

Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica

“Aislamiento e Identificación molecular de
cepas de *Streptomyces* causantes de
sarna común en la papa”

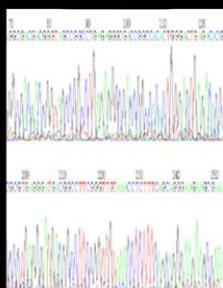
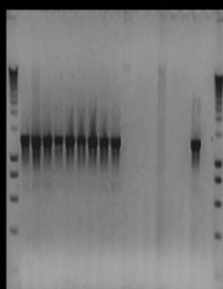
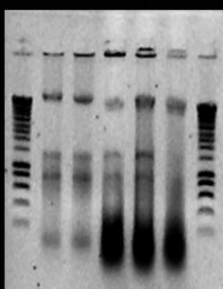
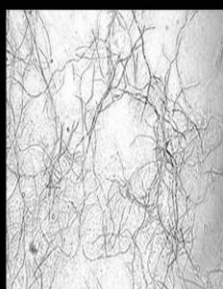
María Inés Lapaz Eugui

Tutor: María Julia Pianzzola

Co-Tutor: Enrique Verdier

Cátedra de Microbiología-Facultad de Química
Departamento Laboratorios Biológicos, DGSSAA-MGAP

Diciembre 2011



RESUMEN

La sarna común es una enfermedad causada por bacterias filamentosas del género *Streptomyces*. Dentro de las especies que causan esta enfermedad, se destaca como el patógeno más antiguo a *Streptomyces scabies*, presente en la mayoría de las zonas paperas del mundo. Sin embargo más recientemente, han surgido patógenos emergentes de gran relevancia como lo son *S. acidiscabies* y *S. turgidiscabies*.

Durante las últimas zafras de papa en Uruguay, se han observado significativas pérdidas de tubérculos por la presencia de sarna común, provocando disminución de la calidad y por consiguiente, pérdidas económicas muy importantes para los productores. Esta problemática hizo indispensable conocer la identidad de las cepas causantes de esta enfermedad, en particular porque los tubérculos presentaron una nueva sintomatología asociada. En este trabajo se aislaron 42 cepas de *Streptomyces* spp. a partir de síntomas de “pozo o cráter” de 2-3 cm de diámetro por 1 cm de profundidad aproximadamente, que se identificaron por técnicas clásicas y moleculares. A partir de los cultivos puros, se observaron las características morfológicas de las colonias, la estructura microscópica del micelio y se determinó la producción de melanina. Se realizó la identificación molecular por PCR convencional utilizando como marcadores filogenéticos el gen del ARNr 16S y el gen *rpoB*. También se utilizaron cebadores dirigidos a regiones específicas del gen del ARNr 16S para las especies que comúnmente causan sarna común *S. scabies*, *S. acidiscabies* y *S. turgidiscabies*. Se escogieron algunos de los fragmentos amplificados para su secuenciado. El análisis de las secuencias se realizó por comparación con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank (NCBI) mediante BLASTn. Para determinar la patogenicidad de las cepas, se amplificaron mediante PCR regiones de los genes marcadores de patogenicidad *txtAB*, *nec1* y *tomA* y también se realizó el ensayo de patogenicidad en discos de papa. Dentro de las cepas patógenas aisladas se identificó la especie *S. acidiscabies* como responsable de sarna común en el cultivo de papa durante la zafra de 2010. Esto representa el primer reporte de este patógeno en nuestro país.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
EtOH	Etanol
IPA	Isla de patogenicidad
NPPC	Nistatina, Polimixina, Penicilina, Cicloheximida
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIS	Proyecto Internacional de <i>Streptomyces</i>
PSNR	Péptido sintetasas no ribosomales
RNAsa	Ribonucleasa A
Rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato sódico
TBE	Buffer Tris borato
TE	Buffer Tris EDTA
TGH	Transferencia genética horizontal
Tris	Trihidroximetil aminometano
UV	Ultravioleta
YME	Yeast malt extract

INDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Antecedentes generales de la papa	2
1.1.2 El cultivo de papa en Uruguay.....	2
1.1.3 Antecedentes de la sarna común en el mundo	3
1.1.4 Antecedentes de Sarna de papa en Uruguay	3
1.2 Enfermedad de la Sarna Común en la papa.....	5
1.2.1 Sintomatología	5
1.2.2 Organismo causal	7
1.2.3 Desarrollo de la enfermedad	19
2 OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO.....	21
2.1 Objetivo General	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
2.3 Estrategia del presente trabajo.....	22
3 Materiales y Métodos.....	23
3.1 Materiales.....	24
3.1.1 Muestras	24
3.1.2 Cepas aportadas por la Facultad de Agronomía.....	25
3.1.3 Cebadores.....	26
3.2 Métodos	27
3.2.1 Procesamiento de las muestras y obtención de aislamientos	27
3.2.2 Conservación de las cepas.....	27
3.2.3 Características morfológicas	28
3.2.4 Producción de melanina	28
3.2.5 Ensayo de patogenicidad en discos de papa.....	28
3.2.6 Técnicas Moleculares.....	29
4 RESULTADOS	32

4.1 Aislamiento de cepas de <i>Streptomyces</i> a partir de tubérculos con síntomas severos de sarna común	33
4.2 Identificación de las cepas por métodos moleculares	34
4.2.2 Amplificación por PCR con cebadores dirigidos hacia el gen de ARNr 16S para el Dominio Bacteria.....	34
4.2.3 Amplificación por PCR con cebadores especie-específicos dirigidos hacia el gen de ARNr 16S	35
4.2.4 Amplificación por PCR con cebadores dirigidos hacia el gen <i>rpoB</i>	37
4.3 Identificación de las cepas por métodos convencionales.....	38
4.4 Determinación de factores de patogenicidad	40
4.4.1 Amplificación mediante PCR de genes marcadores de patogenicidad	40
4.4.2 Ensayo de patogenicidad	41
4.5 Resumen de los resultados	42
5 DISCUSIÓN.....	43
5.1 Aislamiento de cepas de <i>Streptomyces</i> a partir de tubérculos con síntomas severos de sarna común	44
5.2 Identificación de las cepas por métodos moleculares	44
5.2.1 Extracción de ADN	44
5.2.2 Amplificación por PCR con cebadores dirigidos hacia el gen de ARNr 16S para el dominio Bacteria.....	44
5.2.3 Amplificación por PCR con cebadores especie-específicos.....	45
5.2.4 Amplificación por PCR con cebadores dirigidos hacia el gen <i>rpoB</i>	45
5.3 Identificación de las cepas por métodos convencionales.....	46
5.4 Determinación de factores de patogenicidad	47
5.4.1 Amplificación mediante PCR de genes marcadores de patogenicidad	47
5.4.2 Ensayo de patogenicidad	48
6 CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	49
7 APÉNDICE	51
7.1 Medios de cultivos	52
7.2 Reactivos	52

7.3 Ubicación de las secuencias de los cebadores utilizados en el gen ARNr 16S.....	53
7.4 Fotos de las muestras	54
8 BIBLIOGRAFÍA.....	55

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Antecedentes generales de la papa

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los cuatro cultivos alimentarios más importantes del mundo después del trigo (*Triticum aestivum*), el maíz (*Zea mays*) y el arroz (*Oryza sativa*) (Gouws, 2006). Esto es debido a su alto contenido de hidratos de carbono, su valor energético y a los múltiples usos a los que se destina: nutrición humana, alimentación animal y materia prima para diversas industrias. En el mundo hay una superficie total cultivada aproximada de 18 millones de hectáreas, con una producción cercana a los 300 millones de toneladas. Constituye el cultivo que más se expande en superficie de plantación en los países en desarrollo (Cancino, 2003).

1.1.2 El cultivo de papa en Uruguay

El cultivo de papa en Uruguay comprende aproximadamente 8.000 ha, con un rendimiento medio de 15 a 20 ton/ha. El volumen total de producción anual es de alrededor de 140.000 toneladas. Esta producción se dedica por lo general a abastecer el mercado interno y se consume mayoritariamente en forma fresca. La utilización de papa en la industria es inferior al 10% del volumen total producido, y se limita a chips, congeladas y peladas/cortadas refrigeradas.

En términos económicos, el valor comercializado de papa es superior al del resto de los rubros granjeros, con más de U\$S 50.000.000 anuales. Debido a que es la principal hortaliza utilizada en el país, su consumo está muy generalizado: es superior a 40 kg/habitante/año.

La principal zona de producción del cultivo de papa, está ubicada en el departamento de San José, esta ha llegado en el período más extendido de plantación al 75% del área. El cultivo de primavera tiene ventajas en el Noreste por mayor radiación (Tacuarembó), mientras que en el verano, en la zona Este se tienen mejores condiciones relativas por temperaturas más favorables (Rocha) (Vilaró, 2008).

