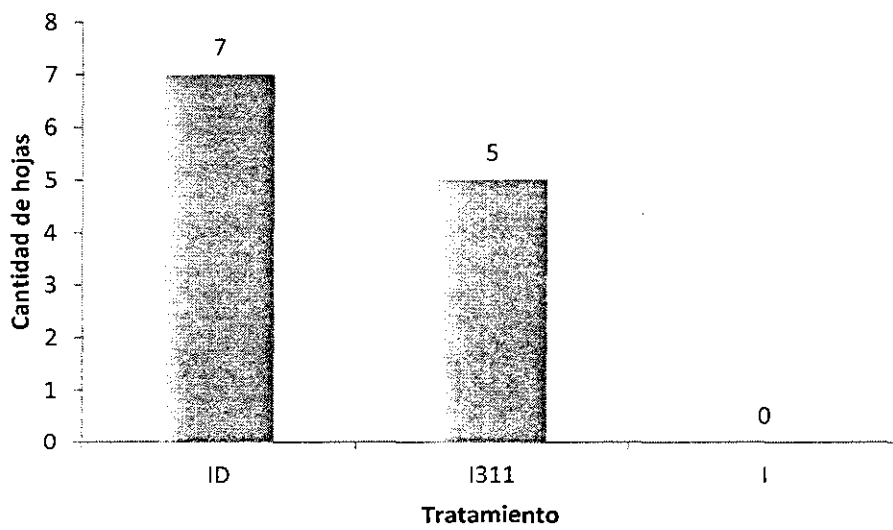


Figura 34. Cantidad de hojas que presentaron daño por maceración causada por los distintos tratamientos probados en el experimento (ID: Insecto alimentado con *D. dadantii*, I311: Insecto alimentado con BV311 e I: Insecto sin bacteria).

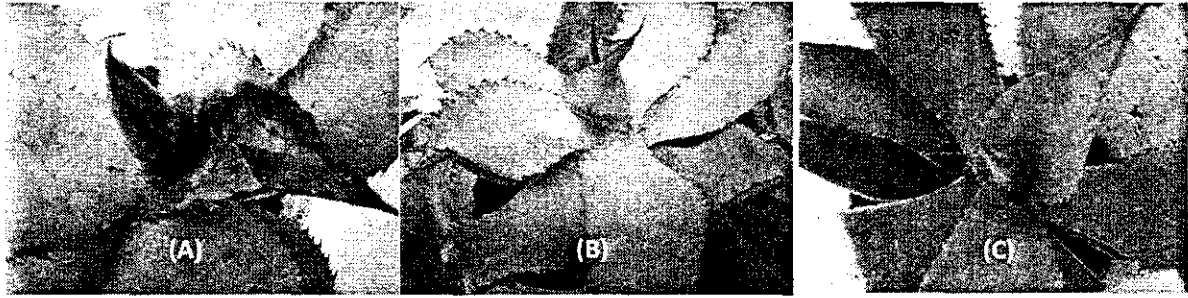


Figura 35. Ejemplares de *A. cupreata* a los 14 días de haber iniciado la prueba. (A) Con *S. acupunctatus* alimentado con *D. dadantii* (B) Con *S. acupunctatus* alimentado con BV311 (C) Con *S. acupunctatus* solo desinfectado (testigo).

A la fecha no se ha publicado un estudio que demuestre que la bacteria que produce la “pudrición blanda” en *A. tequilana* emplee un vector para su dispersión, aún menos un estudio que demuestre lo mismo para la especie *A. cupreata*, sin embargo se especula que así ocurre y que el vector que esta bacteria emplea es *S. acupunctatus*.

Por otro lado, la literatura disponible que demuestra que la bacteria *E. carotovora* que causa “pudrición blanda” en patatas necesita de vectores para dispersarse, todos ellos insectos, los vectores sugeridos son *Drosophila melanogaster* y *Drosophila busckii*, en los cuales se ha podido observar que la bacteria puede sobrevivir por periodos prolongados en el tracto digestivo de estos insectos, esta protección es muy importante, ya que *E. carotovora* no resiste muy bien la exposición al aire (Brewer *et al.*, 1981). A individuos criados en laboratorio de *D. melanogaster* se les ha infectado con *E. carotovora* y se ha observado que de sus excrementos y sus vómitos se pueden obtener colonias de *E. carotovora*, que de alguna manera logra sobrevivir y encontrar un ambiente agradable en el interior del insecto y que al colocar estas moscas infectadas en vegetales sanos, causan la enfermedad mencionada a través de depositar sus heces y su vómito en heridas del vegetal (Jackzo *et al.*, 1983).

Es muy probable que la bacteria que causa la enfermedad de *A. cupreata*, emplee un mecanismo similar al de *E. carotovora* al refugiarse en *S. acupunctatus*. En campo se observó que los ejemplares de *A. cupreata* enfermos por “pudrición blanda”, también presentaban infestaciones de picudo negro. En los estudios hechos sobre *A. tequilana* y el impacto que *S. acupunctatus* tiene sobre esta especie, se ha observado que en los tejidos enrojecidos cercanos a las galerías, que las larvas de este escarabajo hacen al instalarse dentro del agave, se encuentran llenas de bacterias (Waring y Smith, 1986).

De *S. acupunctatus* se menciona que ha pasado a ser considerado como la mayor plaga que tiene el agave que se usa para elaborar el pulque (*Agave atrovirens*), tequila (*A.*



*tequilana*) y el mezcal (*A. angustifolia*) (Wooruff y Pierce, 1973). En este experimento se observó que el impacto de *S. acupunctatus* fue nulo sobre *A. cupreata* en un periodo de dos semanas, cuando no fue infectado con bacteria alguna, pero que al ser infectado con BV311 o *D. dadantii*, las condiciones cambiaron, ocasionando en algunos casos una pudrición severa.

Podría ser que la patogenicidad asociada al insecto, sea consecuencia de una bacteria patógena que logra alojarse en él y lo emplee como vector. Pero también es cierto que, aunque el insecto no portara una bacteria patógena, genera constantes heridas en la planta por sus hábitos alimenticios y reproductivos (Aquino *et al.*, 2010), y estas heridas pueden ser entrada de bacterias y hongos que podrían hospedarse en el vegetal y enfermarlo. Es importante tener siempre presente a *S. acupunctatus* en todas las investigaciones que se hagan con respecto a la "pudrición blanda" de *A. cupreata*, pues es un organismo que tiene un ciclo de vida estrechamente relacionado con las agaváceas y que en campo siempre se le encontró en aquellos ejemplares que se encontraban enfermos.

### 8.7 Inducción de la enfermedad con una infiltración en la base de las hojas de un ejemplar completo *A. cupreata*

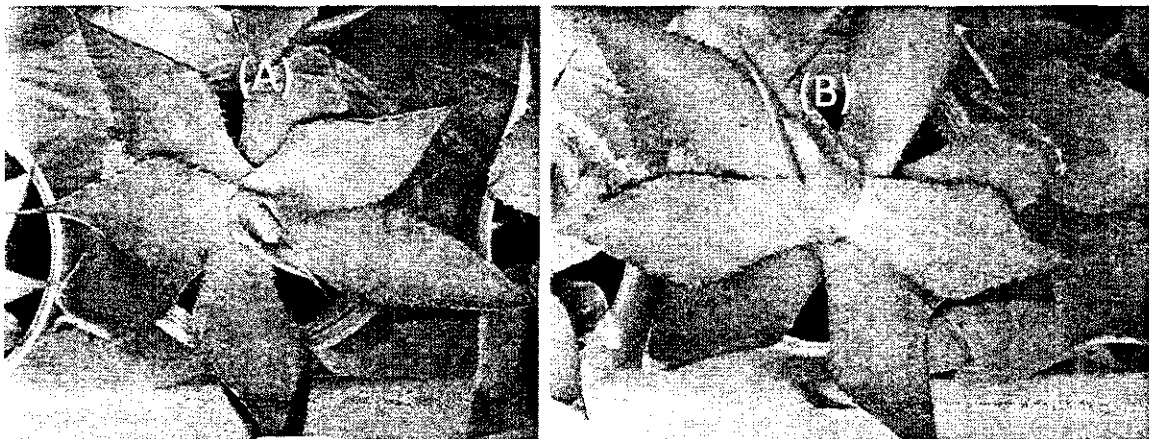


Figura 36. Evolución de la aparición de síntomas de pudrición blanda en *A. cupreata* infiltrado con *D. dadantii*. (A) Ejemplar de *A. cupreata* inyectado con *D. dadantii* en el primer día del experimento. (B) Mismo ejemplar de *A. cupreata* a los 14 días del experimento.

De los dos grupos probados en el experimento, a los 14 d, el que fue infiltrado con *D. dadantii* no presentó ningún indicio de maceración en las plantas que lo conformaban, de igual forma las plantas del grupo que fue infiltrado con BV311 no mostraron ningún cambio que haga pensar que una maceración está tomando lugar en su tejido. La

infiltración directa de las bacterias mostró ser inefectiva al intentar reproducir la enfermedad (Figura 36).

El principio de este experimento fue muy similar al de la infiltración, y se hizo para evaluar una respuesta distinta en un organismo entero de *A. cupreata*, a la que se obtuvo solo en sus hojas. Sin embargo no ocurrió ningún cambio relevante, esto se podría explicar con la baja frecuencia que se obtuvo en el experimento de la "infiltración en hojas de *A. cupreata*", en el que la bacteria testigo *D. dadantii* solo logró causar maceración en un 23% y la bacteria BV311 solo un 17% de un total de 20 repeticiones para cada bacteria, en la actual prueba tan solo se emplearon 6 repeticiones, por lo que no encontrar maceración alguna en una muestra tan pequeña, no es del todo una sorpresa.