Los datos más actuales sobre el cultivo de papa son de la zafra de otoño 2010, según una encuesta realizada por la División de Estadísticas Agropecuarias del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (DIEA-MGAP, 2010). En esta zafra se cultivaron 3.202 hectáreas, obteniéndose una producción de 63.480 toneladas. La producción almacenada (del área cosechada a la fecha de la encuesta) fue estimada en 15.416 toneladas. De la misma, algo más de 5 mil toneladas habían sido reservadas para semilla para la siembra de otoño de 2011 y el resto estaba destinado a la venta para consumo doméstico.

El cultivo de papa se distribuyó en todo el país, siendo la *Zona Sur* la que contó con la mayor área cultivada de un 78%, concentrándose el 73% de la misma (2.3 mil hectáreas) en el departamento de San José. En la siguiente tabla se muestra la superficie de hectáreas cultivadas de papa en la Zafra de otoño 2010 por departamento.

Tabla 1: Zafra Otoño 2010-Número de explotaciones y superficie según zona y departamento.

Zona	Explotaciones	Superficie sembrada	
		Ha	%
Total	105	3202	100
Zona Sur	83	2510	78
San José	70	2350	73
Canelones	4	57	2
Flores	2	36	1
Colonia	4	33	1
Montevideo	2	16	0
Soriano	1	10	0
Zona Este	9	408	13
Rocha	7	303	9
Maldonado	2	105	3
Zona Norte	13	293	9
Tacuarembó	8	243	8
Rivera	2	28	1
Salto	3	23	1

Fuente: DIEA–MGAP

Las siembras comprenden un número elevado de variedades de papa, que se corresponden con la diversidad de zonas y condiciones de producción. En la Zafra de otoño 2010 se utilizaron más de 12 variedades de las cuales tres aportaron el 92% del área total: Chieftain (88%), Inia Ipóra (2%) y Norland (2%) (DIEA–MGAP, 2010).

1.1.3 Antecedentes de la sarna común en el mundo

La sarna común es una seria enfermedad que afecta el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) y otros cultivos de raíces y tubérculos incluyendo rábano, remolacha, zanahoria, nabo y boniato. Sin duda es la enfermedad de mayor importancia económica dentro de las causadas por especies del género *Streptomyces*. Esta enfermedad reduce la comercialización, el procesamiento de la papa y los tubérculos semilla de papa debido a los síntomas externos y la naturaleza de transmisión de los patógenos. La mayoría de las variedades de papa cultivadas son susceptibles a la sarna (Loria *et al.*, 1997), la cual se ha reportado en las Américas, India, África y Asia (Wanner, 2006).

1.1.4 Antecedentes de Sarna de papa en Uruguay

En Uruguay siempre se han observado en los cultivos de papa síntomas leves de sarna común (sarna reticulada), esta enfermedad durante muchos años no fue un problema para la producción. Sin embargo, desde el 2007 diversos problemas se han suscitado con la importación de papa semilla, dando lugar a diversas enfermedades. De estas, la enfermedad que mayores perjuicios ha causado es la sarna común, observándose en el cultivo de papa síntomas severos (sarna profunda).

La zafra en la cual hubo mayores pérdidas a causa de esta enfermedad, fue la zafra de otoño 2010 (Grela *et al.*, 2010). Donde de 3202 hectáreas que se plantaron en el país (DIEA–MGAP, 2010), unas mil hectáreas presentaron problemas serios de descarte de tubérculos de papa, por presencia de síntomas muy severos de la enfermedad denominada sarna común de la papa causada por *Streptomyces* spp. Este descarte que significó en varios casos de hasta el 80% de lo cosechado, desconcertó a productores y técnicos no solo por una alta incidencia y severidad de la enfermedad, sino que además la sintomatología fue diferente a los síntomas típicos de la sarna común observados hasta ese momento. Los síntomas predominantes fueron pústulas irregulares, corchosas, sobresaliendo de la superficie de la papa y hoyos profundos irregulares con bordes elevados de más de 10 mm de profundidad. Los tubérculos presentaron esporulación, presencia de micelio blanquecino y al aumentar ambos síntomas, confluían cubriendo gran parte del tubérculo haciéndolo no apto para el comercio ni tampoco para su uso como semilla.

Por lo descrito anteriormente, quedó en evidencia que se estaba ante una problemática sanitaria diferente. Además por presentar una agresividad muy importante en suelos ácidos (menos de pH 5) y en cultivos con riego, lo que no se correspondía con las condiciones más favorables para el desarrollo de *Streptomyces scabies*, patógeno distribuido mundialmente.

Por lo antes expuesto se consideró la posibilidad, de estar ante un nuevo patógeno presente en nuestro país. Frente a esta problemática surgió la necesidad de desarrollar trabajos de investigación que generaran conocimiento e identificaran al agente causal de ésta enfermedad en el cultivo de papa en Uruguay.



Figura 1: Tubérculo con síntomas de sarna común comúnmente observados en Uruguay.



Figura 2: Tubérculo con síntomas de sarna común extraído de la zafra de otoño 2010.

1.2 Enfermedad de la Sarna Común en la papa

1.2.1 Sintomatología

En los tubérculos de papa los síntomas de la sarna común, van desde unas pocas manchas marrones superficiales o elevadas sobre la piel, hasta pozos oscuros que se extienden varios milímetros. Las lesiones pueden ser pequeñas y discretas, o pueden unirse para cubrir varias zonas de la superficie del tubérculo (Wanner, 2006). Las lesiones pueden variar considerablemente de aspecto, pudiendo estar presentes distintos síntomas en un mismo tubérculo (Loria *et al.*, 1997; Cancino, 2003).

1.2.1.1 Descripción y denominación de distintos tipos de síntomas:

Sarna normal o reticulada: Las lesiones son redondeadas estrelladas con bordes agrietados o una serie de capas irregulares pero concéntricas, rodeando una depresión central (Figura 3A).

Sarna superficial o elevada: Pústulas o lesiones levantadas en la superficie del tubérculos, de forma circular entre 5-10 mm de diámetro, aspecto corchoso y color marrón. Las pústulas pueden unirse y formar superficies afectadas más grandes (Figura 3B).

Sarna profunda: Las lesiones pueden permanecer aisladas, pero si el ataque es grave las grietas y surcos se desarrollan formando hoyos color café oscuro de hasta 1 cm de profundidad (Figura 3C), el tejido debajo de la lesión es de color café claro y traslúcido (Cancino, 2003).

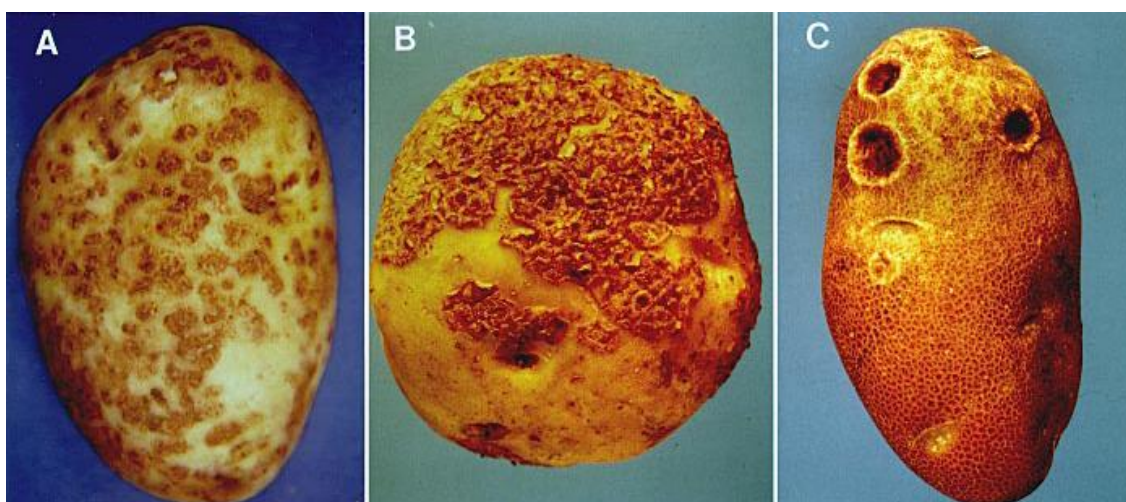


Figura 3: Tipos de síntomas de sarna común en tubérculos de papa causados por *S. scabies*. **A**, Sarna reticulada; **B**, Sarna elevada; **C**, Sarna profunda. Extraído de Loria *et al.*, 1997.