Sin duda el experimento habría arrojado resultados más interesantes si el monitoreo del se hubiera llevado por más tiempo que dos semanas y si la muestra empleada hubiera sido más amplia.

Al comparar este experimento con el que usó seis agaves junto a escarabajos *S. acupunctatus*, se notan grandes diferencias, pues los insectos que fueron alimentados con *D. dadantii* lograron causar maceración en 66.7% de los individuos y BV311 en el 50% de los individuos. Habría que pensarse en que podría haber ocurrido en una muestra más amplia y con periodos de monitoreo más prolongados, sin duda hay una diferencia muy grande entre inocular solo la bacteria en el vegetal y emplear un vehículo para ello.

## **8.8 Aislamiento de Bacteriófagos**

### **8.8.1 A partir de muestras de tejido vegetal necrosado**

No logró encontrarse ningún bacteriófago para ninguna de las bacterias probadas, BV264, BV311, BV312 y BV313.

### **8.8.2 A partir de muestras de suelo**

Se estandarizó la metodología para detectar la presencia de bacteriófagos en una muestra. Estos bacteriófagos que se encontraron fueron para la bacteria BV264, se obtuvo una calva clara, que mostraba la inhibición de la colonia (Figura 37).

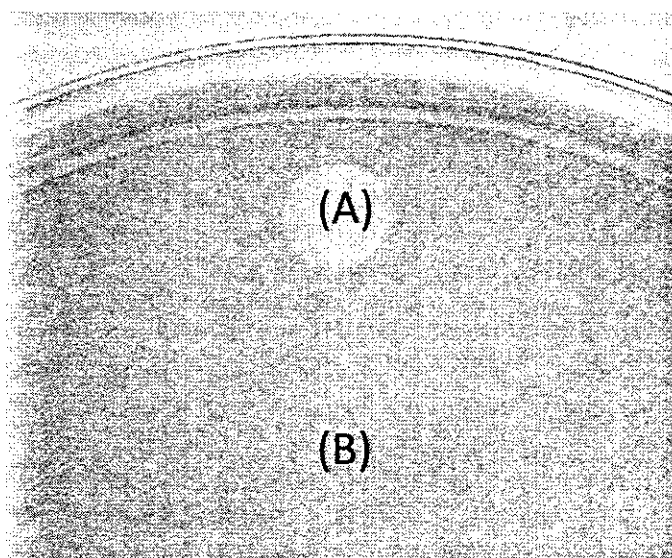


Figura 37. Calva obtenida para la cepa BV264 a partir de una muestra de suelo. (A) Calva (B) Medio cubierto por la bacteria BV264.

Williamson *et al.* (2003) recomiendan en la etapa de aislamiento agregar 0.5 mL de cloroformo a los sobrenadantes que se obtuvieron de las muestras de suelo y tejido vegetal necrosado, en los cuales se esperaba encontrar bacteriófagos, antes de almacenarlos a 4°C. Con la finalidad de evitar cualquier tipo de contaminación celular. Durante la estandarización de la técnica se prescindió del uso de cloroformo, usando como único medio de limpieza la centrifugación y el filtrado, sin sufrir contaminación alguna por parte de bacterias, si alguien realiza un trabajo posterior basándose en las metodologías empleadas en esta tesis, tenga presente la recomendación de Williamson *et al.* (2003) por si encuentra bacterias que logren pasar los controles que proporcionan la centrifugación y el filtrado.

Aunque BV264 no resultó ser una bacteria interesante debido a que no logró causar maceración en *A. cupreata*, ayudó a estandarizar las pruebas de aislamiento.

### 8.9 Multiplicación de Bacteriófagos

A partir de la calva que se obtuvo de la bacteria BV264 se intentó realizar la multiplicación de los virus, esto no se consiguió y la técnica no logró ser estandarizada.

El intento de multiplicar al agente que causaba inhibición fue infructuoso, solo se realizó un intento, sin usar todo el material que se obtuvo de la inhibición por temor a perder todo el material en el primer ensayo, el resto fue almacenado a 4°C.

¿Pero porqué el material empleado no pudo multiplicarse una vez que fue puesto en contacto con las bacterias?. El primer paso para que un bacteriófago pueda causar una infección en una célula bacteriana, es que las partículas del bacteriófago puedan ser absorbidas por esta (Caso *et al.*, 1995). La absorción no solo es dependiente de los receptores específicos que posea la célula en su superficie, sino que también depende de ciertos cationes presentes en el medio donde se espera que suceda este proceso (Topley y Wilson, 1990). Los bacteriófagos usualmente requieren de cationes divalentes en altas concentraciones para esto, tales como el calcio (Ca) o el magnesio (Mg) (Watanabe y Takesue, 1972). El medio LB que se utilizó para la interacción no contenía ninguno de los cationes antes mencionados, a pesar de que era una recomendación que los autores Van Twest y Kropinski (2009), en los cuales se basó parte de esta metodología, ya daban al señalar que muchos bacteriófagos requieren de entre 1-10 mM de iones tales como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  para su unión a la superficie celular de la bacteria o su crecimiento. Y que además es una buena idea incluir 1-2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  en todo el medio cuando se trabaje con bacteriófagos desconocidos o con mezclas de ellos (Van Twest y Kropinski, 2009).