1.2.1.2 Factores que contribuyen al tipo de lesión y severidad

La enfermedad resulta de la interacción entre la planta, las condiciones ambientales y el patógeno. El resultado de esta interacción se traduce en diferencias en el tipo de lesión, la incidencia y la severidad de la enfermedad de región a región (o de un campo a otro dentro de la misma región o de año a año en el mismo campo), lo que complica los esfuerzos para comprender la contribución de cada componente en la enfermedad (Wanner, 2009). Los factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad son:

Resistencia del cultivo

En los cultivos varía el nivel de resistencia; hoy en día no existen cultivares inmunes a la infección, pero hay algunos con niveles altos de resistencia. Sin embargo, bajo condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, presentan la sintomatología (Wanner, 2009). La penetración del patógeno estimula a los tejidos del tubérculo a formar una barrera dependiendo de la susceptibilidad del tubérculo. Esta barrera se limita a unas pocas células por debajo de la superficie. Si esta primera barrera impide que la invasión avance, se forma una sarna superficial. Si por el contrario, la barrera es vencida, se forma una segunda barrera y a menudo una tercera antes que la penetración se detenga provocando de esta forma una lesión más profunda (Cancino, 2003).

Virulencia de la especie de *Streptomyces* involucrada

La virulencia del patógeno depende de los factores de patogenicidad (Nec1, el homólogo de la tomatinasa, la taxtomina A entre otros) que la cepa posea y de cuánto se expresen. Se ha demostrado que la fitotoxina llamada taxtomina A producida por *S. scabies*, es determinante en el grado de patogenicidad del agente (Loria *et al.*, 1997). Dentro de este género existen distintas cepas que difieren en la cantidad de taxtomina producida. Aquellas cepas que producen baja cantidad de taxtomina A provocan síntomas superficiales, mientras que las que producen un mayor nivel de ésta fitotoxina generan lesiones más profundas (Loria *et al.*, 1995).

Condiciones ambientales

Los factores ambientales como la humedad del suelo y el pH parecen jugar un papel en la variabilidad, en la incidencia y la severidad de la sarna común (Wanner, 2009). Dependiendo del patógeno que esté en juego, las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad varían. La sarna causada por el agente causal más distribuido en el mundo; *S. scabies*, se asocia con estaciones secas y calientes. El mantenimiento de humedad alta en los suelos durante las etapas tempranas del crecimiento del tubérculo, es una estrategia muy usada para prevenir esta enfermedad. Sin embargo, los brotes de sarna son frecuentes en las condiciones del suelo con irrigación o húmedo en el norte de Europa, Israel

y Canadá. La alcalinidad del suelo (pH superior a 7) se ha considerado tradicionalmente a favor de la sarna, aunque la “sarna ácida” ocurre a un pH 5 o menor y es causada por *S. acidiscabies*. La evolución de las cepas de *Streptomyces* para adaptarse a las nuevas condiciones no es sorprendente, considerando la ubicuidad del género junto con la transferencia horizontal de una isla de patogenicidad que poseen (Wanner, 2006).

1.2.2 Organismo causal

La sarna común en la papa, es una enfermedad causada por un complejo de especies de bacterias del suelo, del género *Streptomyces* (Wanner, 2009). La patogenicidad en plantas en este género es rara, de más de 900 especies descritas, solo una docena poseen esta característica (Bignell *et al.*, 2010).

1.2.2.1 Características generales del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* pertenece a la familia Streptomycetaceae y al orden de los Actinomicetales, incluye bacterias filamentosas, miceliares, Gram-positivas, aerobias, saprofitas, capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía (Sanz, 2005; Janssen, 2006). Este género está ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo el suelo su hábitat más común. Este grupo de bacterias tienen la capacidad de producir una amplia gama de enzimas catabólicas, que degradan polímeros biológicos complejos, incluidos los recalcitrantes de celulosa y la quitina (Loria *et al.*, 2008). Se parecen a los hongos por ser pleomórficos y producir un micelio normalmente diferenciado en micelio vegetativo y micelio aéreo, pero presentan características típicas de procariotas tales como la carencia de núcleo, mitocondrias y cloroplastos (Sanz, 2005). Las especies de *Streptomyces* tienen un ADN con una alta proporción de guanina y citosina (74% G+C) y en algunas especies se ha demostrado que poseen un único cromosoma lineal. También contiene frecuentemente plásmidos circulares y lineales que se suman a la capacidad de adaptación y sin duda, mejoran la transferencia horizontal de genes (Loria *et al.*, 2006). Los miembros de este género son conocidos por su capacidad de producir metabolitos secundarios biológicamente activos (Loria *et al.*, 1997), siendo fuentes de una serie de antiinflamatorios, compuestos inmunosupresores (Hopwood, 2006) y en particular de más de la mitad de los antibióticos incluyendo aquellos farmacéuticamente importantes, como la estreptomicina. Estos compuestos probablemente mejoran la capacidad de las especies de *Streptomyces* para sobrevivir en el suelo, que es un medio ambiente altamente competitivo. Sin embargo, sólo una proporción muy pequeña de las especies de *Streptomyces* descritas son conocidas como patógenos de plantas o animales (Loria *et al.*, 1997).

Ciclo de vida

Los estreptomicetos presentan un ciclo de vida complejo que implica procesos de diferenciación morfológica y fisiológica. Estas bacterias son capaces de colonizar sustratos relativamente secos con restos de materia orgánica, formando una red de hifas tabicadas ramificadas que dan lugar al "micelio sustrato". Estas hifas obtienen los nutrientes de la degradación del material orgánico insoluble gracias a numerosas enzimas hidrolíticas. En una primera etapa, las zonas más alejadas de la fuente de nutrientes empiezan a acumular sustancias de reserva (lípidos, glucógeno, etc.), hasta que debido a la carencia de nutrientes, se reciben una serie de señales en dicha zona que disparan la expresión de genes implicados en la formación del micelio aéreo. Se produce así, el desarrollo de hifas que emergen del "micelio sustrato" para dar lugar al micelio aéreo. Estas hifas se nutrirán de los productos de degradación del "micelio sustrato", y en una segunda etapa van a sufrir un proceso de curvatura, enrollamiento, formación de septos y engrosamiento de la pared celular para dar lugar a una cadena de esporas uninucleares, que se liberarán al medio y que con las condiciones adecuadas, germinarán y desarrollarán un nuevo "micelio sustrato" (Figura 4) (Sanz, 2005). En contraste con otras bacterias que producen esporas como mecanismo de defensa, las especies de *Streptomyces* las producen como principal método de dispersión. Las cadenas de esporas son una característica morfológica y taxonómica importante, ya que dependiendo de la especie, las formas de las cadenas, pueden ser rectas, ramificadas, en espiral o flexuosas (Shirling y Gottlieb, 1966). La producción y secreción de metabolitos secundarios, coincide por lo general con el inicio de la diferenciación morfológica, una vez terminado el desarrollo vegetativo (Loria *et al.*, 2006).

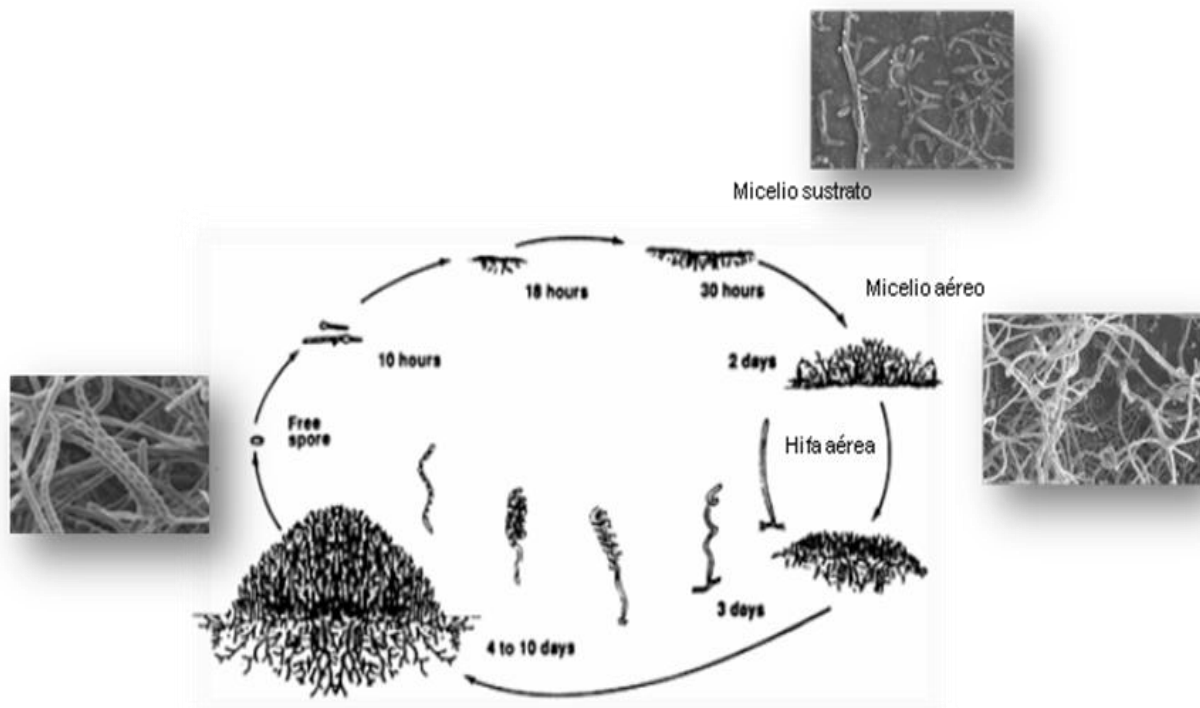


Figura 4: Ciclo de vida de *Streptomyces* extraído de Sanz, 2005. Fotografías extraídas de Claessen *et al.*, 2006.