La falta de tiempo impidió que se lograra estandarizar la técnica, es probable que otro trabajo con mayor dedicación a este apartado consiguiera otros frutos, el uso de los cationes divalentes de Ca y Mg debería ser tomado en cuenta para futuros trabajos sobre el tema, al menos esta es la solución que se propone para eliminar el problema que se tuvo en la presente investigación.

## 10. Conclusiones

Se aisló del tejido vegetal de *A. cupreata* con pudrición blanda las bacterias BV264, BV311, BV312 y BV313 que produjeron pectinasas distintas al género *Erwinia* de estas solo la bacteria BV311 fue capaz de producir maceración del tejido vegetal que se conoce causan maceración del tejido en otras especies de agave, como *A. tequilana*, fue aislada de la zona productora de Mezcal del estado de Michoacán.

La bacteria aislada fue denominada BV311 y es capaz de producir proteínas que le permiten degradar pectina. BV311 no es capaz de causar maceración en las especies vegetales *S. iornatha* y *C. endivia*, tampoco en la especie *A. tequilana*, filogenéticamente cercana a *A. cupreata*.

Se aislaron bacteriófagos de la región productora de mezcal del estado de Michoacán, donde ejemplares de *A. cupreata* son afectados por la “pudrición blanda”, sin embargo estos bacteriófagos no se multiplicaron y no causaron inhibición en la bacteria BV311. Pero si inhibió el crecimiento de otra bacteria que fue inocua para *A. cupreata* denominada BV264 en este trabajo. Si bien no se inhibe a la bacteria BV311, si demostró que es posible aislar bacteriófagos en las inmediaciones de donde una bacteria se encuentra proliferando y que un estudio más detallado se lograrán aislar otro tipo de bacteriófagos que podrían ser específicos para BV311.

## 11. Perspectivas

Las características de la “pudrición blanda” que *A. cupreata* presenta en el estado de Michoacán, requieren de más estudios, que al final permitan construir un marco de referencia a todos aquellos que quieran seguir empleándola para fines comerciales o para su protección como especie endémica, estudios que no solo se limiten al estado de Michoacán, sino que se extiendan a todas aquellas regiones en las cuales esta especie se pueda encontrar. Más aislamientos del patógeno y estudios del mecanismo por el cual este se dispersa son requeridos, que no solo arrojarían datos relevantes para esta especie, sino que ayudarían a comprender mejor la naturaleza de la enfermedad conocida como “pudrición blanda” que afecta a varios miembros de la familia *Agavacea*, que no solo pondría en peligro su viabilidad comercial sino que también su biodiversidad.

En este estudio se encontró que las bacterias BV264, BV311, BV312 y BV313 aisladas de *A. cupreata* con pudrición blanda, son capaces de producir proteínas implicadas en la degradación de la pectina, sin embargo en este trabajo no se investigó la naturaleza química de estas pectinasas, valdría la pena hacer otro tipo de pruebas que permitan identificar a qué grupo de enzimas pectolíticas pertenecen estas proteínas. Asimismo en el presente estudio solo se hicieron pruebas para detectar la producción de enzimas celulasa y pectinasa, sería interesante saber si las bacterias aisladas, sobre todo BV311, son capaces de producir otras proteínas efectoras propias del sistema de secreción tipo II.

Las pruebas moleculares que se realizaron, ITS y RFLP, permitieron saber si las bacterias aisladas eran filogenéticamente emparentadas entre sí o a alguno de los testigos empleados en la prueba, sin embargo fueron insuficientes para determinar exactamente a qué especie de bacterias pertenecían cada una de ellas. Un estudio que permitiera secuenciar el ADN de estas, no solo sería más concluyente con respecto a los resultados que la ITS y RFLP arrojaron, sino que también permitiría saber con exactitud a qué especie pertenecen las bacterias.

En las pruebas de fitopatología, en las cuales se emplearon ejemplares completos de *A. cupreata*, se hicieron seis repeticiones, es probable que al usar una muestra más amplia de la misma prueba no solo beneficiaría su relevancia, sino que también arrojaría resultados aún más interesantes.