1.2.2.2 Especies de *Streptomyces* causantes de sarna común y su distribución geográfica

Los patógenos de plantas del género *Streptomyces* se han clasificado en una serie de especies, en base a la comparación de secuencias del ADN ribosomal 16S y características bioquímicas.

El patógeno más ampliamente descrito de este género es *Streptomyces scabies* (Wanner, 2006), el cual tendría una distribución mundial, si bien, varios informes recientes indican que es poco frecuente en Europa (Bouчек-Mechiche *et al.*, 2000; Flores-González *et al.*, 2008; Kreuze *et al.*, 1999). Con el desarrollo de la caracterización genética molecular de las especies causantes de la sarna común, se hizo evidente que *Streptomyces scabies* era un complejo de especies (Bouчек-Mechiche *et al.*, 2000; Bukhalid *et al.*, 2002; Doering-Saad *et al.*, 1992; Healy and Lambert, 1991; Takeuchi *et al.*, 1996). Recientemente, las cepas de *Streptomyces scabies* se diferenciaron en tres especies morfológicamente similares pero genéticamente diferentes, según su relación de ADN-ADN, la secuencia del ADNr 16S (Cullen y Lees, 2006) y el análisis celular de ácidos grasos (Ndowora *et al.*, 1996). Estas especies son *S. scabies*, *S. europaeiscabiei* y *S. stelliscabiei* (Bouчек-Mechiche *et al.*, 2000; Bukhalid *et al.*, 2002). *S. europaeiscabiei* se ha identificado en Europa, Corea, Estados Unidos y Canadá (Bouчек-Mechiche *et al.*, 2000; Flores- Gonzalez *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2004; Wanner, 2006, 2009). *S. stelliscabiei* se ha informado en Francia, Estados Unidos y Canadá (Bouчек-Mechiche *et al.*, 2000; Wanner, 2006, 2009). Especies filogenéticamente más distantes causantes de sarna se conocen en varias regiones, incluyendo *S. turgidiscabies* en Japón, Finlandia, Corea, Suecia y América del Norte (Miyajima *et al.*, 1998; Lindholm *et al.*, 1997; Lehtonen *et al.*, 2004; Wanner , 2009) y *S. acidiscabies* causante de la “sarna ácida” en América del Norte, Corea, Japón y Canadá (Lambert and Loria 1989a; Song *et al.*, 2004; Faucher *et al.*, 1992). Se han descrito tres nuevas especies en Corea (*S. luridiscabieie*, *S. puniscabiei* y *S. niveiscabieie*), como causantes de síntomas de sarna común también en medio ácido (Park *et al.*, 2003). Recientemente se identificó en Idaho (EE.UU) un nuevo grupo de *Streptomyces* que causan sarna (Wanner, 2007b).

1.2.2.3 Características morfológicas, fisiológicas y moleculares de las especies más descritas

Los patógenos inductores de sarna común más estudiados son: *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies* y *Streptomyces turgidiscabies*. Estas tres especies no tienen relación según, la secuencia de ADN ribosomal 16S, hibridación ADN-ADN, características morfológicas y bioquímicas (Gouws, 2006). Además estas especies no son ni tejido, ni huésped específicas por lo que pueden inducir lesiones de sarna en diferentes tubérculos y raíces (Bignell *et al.*, 2010).

1.2.2.3.1 *Streptomyces scabies*

Es un actinomiceto que se encuentra en el suelo y es considerado el mayor agente causal de sarna común (Faucher *et al.*, 1992). Este microorganismo se describió en 1892, como *Oospora scabies* por Thaxter. Posteriormente, se reclasificó como *Actinomyces scabies* (Güssow), y más tarde como *Streptomyces scabies* por Waksman y Henrici. En 1989 Lambert y Loria realizaron la descripción definitiva, ya que la cepa señalada anteriormente por Waksman no describía con precisión al organismo aislado de los tejidos enfermos. Lambert y Loria (1989a) lo caracterizaron por



Figura 5: Cadenas de esporas de *S. scabies*. Extraído de Loria *et al.*, 1997.

tener esporas grises que forman cadenas en espiral, producción del pigmento melanina en medios que contienen tirosina como el agar peptona hierro y por la utilización de los nueve azúcares utilizados para la caracterización de especies de *Streptomyces* recomendado por el Proyecto Internacional de *Streptomyces* (PIS) (Shirling and Gottlieb, 1966; Lambert and Loria, 1989a). El crecimiento de esta especie es inhibido en medios con pH menor a 5.2 (Faucher *et al.*, 1992). Este patógeno puede causar lesiones elevadas, superficiales y profundas, pero las lesiones elevadas son las más comunes. *S. scabies* ha causado sarna en la papa en muchos países de Europa oriental y occidental, África del Sur, Australia, Nueva Zelanda e Israel, así como en los Estados Unidos y Canadá. Pero también este patógeno ha producido sarna en los cultivos de raíces como el rábano, el nabo y la zanahoria. Curiosamente, *S. scabies* infecta al maní, lo que resulta en una enfermedad llamada "verruca de la vaina del maní" que se caracteriza por elevadas lesiones necróticas en los cascos de maní en el sur de África. Otras especies de *Streptomyces* también han causado esta enfermedad en Israel.

La casi totalidad de las investigaciones realizadas hasta la fecha sobre la ecología y manejo de las enfermedades causadas por especies de *Streptomyces* se han centrado en *S. scabies*. Su transmisión a los cultivos de papa se hace a través del suelo o por los tubérculos. *S. scabies* parece estar adaptado a los suelos con buen drenaje y pH neutro en donde el cultivo de papa y hortalizas de raíz son comúnmente cultivados. La temperatura óptima para el crecimiento de *S. scabies* es de 30°C, lo que es consistente con las observaciones del incremento en la severidad de la sarna en la papa durante las temporadas con temperaturas más altas de lo normal. Se inhibe en suelos con humedad alta, lo que ha llevado a la utilización del riego para el control de la enfermedad. La sarna es más severa en suelos con un pH de 5.2 a 7.0. Por lo tanto, su control se podría lograr reduciendo el pH del suelo por debajo de 5.2 mediante el uso de fertilizantes productores de ácido o aplicaciones de azufre. Sin embargo, los suelos con valores de pH lo suficientemente bajos para inhibir a *S. scabies*, son desfavorables para el crecimiento de muchos cultivos agronómicos y hortalizas. Por lo tanto, los productores que mantienen el pH del suelo por debajo de 5.2 para el control de la sarna, se limitan a la siembra de otros cultivos (Loria *et al.*, 1997).

1.2.2.3.2 *Streptomyces acidiscabies*

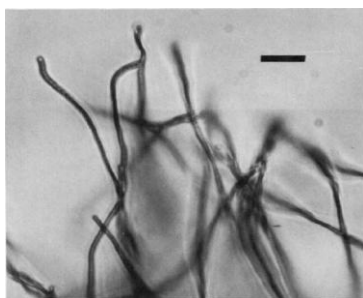


Figura 6: Cadena de esporas de *S. acidiscabies*. Extraído de Lambert and Loria 1989.

Esta especie fue aislada por primera vez en Estados Unidos y descrita por Bonde y McIntyre (1968) y por Manzer (1977) y fue nombrado por Loria en 1989 como *Streptomyces acidiscabies*. Estos investigadores encontraron diferencias entre el patógeno de la sarna común y la sarna ácida en el uso de rafinosa como fuente de carbono, en la morfología de las cadenas de esporas y en la tolerancia de suelos con pH bajos (Lambert and Loria 1989a).

S. acidiscabies se caracteriza por la producción de esporas de color blanco a rosa que se agrupan formando cadenas de forma ondulada y por tener un pigmento difusible sensible al pH color rojo o amarillo (Loria *et al.*, 1997). La estructura de este pigmento, sugiere que puede tener propiedades antibióticas (King *et al.*, 1996). *S. acidiscabies* no produce melanina en medio tirosina ni en medio agar peptona hierro. Utiliza como fuente de carbono L-arabinosa, D-fructosa, D-glucosa, i-inositol, D-manitol, ramnosa, sacarosa y D-xilosa pero no rafinosa (Lambert and Loria, 1989a).

Este organismo es ácido tolerante, puede crecer en cultivo a pH 4.0 mientras que el pH mínimo al que puede crecer *S. scabies* es 5.2. *S. acidiscabies* causa "sarna ácida" término que describe la aparición de la enfermedad en suelos con pH bajos (Loria *et al.*, 2010).