Los bacteriófagos sin lugar a dudas están presentes en la zona productora de mezcal del estado de Michoacán, no por nada los virus son las partículas biológicas más abundantes del planeta, aún más que las bacterias. Pero un estudio que desee aislar bacteriófagos

altamente líticos para una bacteria fitopatógena, solo debe dedicarse a ese tema, ya que es muy extenso, sin embargo el aislamiento del fitopatógeno en *A. cupreata* que causa la “pudrición blanda”, jamás había sido aislado lo que se logro en este trabajo como principal objetivo, lo que facilitará en trabajos posteriores la búsqueda de un bacteriófago específico para el patógeno que causa la “pudrición blanda” en *A. cupreata*, y también será importante tomar en cuenta el uso de calcio y magnesio bivalente, para la multiplicación de los bacteriófagos ya que en este estudio se determinó como una limitante en la multiplicación de los bacteriófagos.

## 12. Literatura Consultada

- Ackermann, H. W. 2009. Basic Phage Electron Microscopy. Clokie, M. R. J. y Kropinski, A. M. (eds.). Bacteriophages: Methods and Protocols. Isolation, Characterization, and Interactions. Humana Press. Hertfordshire, Reino Unido. 501 (1): 113-126.
- Alfano, J. R. y Collmer, A. 1996. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. American Society of Plant Physiologists. 8: 1683-1689.
- Aquino, T., Ruiz, J. y Martínez, D. 2010. Ecología y biología de *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), plaga del agave mezcalero en los Valles Centrales de Oaxaca. Naturaleza y Desarrollo. 8:59-68.
- Bent, A. F., y Mackey, D. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. Annual Review of Phytopathology.45: 399-436.
- Bunting, J. 1997. The virus that cures. <http://www.bbc.co.uk/horizon/virus.shtml>. Consultado el 29 de marzo del 2011.
- Buonario, R. 2008. Infection and plant defense responses during plant-bacterial interaction. Ait Barka, E. y Clément, C. (eds.) Plant-Microbe Interactions. Research Signpost. Perugia, Italia. 169-197.
- Braun, V., Hantke, K. y Koster, W. 1998. Metal Ions in Biological Systems, Sigel, A. y Sigel, H. (eds.) Marcel Dekker. Nueva York, Estados Unidos. 67-145.
- Cámara nacional de la industria tequilera. 2010. Estadística diciembre 2010. [http://www.tequileros.org/main\\_es.php#](http://www.tequileros.org/main_es.php#). Consultado el 5 de abril del 2011.
- Camus, A. La peste. 1947. Editorial Sudamericana. España. 1º Edición, 1999. 282 págs.
- Ceyssens, P. 2009. Isolation and characterization of lytic bacteriophages infecting *Pseudomonas aureginosa*. KatholiekeUniversiteit Leuven. Lovaina, Bélgica. 37-43.
- Chatterjee, A. K, Kerry, K. K. y Tyrell, D. J. 1985. Isolation and Characterization of Tn5 Insertion Mutants of *Erwinia chrysanthemi* That Are Deficient in Polygalacturonate Catabolic Enzymes Oligogalacturonate Lyase and 3-Deoxy-D-Glycero-2,5-Hexodiulosonate Dehydrogenase. Journal of Bacteriology. 162: 708-714.
- Chen, W. y Kuo, T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic Acids Research. 9: 2260.



- Consejo Regulador del Tequila. 2011.  
[http://www.crt.org.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=175&Itemid=185&lang=es](http://www.crt.org.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=175&Itemid=185&lang=es); consultado el 8 de abril del 2011.
- CRT-Comité Técnico Agronómico. 2005. Plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber, var. Azul. García, J. y Vicente, I. (eds.). Casa Cuervo, S.A. de C.V. y Tequila Sauza, S.A. de C.V. Guadalajara, México. 123 págs.
- Cuppels, D. A. 1983. Isolation and characterization of phages useful identifying *Pseudomonas Syringae* pv. *tomato*. *Phytopathology*. 73: 1376-1381.
- Caso, J. L., de los Reyes-Gavilán, C. G., Herrero, M., Montilla, A., Rodriguez, A. y Suarez, J. E. 1995. Isolation and characterization of temperate and virulent bacteriophage of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Science*. 78: 741-750.
- Cooper, R. M. 1984. The role of cell wall-degrading enzymes in infection and damage. Jellis, G. J. (eds.) *Plant Diseases: Infection, Damage, and Loss*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido. 13-27.
- Dalton, R. 2005. Saving the agave. *Nature*. 438: 1070-1071.
- Dublanchet, A. y Bourne, S. 2007. The epic of phage therapy. *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 18:15-18.
- Duckworth, D. H. 1976. Who Discovered Bacteriophage?. *Bacteriological Reviews*. American Society for Microbiology. 40: 793-802.
- Fisher, M. M. y Triplett, E. 1999. Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4630-4636.
- Fucikovsky, L. 2002. Diseases of some tropical and subtropical plants caused by bacteria phytoplasmas and spiroplasmas. Capítulo 10: Agaves. Universidad de Guadalajara/ Centro de Postgraduados. Guadalajara, México. 103-107.
- Gallardo, J. 2008. La producción de Mezcal en el estado de Michoacán: La producción de Mezcal en el estado de Michoacán. *CIATEJ*; 49-64.
- García, A. J. 2007. Los agaves de México. *Ciencias*. 87: 14-23.
- Granado, D. 1999. Los agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo. México. p. 80.

- Gürtler, V. y Stanisich, V. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region. *Microbiology*. 142: 3-16.
- Guss, A. 1999. *Erwinia carotovora*. Missouri S&T Biological Sciences.  
[http://web.mst.edu/~microbio/bio221\\_1999/E\\_carotovora.html](http://web.mst.edu/~microbio/bio221_1999/E_carotovora.html). consultado el 7 de abril del 2011.
- Hails, R. S. 2002. Assessing the risks associated with new agricultural practices. *Nature*. 418: 685-688.
- Hernández, E., Uvalle, J. X., Vélez, C., Rubio, R., Salamanca, M. y del Real, J. I. 2005. Plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber var. Azul. García, J. y Vicente, I. (eds.). CRT-Comité técnico agronómico. Guadalajara, México. 100-103.
- Hinrikson, H. S., Dutly, F. y Altwegg, M. 1999. Homogeneity of 16S-23S Ribosomal Intergenic Spacer Regions of *Tropheryma whippelii* in Swiss Patients with Whipple's Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 152-156.
- Instituto de ecología, UNAM. 2011. La familia Agavaceae.  
[http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/index.php?option=com\\_content&view=article&id=99&Itemid=142&lang=es](http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/index.php?option=com_content&view=article&id=99&Itemid=142&lang=es); consultado el 5 de abril del 2011.
- Illsley, C., Vega, E., Pisanty, I., Tlacotempa, A., García, P., Morales P., Rivera, G., García, J., Jiménez, V., Castro, F., y Calzada, M. 2007. Maguey papalote: hacia el manejo campesino sustentable de un recurso colectivo en el trópico seco de Guerrero México. Colunga-García, M., Saavedra, A. L., Eguiarte, L. E. y Zizumbo-Villareal, D. (eds.). 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CICY, CONACYT, CONABIO, SEMARNAT e INE, Mérida, México. 319-340.
- Jackzo, T. S., Brewer, J. W. y Harrison, M. D. 1983. The presence and location of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al. in the gut of adult *Drosophila melanogaster* (Meigen). *American Potato Journal*. 60: 853-860.
- Jiménez, I., Virgen, G., Martínez, O., Vandemark, O. y Olalde, V. 2003. Identification and characterisation of bacteria causing soft-rot in *Agave tequilana*. *European Journal of plant pathology*. 110: 317-331.
- 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: 245-262.

- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. y Gulati, A. 2008. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology*. 57:503-507.
- Klement, Z. 1963. Method for rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas*. *Nature*. 199: 299-300.
- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E. y Johnson, R. P. 2009. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. Clokie, M. R. J. y Kropinski, A. M. (eds.). *Bacteriophages: Methods and Protocols, Isolation, Characterization, and Interactions*. Humana Press. Nueva York, Estados Unidos. 501 (1): 69-76.
- McCullough, M. J., Clemons, K. V., McCusker, J. H. y Stevens, D. A. 1998. Intergenic Transcribed Spacer PCR Ribotyping for Differentiation of *Saccharomyces* Species and Interspecific Hybrids. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 1035-1038.
- McFeeters, R. F., Hankin, L. y Lacy, G. H. 1992. Pectynolitic and Pectolytic Microorganisms. Vanderzant, C. y Splittstoesser, D. F. (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association. Washington D.C., Estados Unidos. 213-223.
- McKinstry, M. y Edgar, R. 2005. Use of phages in therapy and bacterial detection. Waldor, M.K., Friedman, D. I. y Sankar, L. A. (eds.). *Phages: Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*. ASM press. Washington D.C., Estados Unidos. 316-330.
- Meyer, G. 2010. Bacteriophage. University of South Carolina. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/phage.htm>. consultado el 29 de Marzo del 2011.
- Mikiciński, A., Puławska, J., Sobiczewski, P. y Orlikowski, L. B. 2010. Pectolytic Bacteria Associated with Soft Rot of *Dieffenbachia* (*Dieffenbachia maculate*). *The Polish Phytopatological Society*. 58:21-32.
- Mullan, M. 2001. Isolation and purification of bacteriophages. *Dairy science and food technology*. <http://www.dairyscience.info/index.php/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html>. consultado el 11 de abril del 2011.
- Murata, H., McEvoy, J. L., Chatterjee, A., Collmer, A. y Chatterjee A. K. 1991. Molecular Cloning of an *aepA* Gene that Activates Production of Extracellular Pectolytic, Cellulytic, and

Proteolytic Enzymes in *Erwinia Carotovora* subsp. *Carotovora*. Molecular Plant-Microbe Interactions. 4: 239-246.