La "Sarna ácida" fue reportada por primera vez en Maine en 1953 por Manzer y McIntyre. Los síntomas fueron idénticos a los producidos por *S. scabies*, pero la enfermedad se produjo en suelos con valores de pH tan bajos como 4.5. El organismo causal fue claramente diferente de *S. scabies* basado en las características morfológicas, fisiológicas e inmunológicas.

S. acidiscabies a diferencia de *S. scabies* parecería no sobrevivir en el suelo durante largos períodos de tiempo. Puede producir síntomas de sarna en los cultivos de raíz pivotante, al igual que *S. scabies*, pero no ha sido reportado como un patógeno de importancia comercial para estos cultivos. Los cultivares que muestran la mayor resistencia a la infección por *S. scabies* también son más resistentes a la infección por *S. acidiscabies*.

Se ha confirmado su presencia en el Noreste de Estados Unidos, Corea, Japón y Canadá (Lambert and Loria 1989a; Song *et al.*, 2004; Faucher *et al.*, 1992).

1.2.2.3.3 *S. turgidiscabies*

Esta especie ha sido descrita en la isla de Hokkaido en Japón, Finlandia, Corea, Suecia y América del Norte (Miyajima *et al.*, 1998; Lindholm *et al.*, 1997; Lehtonen *et al.*, 2004; Wanner, 2009). Tiene un amplio rango de hospederos entre los cultivos de raíces y produce síntomas indistinguibles respecto a los causados por *S. scabies* (Loria *et al.*, 2010). Las cepas tienen esporas grises y forman cadenas

onduladas, no produce melanina ni otra producción de pigmento difusible y utiliza todos los azúcares recomendados por el PIS. Crece a un pH de 4.5 (Miyajima *et al.*, 1998, Lindholm *et al.*, 1997).

1.2.2.4 Factores de patogenicidad

Las especies de *Streptomyces* que causan sarna común, incluyendo *S. acidiscabies*, *S. scabies* y *S. turgidiscabies* son diversas en las características fisiológicas, morfológicas, hibridación de ADN-ADN y análisis de ADN ribosomal 16S. Sin embargo, las similitudes en el rango de hospedantes de estas especies y la sintomatología asociada a la enfermedad sugieren un mecanismo común de patogenicidad en plantas (Takeuchi *et al.*, 1996). Las especies patógenas de *Streptomyces* que causan sarna común producen una familia de fitotoxinas llamadas taxtominas, que funcionan como inhibidores de la síntesis de celulosa. También pueden estar presentes en sus genomas los genes *nec1* de bajo contenido en G+C que codifica para una proteína necrogénica (Kers *et al.*, 2005) y *tomA* un homólogo de la tomatinasa, los cuales son compartidos por especies de *Streptomyces* patógenas en plantas (Bignell *et al.*, 2010).

1.2.2.4.1 La taxtomina A: un determinante de virulencia esencial en los *Streptomyces* patógenos de plantas

La taxtomina, forma parte de una familia de fitotoxinas que son metabolitos secundarios y parecen jugar un papel importante en la mayoría de las enfermedades causadas por las especies de *Streptomyces* (Loria *et al.*, 2010). Dados las similitudes de los efectos de estas toxinas en las plantas, de los síntomas producidos por los agentes patógenos que las producen, y la correlación entre la patogenicidad y la producción de toxinas, se considera que estos compuestos están íntimamente implicados en el desarrollo de la enfermedad.

En 1926 se especuló sobre la participación de una fitotoxina en la sarna de la papa, causada por *S. scabies*. Sin embargo, no fue hasta 1989, que a partir de los compuestos fitotóxicos se pudieron reproducir los primeros síntomas de *S. scabies* en los tubérculos de papa inmaduros y fueron aisladas e identificadas las fitotoxinas llamadas taxtominas. Los síntomas en los tubérculos de papa cultivada asépticamente e inoculada con *S. scabies*, no difieren de los producidos por las taxtominas, lo que sugiere que estas fitotoxinas serían responsables de la patogenicidad de esta especie (Loria *et al.*, 1997).

Tanto las especies que causan la enfermedad de la sarna ácida como la común, producen la taxtomina. Este es un dipeptido cíclico (2,5 dicetopiperazinas) derivado de L-fenilalanina y L-triptófano. Contiene una fracción de 4-nitroindol que es esencial para su fitotoxicidad (King y Calhoun, 2009). Se han caracterizado y aislado once miembros de esta familia que se diferencian por la presencia o ausencia de grupos N-metilo y/o hidroxilo (Bignell *et al.*, 2010). La taxtomina A es el miembro de la familia

producido predominantemente por *S. scabies*, *S. turgidiscabies* y *S. acidiscabies* y requerido para el desarrollo de la enfermedad de la sarna común (Healy *et al.*, 2000).

Esta fitotoxina induce una variedad de cambios fenotípicos en la planta huésped incluyendo hipertrofia celular, retraso en el crecimiento de las raíces, necrosis en los tejidos, inhibición de la síntesis de celulosa y alteraciones en el flujo de iones de Ca^{++} y H^+ , en la muerte programada celular y en la producción de antimicrobianos como la fitoalexina y escopoletina en la planta (Duval *et al.*, 2005; Lerat *et al.*, 2009; Scheible *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción de la taxtomina consiste en la inhibición de la biosíntesis de la celulosa y por lo tanto induce la hipertrofia de células vegetales en la expansión de los tejidos (Scheible *et al.*, 2003). Recientemente se ha demostrado que la taxtomina, reduce la celulosa cristalina de la pared celular en la planta, afectando la expresión de genes asociados con la síntesis de la pared celular y se ha observado la disminución de los complejos de celulosa sintasa, en la membrana plasmática de las plántulas de *Arabidopsis* (Bischoff *et al.*, 2009). Además, el análisis de microarrays en células de *Arabidopsis* ha revelado que la taxtomina A provoca un perfil de expresión génica similar al isoxaben, un conocido inhibidor de la síntesis de celulosa (Duval and Beaudoin, 2009). Estos resultados sugieren que el principal modo de acción de esta fitotoxina es el impacto en la biosíntesis de la celulosa (Bignell *et al.*, 2010). Es probable que al poner en peligro la integridad de la pared celular, la taxtomina ayude a facilitar la penetración intracelular de los patógenos (Kers *et al.*, 2005).

Ruta de biosíntesis de la taxtomina A

La síntesis de la molécula base de la taxtomina A (Figura 7B), requiere dos péptido sintetasas no ribosomales (PSNR); TxtA y TxtB, codificadas por los genes *txtA* y *txtB* respectivamente (Bignell *et al.*, 2010). La molécula base surge de la combinación de un triptófano nitrado y una fenilalanina (St-Onge *et al.*, 2008). La reacción de nitración del triptófano es altamente especializada. El trabajo previo de King y Lawrence llevó a la identificación de N-acetil-4-nitrotriptofano en cultivos de *S. scabies* (King and Lawrence, 1995), lo que sugirió que la nitración del grupo indol ocurriría antes de la formación del esqueleto de la taxtomina. Esta idea fue recientemente confirmada mediante la utilización de mutantes knockout de *txtA* y *txtB* en *S. scabies*. Ambos mutantes acumulaban 4-nitro-L-triptofano en el sobrenadante del cultivo. Curiosamente el mutante *txtA* acumulaba N-metil-4-nitro-L-triptofano, mientras que el mutante *txtB* no (Johnson *et al.*, 2009). TxtA y TxtB contienen un dominio de N-metilación lo que les permite N-metilar su sustrato (Healy *et al.*, 2000). Esto indica que TxtB es una PSNR específica para el intermediario 4-nitro-L-triptofano. Este es el primer ejemplo de una PSNR que utiliza un aminoácido nitrado como sustrato. La nitración del L-triptófano requiere una óxido nítrico sintasa bacteriana (NOS/TxtD), la cual produce óxido nítrico (Kers *et al.*, 2004). Además, es probable que esté involucrada en la reacción de nitración sitio específica, la enzima P450 monooxigenasa codificada por

el gen *txtE*. Dado que la producción de 4-nitro-L-triptófano conduce a una mayor producción de taxtomina en cepas salvajes, la producción de óxido nítrico en exceso por la TxtD sería requerida para la síntesis de la taxtomina A (Johnson *et al.*, 2008). Esto sugiere que la nitración específica del L-triptófano puede ser el paso limitante de la biosíntesis de la taxtomina (Johnson *et al.*, 2009). La ruta de la biosíntesis de la taxtomina finaliza con las hidroxilaciones posteriores a la ciclación, que son llevadas a cabo por una P450 monooxigenasa TxtC.

La eliminación del grupo nitro, el movimiento del grupo nitro 4 a las posiciones 5, 6 ó 7 del anillo indol, la sustitución de la cadena lateral fenilo, o la conversión de la conformación D o L resulta en una pérdida completa de la fitotoxicidad de la taxtomina en los tubérculos de papa. Por lo tanto, los grupos 4-nitro-triptófano y fenilalanina vinculados en un ciclo péptido son necesarios para la fitotoxicidad (Loria *et al.*, 1997).

El análisis de la secuencia del cluster de los genes para la síntesis de la taxtomina A (Figura 7A) en *S. acidiscabies*, reveló un pequeño marco de lectura abierta inmediatamente corriente abajo del gen *txtB* (Healy *et al.*, 2002). Este gen denominado *txtH* es conservado en el cluster de biosíntesis de la taxtomina de *S. turgidiscabies* y *S. acidiscabies*, y se cree que codifica para una proteína perteneciente a la superfamilia de las MbtH. Esta super familia se compone de proteínas pequeñas (unos 70 aminoácidos) asociadas con frecuencia a grupos de genes involucrados con la biosíntesis no ribosomal de antibióticos pépticos y sideróforos. Aunque la función de estas proteínas es desconocida, estudios recientes sugieren que son necesarias para la biosíntesis no ribosomal de algunos metabolitos secundarios (Lautru *et al.*, 2007; Wolpert *et al.*, 2007). El análisis transcripcional del gen *txtH* en *S. scabies*, indicó que se expresa bajo condiciones inductoras de taxtomina y que la expresión es dependiente del gen *txtR*, regulador específico de la vía de biosíntesis de la taxtomina A (Joshi *et al.*, 2007b).

Está siendo ampliamente utilizado la detección de los genes de la biosíntesis de la taxtomina como indicador de la patogenicidad en *Streptomyces* (Flores-González *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008; Wanner, 2006).

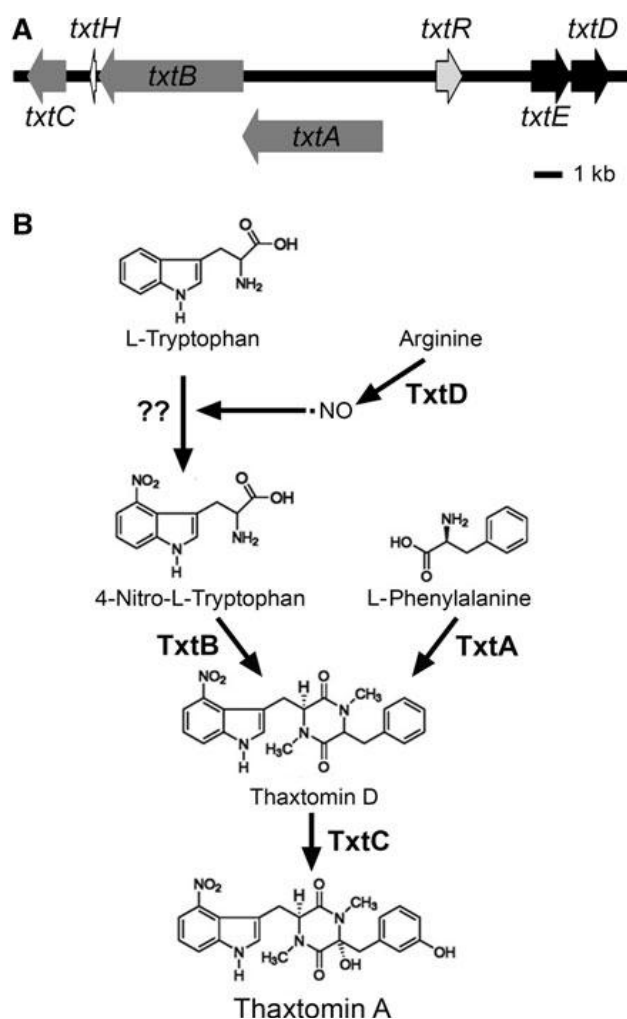


Figura 7: **A** Organización del cluster de genes de biosíntesis de la taxtomina A para *S. scabies*. **B** Vía de la biosíntesis de la taxtomina A en *Streptomyces*. Los pasos que no han sido totalmente elucidados se indican con (??). Extraído de Bignell *et al.*, 2010.

1.2.2.4.2 Nec1: una proteína necrogénica

Nec1 es una pequeña proteína necrogénica. Se especula que es requerida por el patógeno para la colonización de la planta huésped y que actuaría suprimiendo las respuestas de defensa, durante la infección (Bukhalid and Loria, 1997; Joshi *et al.*, 2007a). La expresión del gen *nec1* de *S. scabies* en *S. lividans* no patógeno, es suficiente para conferirle un fenotipo patogénico: colonización y esporulación en el tejido de la planta (Bukhalid *et al.*, 1998). Esto sugiere que la posesión del gen *nec1* puede proporcionar una ventaja física, tal vez permitiendo la utilización de los nutrientes de las células vegetales, que de otra manera no están disponibles para los *Streptomyces* del suelo (Healy *et al.*, 1999). El contenido de G+C (54%) del gen *nec1* es atípico en relación a los porcentajes altos de G+C en regiones codificantes características de las cepas de *Streptomyces*, lo que sugiere que fue adquirido a través de la transferencia horizontal de otro taxón. El gen *nec1* también está estructural y funcionalmente conservado entre especies no relacionadas de *Streptomyces* patógenos y está ausente en no patógenos (Bukhalid *et al.*, 1998, 2002; Kreuze *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2003).

Existe una fuerte correlación entre la producción de taxtomina A y la presencia de *nec1* en las cepas patógenas de *S. scabies*, *S. acidiscabies* y *S. turgidiscabies* (Bukhalid and Loria, 1997; Bukhalid *et al.*, 1998). Sin embargo, la proteína Nec1 no se requiere para la producción de taxtomina A y por lo tanto representa un factor de virulencia independiente (Kers *et al.*, 2005). Se ha demostrado que hay una clara correlación entre la patogenicidad de las especies de *Streptomyces* y la presencia del gen *nec1* detectado mediante PCR convencional o en PCR en tiempo real (Bukhalid *et al.*, 1998, 2002) lo que indica que el gen *nec1* podría usarse como un marcador de patogenicidad en *Streptomyces* spp. (Kreuze *et al.*, 1999).

1.2.2.4.3 Proteína homóloga de la Tomatinasa

La tomatinasa es una enzima bien caracterizada, presente en hongos patógenos de solanáceas. Algunos homólogos de la tomatinasa son proteínas bifuncionales que participan en la desintoxicación de saponinas (antimicrobianos secretados por las plantas). La papa también produce saponinas, lo que podría ser el posible sustrato para la tomatinasa de los *Streptomyces* (Kers *et al.*, 2005). Se ha confirmado que en tres especies de *Streptomyces* patógenos, el gen *tomA* está conservado lo que ha llevado a especular que estaría involucrado en la patogenicidad y virulencia (St-Onge *et al.*, 2008).

La tomatinasa que produce la bacteria *Clavibacter michiganensis* sin embargo, no está involucrada con la virulencia. En ese caso, la tomatinasa disminuye la α -tomatina involucrada con la inhibición del crecimiento de la bacteria patógena. Por otra parte varios productos de hidrólisis de la α -tomatina, se involucran en la supresión de las respuestas de defensa inducida por patógenos en plantas hospederas diferentes. Un rol similar ha sugerido Loria *et al.*, 2006 que produce el homólogo de la tomatinasa en *Streptomyces* spp. (St-Onge *et al.*, 2008).

1.2.2.4.4 Isla de patogenicidad (IPA) compartida por patógenos del género *Streptomyces*

La isla de patogenicidad presente en el género *Streptomyces* ha sido descrita a partir del mapeo físico y la secuenciación de ADN de las regiones que flanquean los genes *nos* y *nec1* en *S. turgidiscabies*. Es la primer IPA que se ha descrito en una bacteria Gram-positiva patógena de plantas. Esta IPA se ha reportado en cepas patógenas de las especies *S. scabies*, *S. turgidiscabies* y *S. acidiscabies*, tiene un tamaño de al menos 325kb y se encuentra en un elemento de ADN de aproximadamente 660kb. Contiene varios genes asociados a la virulencia, incluyendo los genes de biosíntesis de la taxtomina A (*txtAB*, *txtC* y *nos*), el gen que codifica para la proteína necrogénica (*nec1*), genes de la biosíntesis de una citoquinina codificados por el operón *fas* (operón homólogo y colinear a un operón del fitopatógeno *Rhodococcus fascians*), y el gen que codifica para un homólogo de la tomatinasa (*tomA*). La IPA de *S. turgidiscabies* contiene elementos genéticos móviles, pseudogenes y genes con contenido G+C variado, lo que indicaría la incorporación de ADN de otros taxones. La presencia del operón *fas* en la IPA del patógeno emergente *S. turgidiscabies* y su ausencia en cepas de *S. scabies* y *S. acidiscabies* sugiere que este operón ha sido adquirido de forma independiente tras la adquisición de la isla de patogenicidad por *S. turgidiscabies*. En la figura 8 se muestra la localización de los distintos genes en la isla de patogenicidad para *S. turgidiscabies* (Kers *et al.*, 2005).