Lamb J y Loy T. 2005. Seeing red: The use of Congo Red to identify cooked and damaged starch grains in archaeological residues. Journal of Archaeological Science. 32:1433–1440.

Liu, Y., Jiang, G., Cui, Y., Mukherjee, A., Ma, L. M. y Chatterjee, A. K. 1999. kdgREcc Negatively Regulates Genes for Pectinases, Cellulase, Protease, HarpinEcc, and a Global RNA Regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. American Society for Microbiology. 181: 2411-2422.

Lozano, S. 2006. Félix D'Hérelle. Aportes a la biografía de un pasteuriano en México (1904-1911). Bitácora-e. 1: 1-16.

Omnilytics. 2004. Agriphage;

[http://www.omnilytics.com/products/agriphage/agriphage\\_info/agriphage\\_usage.html](http://www.omnilytics.com/products/agriphage/agriphage_info/agriphage_usage.html).  
consultado el 19 de abril 2011.

OEPP/EPPO. 1982. Data sheets on quarantine organisms No. 53, *Erwinia chrysanthemi*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 12.

Padilla-Aviña, K. 2008. El mal llamado SIDA del agave tequilero. Apoyos y servicios a la comercialización agropecuaria. 175: 27-33.

Pardee, A. B., Jacob, F., y Monod, J. 1959. The genetic control and cytoplasmic expression of "inducibility" in the synthesis of  $\beta$ -galactosidase in *E. coli*. Journal of Molecular Biology 1:165-178.

Pérombelon, M. C. y Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. Annual Review of Phytopathology. 18: 361-387

Ptashne, M. 2005. A Genetic Switch: Phage and higher organisms. Microbiology Bites.

<http://www.microbiologybytes.com/virology/Phages.html>. consultado el 29 de marzo del 2011.

Ravensdale, M, Blom, T. J., Gracia-Garza, J. A., Svircev, A. M. y Smith, R. J. 2007. Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Plant Pathology. 29: 121-130.

- Ried, J. L. y Collmer, A. 1986. Comparison of Pectic Enzymes Produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 52: 305-310.
- Rodriguez, G. B., 1999. Ciencia y tecnología del tequila, avances y perspectivas: *Agave tequilana* Weber var. azul: inicio del proceso. Bernache, F. y Ávalos, A. (eds.). Guadalajara, México. CIATEJ. 29.
- Sandkvist, M. 2001. Type II secretion and pathogenesis. *Infection and Immunity*. 69: 3523-3535.
- Sazci, A., Radford, A. y Erenler, K. 1986. Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. *Journal of Applied Bacteriology*. 61:559-562.
- Schanabel E. L. y Jones A. L. 2001. Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 59-64.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. y D'Ari, R. 2007. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*. 189: 8746–8749.
- Solanilla, E. L. y Palenzuela, P. R. 2009. *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 y *Dickeya dadantii* 3937, diferentes modelos de infección en bacterias fitopatógenas. *SEM*. 47: 14-18.
- Summers, W. C. 2005. History of phage research and phage therapy. Waldor, M.K., Friedman, D.I. y Sankar, L.A. (eds.). *Phages: Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*. ASM press. 3-17.
- Suly12. 2008. Bacteriophage lysogenic and lytic cycle. New world encyclopedia.<http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Image:Phage2.JPG>. consultado el 18 de abril del 2011.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R. y Polasky, S. 2002. Agricultural Sustainability and intensive production practices. *Nature*. 418: 671-677.
- Todar, K. 2008. Online Textbook of Microbiology: The bacteriophages. Kenneth Todar, Ph.D; <http://textbookofbacteriology.net/phage.html>. Consultado el 30 de marzo del 2011.
- Topley, W. W. C. y Wilson, G. S., 1990. Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Collier, L. H. y Timbury, M. C. (eds.) B.C. Decker. 4:52–53.