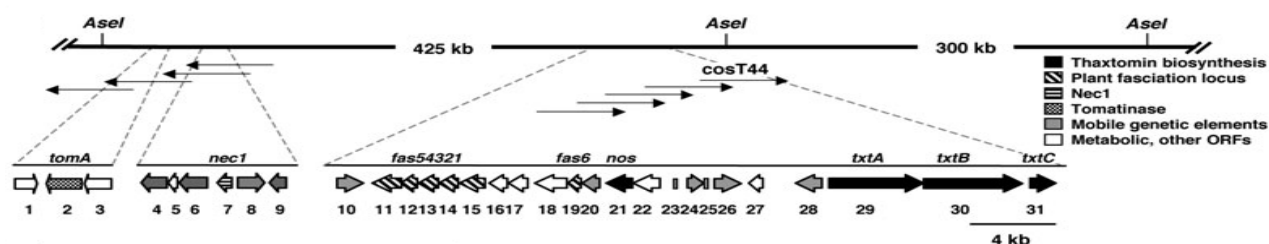


Figura 8: Organización genética del loci de virulencia en *S. turgidiscabies*. Extraído de Bignell *et al.*, 2010.

Durante los últimos 75 años dos especies adicionales, *Streptomyces acidiscabies* (Lambert and Loria, 1989a) y *Streptomyces turgidiscabies* (Miyajima *et al.*, 1998) han emergido como agentes patógenos de forma independiente en los Estados Unidos y Japón, respectivamente. Se piensa que esta isla de patogenicidad es la responsable de la aparición de nuevas especies de *Streptomyces* patógenas en plantas, en los sistemas agrícolas. Trabajos anteriores han demostrado que la capacidad de producir taxtomina A, es compartida por especies de *Streptomyces* patógenas en plantas, al igual que la proteína Nec1. El análisis genético de cepas de *S. scabies*, *S. acidiscabies* y *S. turgidiscabies* sugiere fuertemente que la transferencia genética horizontal (TGH) de *S. scabies* a las especies saprófitas en los sistemas agrícolas, es la base para el surgimiento de *S. acidiscabies* y *S. turgidiscabies* patógenos (Healy *et al.*, 1999; Bukhalid *et al.*, 2002). La distribución de una secuencia de inserción *IS1629* asociada a la isla de patogenicidad, en cepas de *S. scabies*, *S. acidiscabies* y *S. turgidiscabies*, es coherente con la movilización de la IPA desde los primeros patógenos conocidos, a los patógenos de reciente creación (Healy *et al.*, 1999). Esto ha sido indicativo de que, los genes de la biosíntesis de la

taxtomina A y *nec1* se encuentran en una IPA móvil. Según ensayos hay cepas que contienen la IPA y no producen patogenicidad. La funcionalidad de la IPA depende de los antecedentes genéticos de la cepa receptora. Sin embargo, no se pueden descartar pequeñas deleciones, reordenamientos o transferencia incompleta de las IPAs en algunas o en todas las transconjugaciones.

La transferencia horizontal de genes ha jugado un papel importante en la evolución bacteriana, lo que permite la rápida adquisición de nuevas características que mejoran la aptitud física en nichos específicos del medio ambiente, incluidas las asociaciones de patógenos con huéspedes eucariotas (Kers *et al.*, 2005). La transferencia horizontal de esta isla de patogenicidad entre bacterias del género *Streptomyces* sugiere la posibilidad de la continua aparición de nuevas especies patógenas, sobre todo en un género tan amplio y ubicuo del suelo (Wanner, 2009). El hecho de que la patogenicidad es un fenotipo muy raro entre *Streptomyces* sugiere que, o bien la movilización de la IPA es un evento poco frecuente en la naturaleza o la adquisición del IPA confiere un fenotipo de patogenicidad en sólo una pequeña proporción de los beneficiarios (Kers *et al.*, 2005).

1.2.2.4.5 Nuevos determinantes de virulencia

La reciente disponibilidad de la secuencia del genoma de *S. scabies* 87-22 (Accession Number NC_013929), ha proporcionado una nueva comprensión de los factores genéticos que permiten a este patógeno colonizar e infectar agresivamente la planta hospedera. Análisis genómicos comparativos han revelado una abundancia de genes en *S. scabies*, que se conservan en otros patógenos microbianos secuenciados y/o han sido previamente asociados con las interacciones microbio-planta o con la virulencia en otras plantas o patógenos animales. Algunos factores de virulencia identificados en el genoma de *S. scabies* son: componentes de la fitotoxina coronatina (COR), concanamicina, cutinasa, expansinas, fitohormonas entre otros. Esto sugiere que la patogenicidad de *Streptomyces* puede tener múltiples determinantes genéticos además de la conocida taxtomina A, los factores de virulencia Nec1 y el homólogo de la tomatinasa. Además, actualmente la disponibilidad de múltiples secuencias de los genomas de *Streptomyces* patógenos y no patógenos proporciona una oportunidad para realizar análisis comparativos para identificar el patogenoma de *Streptomyces*. Estos análisis genómicos contribuirán a comprender los mecanismos fundamentales, la evolución de la patogenicidad en planta y la biología planta-microorganismo dentro de este género (Bignell *et al.*, 2010).

1.2.2.5 Persistencia en suelo y formas de transmisión

La microflora normal de prácticamente todos los suelos, incluye especies de *Streptomyces* que pueden producir sarna. Los patógenos de sarna común se pueden introducir en el suelo por medio de tubérculos infectados y durante las prácticas agrícolas. El suelo contaminado, puede propagarse por el

viento y la lluvia. Estos organismos sobreviven al paso por el tracto digestivo de los animales por lo que pueden ser diseminados por el estiércol de los mismos.

La densidad del inóculo inicial en los suelos puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Las esporas de las especies de *Streptomyces* pueden sobrevivir en terrenos secos por largos períodos de tiempo, no se distribuyen uniformemente en el suelo y se producen en racimos pequeños y localizados.

Ha sido documentado que las esporas de *S. scabies* pueden permanecer viables en el suelo por una década a un máximo de veinte años, sin que haya habido cultivo de papa en el campo durante ese tiempo. Este patógeno tiende a predominar en suelos secos, neutros a alcalinos (Agrios, 2005). Por otra parte *S. acidiscabies* se encuentra en suelos de pH ácido, pero su habilidad para persistir en el suelo es muy pobre y usualmente es transmitido por tubérculos semilla infectados (Lambert and Loria, 1989a). Aunque la contribución a los síntomas de sarna del inóculo en la semilla es insignificante, esta fuente puede ser relevante para la dispersión de nuevas cepas de *Streptomyces* patógenos o especies a nuevas áreas (Cullen and Lees, 2006).

1.2.3 Desarrollo de la enfermedad

La infección exitosa en la planta hospedera es un proceso complejo con varios pasos, requiriéndose que el patógeno registre la presencia del hospedero adecuado para colonizar el tejido vegetal y para sobrevivir a la presencia de sus mecanismos de defensa. La patogenicidad en planta ha evolucionado independientemente en cientos de microorganismos. Entre los miembros de *Streptomyces* la capacidad de infectar es poco común, si bien son conocidos por su estilo de vida saprofita, su complejo desarrollado ciclo de vida y su producción de metabolitos secundarios (Bignell *et al.*, 2010).

Ciclo de la enfermedad de sarna común para *S. scabies*

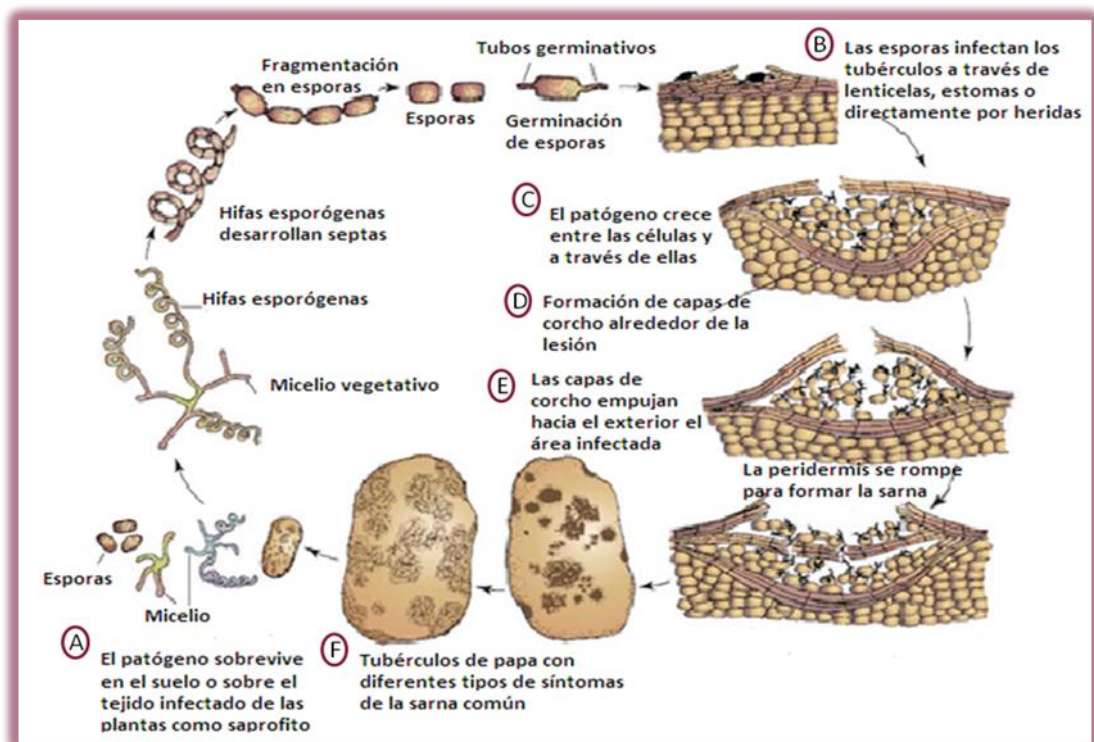


Figura 9: Ciclo de la enfermedad de sarna común causada por *S. scabies*. Extraído de Agrios, 2005.