- Toth, I. K., Avrova, A. O. y Hyman, L. J. 2001. Rapid Identification and Differentiation of the Soft Rot *Erwinias* by 16S-23S Intergenic Transcribed Spacer-PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4070–4076.
- Trewavas, A. 2002. Malthus failed again and again. *Nature*. 418: 668-670.
- Valenzuela-Zapata, A. G. 1994. El agave tequilero: Su cultivo e industrialización. *Agata*. 119.
- Vallejo, M. 2008. La producción de Mezcal en el estado de Michoacán: Perspectivas de la actividad. *CIATEJ*. México, 111-118.
- Van Twest, R. y Kropinski, A. M. 2009. Bacteriophage enrichment from water and soil; Martha, R., Clokie, J. y Kropinski, A. M. (eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Humana Press: Isolation, Characterization, and Interactions. 501 (1): 15-22.
- Venkatesh, B., Babujee, L., Liu, H., Hedley, P., Fujikawa, T., Birch, P., Toth, I. y Tsuyumu, S. 2006. The *Erwinia chrysanthemi* 3937 PhoQ Sensor Kinase Regulates Several Virulence Determinants. *Journal of Bacteriology*. 188: 3088–3098.
- Waleron, M., Waleron, K., Podhajska, A. J. y Lojkowska, E. 2002. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology*. 148: 583-595.
- Waring, G. L. y Smith, R. L. 1986. Natural history and ecology of *Scyphophorus acupuntatus* (Coleoptera: *Curculionidae*) and its associated microbes in cultivated and native agaves. *Annals of Entomological Society of America*. 79: 334-340.
- Williamson, K. E., Wommack, K. E. y Radosevich, M. 2003. Sampling natural viral communities from soil for culture-independent analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 6628–6633.
- Watanabe, K., y Takesue, S. 1972. The requirement for calcium in infection with *Lactobacillus* phage. *Journal of General Virology*. 17: 19-30.
- Woodroff, R. E. y Pierce, W. H.. 1973. *Scyphophorus acupuntatus*, a weevil pest of yucca and agave in Florida (Coleoptera: Curculionidae). Florida Dept. Agr. & Consumer Services Division of Plant Industry. Entomology Circular No. 135: 1-2.

- Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 45:225-229.
- Gough, C. L., Genin, S., Zischek, C. y Boucher, C. A. 1992. hrp genes of *Pseudomonas solanacearum* are homologous to pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria. *MOI. Plant-Microbe Interact.* 5: 384-389.
- Roberts, D. E., Denny, T. P. y Schell, M. A. 1988. Cloning of the egl gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *Journal of Bacteriology*. 70: 1445-1451.
- Solanilla, E. L. y Palenzuela, P. R. 2009. *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 y *Dickeya dadantii* 3937, diferentes modelos de infección en bacterias fitopatógenas. *Sociedad Española de Microbiología*. 47: 14-18.

## Anexo I: Componentes de los Medios de Cultivo

Medios para crecimiento y conservación de colonias de bacterias:

### M9+PGA para 1 L

Reactivo	Cantidad
Sales M9 5x	200 mL
MgSO <sub>4</sub>	2 mL
CaCl <sub>2</sub> 1M	0.1 mL
PGA 5% (pH5.5)	20%

### Sales M9 5X para 1 L

Reactivo	Cantidad
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	64 g
NaCl	25 g
NH <sub>4</sub> Cl	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g

### M9+PGA con agar para 1 L

Mismos componentes que el medio M9+PGA, solo se le agrega agar.

Agar	15 g
------	------

### Agar nutritivo para 1 L (pH 7.4)

Reactivo	Cantidad
Extracto de carne	1 g
Extracto de Levadura	2 g
Peptona	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g

### LB líquido 1 L (pH 7.0)

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g



NaCl	10 g
------	------

Medios para caracterización bioquímica:

Medio PEL (Para preparar 1 L)

Reactivo	Cantidad
Bacto Agar	16 g
Bacto Extracto de Levadura al 20%	5 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10%	10 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O al 1M	1 mL
Glicerol al 50%	10 mL
Ácido Poligalacturónico al 2%	250 mL
Buffer fosfato para medio PEL	200 mL

Ingredientes para el Buffer fosfato para medio PEL:

Buffer fosfato para medio PEL (pH 8.0)

Reactivo	Cantidad
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhídrido	15 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .1H <sub>2</sub> O	0.7 g

Medio CEL (para preparar 1L)

Reactivo	Cantidad
Carboximetil Celulosa	10 g
Bacto Agar	16 g
Bacto Extracto de Levadura al 20%	25 mL
Glicerol al 50%	4 mL
Fosfato 50x	20 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10%	10 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O al 1%	10 mL

Medio Agar con Azúcar y bacterias:

Reactivo	Cantidad
Bacterias crecidas en LB	1 OD

---

Azúcar	5%
Agar	1%
H2O	Ajustar volumen según se requiera.

---

## Anexo II: Buffers

Buffer de lisis (*Cheny Kuo. 1993*)

Reactivo	Concentración
Tris acetato (pH 7.8)	40 mM
Acetato de sodio	20 mM
EDTA	1 mM
SDS	1%

Buffer fosfato de potasio pH 6.8 (*DeAngelis, 1997*)

Reactivo	Cantidad
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> al 1M	49.7 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> al 1M	50.3 mL

10X Dream Taq™ Buffer (*Fermentas*)

Como este es un buffer con una formulación patentada todo cuanto se menciona, en una nota del proveedor, es que contiene KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 20mM

## Buffer TAE 50x (Solución de anaquel. 1L)

Reactivo	Cantidad
Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	100 mL
Agua desionizada	750 mL

1X NEBuffer 4 pH 7.9 a 25 °C (*New England Biolabs Inc.*)

Reactivo	Concentración
Acetato de potasio	50 mM
Tris Acetato	20 mM
Acetato de Magnesio	10 mM
Ditiotreitol	1 mM