A) *S. scabies* invade los tejidos de los tubérculos a nivel de campo. El suelo es la principal fuente de inóculo (Cancino, 2003), este puede ser infectado a través de papas semilla contaminadas (Lehtonen *et al.*, 2004), tierra adherida a herramientas o por el transporte por el viento y el agua. *S. scabies* sobrevive durante un tiempo indefinido en el suelo en su forma miceloide vegetativa o como esporas (Agrios, 2005).

B) La invasión del patógeno en los tejidos se produce a través de lenticelas, heridas, estomas y, en los tubérculos jóvenes directamente ya que penetra a través de las aberturas naturales por las que se realiza intercambio gaseoso de la epidermis. Las lenticelas se hacen susceptibles sólo tras la ruptura de las células estomáticas. El desarrollo de la enfermedad continúa durante 6 a 8 semanas período en el

cual el tubérculo se encuentra en crecimiento (Agrios, 2005; Loria *et al.*, 1997).

C) Las bacterias crecen sobre todo en los espacios intercelulares de las células del parénquima (Agrios, 2005), solo en las regiones de la periferia de las lesiones puede encontrarse micelio intracelular, pudiendo esporular en abundancia dentro de las células (Cancino, 2003). Estas capas de células mueren y el patógeno vive a partir de ellas (Loria *et al.*, 1997).

D) Al tomar contacto el patógeno secreta una fitotoxina, que estimula a las células vivas que rodean la lesión, a dividirse con rapidez y producir varias capas de células corchosas que la aíslan. Estas capas no solo inhiben el avance que pueda intentar el patógeno sobre las otras células, sino que también bloquean la difusión de cualquier sustancia que el patógeno pueda secretar. Además, estas capas detienen el flujo de agua y nutrientes desde las zonas sanas hasta la zona infectada y suprimen la nutrición del patógeno (Cancino, 2003).

E) El sector afectado es empujado sobre la superficie del tubérculo, resquebrajándose y diseminando la bacteria hacia células vecinas. Las lesiones pueden aparecer como pequeñas protuberancias con una depresión central cubierta por tejido corchoso, que a veces abarcan toda la superficie del tubérculo. La profundidad de la lesión depende de la variedad del huésped, de las condiciones del suelo, y de la invasión de la lesión por otros organismos, incluyendo insectos. Estos últimos parecen romper las capas de corcho y permitir que el patógeno invada el tubérculo a mayor profundidad. Las lesiones de sarna a menudo sirven como puntos de entrada, para organismos parásitos secundarios o saprofitos que hacen que los tejidos se pudran (Agrios, 2005).

F) Inicialmente las lesiones aparecen como pequeñas (5-8 mm). A medida que el agente patógeno sigue colonizando el tubérculo, el huésped desarrolla heridas en la peridermis dando lugar a lesiones ligeramente elevadas, compuestas por tejido áspero, corchoso. Estas manchas pueden unirse para formar lesiones de forma irregular, que suelen ser tanto de color marrón y de textura áspera (Gouws, 2006). Los parches pueden convertirse en grietas cuando la infección progresa y adquieren una apariencia de estrella. La enfermedad también puede extenderse al tubérculo resultando en sarna superficial (Ndowora *et al.*, 1996). La peridermis del tubérculo se mantiene intacta en lesiones superficiales. En lesiones más profundas, la peridermis del tubérculo se rompe y se forman hasta tres capas de "corcho" (Gouws, 2006).

2 OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

2.1 Objetivo General

Determinar la identidad de las cepas causantes de la sarna común en la papa, con síntomas severos en Uruguay.

2.2 Objetivos específicos

- Aislar cepas de *Streptomyces* de tubérculos con síntomas severos de sarna.
- Identificar las cepas obtenidas por métodos convencionales y moleculares.
- Caracterizar las cepas a partir de la determinación de factores de patogenicidad.
- Construir un banco de cepas del género *Streptomyces*.

2.3 Estrategia del presente trabajo

Se trabajó con tubérculos de papa de la variedad Chieftain, progenie resultante del cultivo de semillas importadas de distintos orígenes. A partir de las lesiones de sarna común observadas en las muestras, se realizaron aislamientos utilizando distintos métodos. Una vez obtenidos cultivos puros, se procedió a su identificación por observación morfológica de la colonia y observación microscópica así como el ensayo de producción de melanina. A partir de los cultivos puros, se llevó a cabo la extracción de ADN con el objetivo de realizar la identificación molecular de las cepas. Como un primer screening se utilizaron cebadores universales para bacterias dirigidos al gen ARNr 16S. Aquellas cepas que no pudieron ser identificadas a nivel de especie de esta forma, se analizaron con cebadores específicos dirigidos hacia las especies que comúnmente afectan al cultivo de papa: *S. scabies*, *S. turgidiscabies* y *S. acidiscabies*. Las cepas que aún así no lograron identificarse, se analizaron por medio del secuenciado del gen *rpoB*. Se realizó el análisis de las secuencias comparándolas con las depositadas en la base de datos GenBank (NCBI). Por otra parte, a cada cepa se le realizó la caracterización molecular de los factores de patogenicidad mas importantes. Para ello, se amplificaron por PCR los genes marcadores: *txtAB*, *nec1* y *tomA*. Paralelamente, se realizaron ensayos de patogenicidad en discos de papa.

La colección de cepas resultantes de los aislamientos de *Streptomyces* spp. se mantiene en glicerol al 20% a -70°C en Facultad de Química.

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Muestras

Las muestras utilizadas en este estudio fueron, tubérculos con síntomas de sarna común aportados por los productores. En la tabla 2 se identifican las muestras según origen y tipo de síntomas de sarna.

Tabla 2: Características de las muestras.

<i>Códigos</i>	<i>Origen de la papa semilla</i>	<i>Departamento</i>	<i>Tipo de síntomas de sarna común observados</i>
1	Canadá	-*	Reticulada
2	Canadá	San José	Profunda
3	Canadá	San José	Profunda
4	Canadá	San José	Profunda
5	Estados Unidos	San José	Reticulada
6	Canadá	San José	Profunda
536	Canadá	San José	Profunda
1613	Canadá	San José	Profunda
1617	Canadá	Canelones	Profunda
4801	Canadá	Rocha	Profunda

* Muestra de papa semilla importada.

3.1.2 Cepas aportadas por la Facultad de Agronomía

- Fueron incluidas en este estudio cepas de *Streptomyces* aportadas por la Facultad de Agronomía, aisladas a partir de tubérculos con síntomas otorgados por productores.

Tabla 3: Características de las muestras y sus aislamientos respectivos.

Código	Origen de la papa semilla	Departamento	Tipo de síntoma de sarna común observados	Cepas aisladas
1	Canadá	San José	Profunda	1A, A2, 1B1, 1B3
2	Canadá	San José	Profunda	2A22, 2B1, 2B2, 2B3
3	Canadá	Canelones	Profunda	3A1, 3A2, 3B1
4	Canadá	Canelones	Profunda	4A1, 4A2, 4B1, 4B2

- Cepas aisladas a partir de la progenie con síntomas, obtenida en ensayos realizados por la Facultad de Agronomía.

Tabla 4: Característica de los ensayos y resultados de los mismos.

Código de ensayo	Condiciones del ensayo				Resultados del ensayo	
	Suelo			Papa semilla ³	Progenie con síntomas	Cepas aisladas
	pH	Humedad	Origen	Origen		
B ¹	4.86	Alta	San José ¹	Canadiense ³	Reticulada	Ba5
D ²	6.39	Baja	San José ²	Canadiense ³	Reticulada	Db31, Db321, Db322, Db341, Db342

¹ Suelo con antecedentes de Sarna; ² Suelo sin antecedentes de sarna; ³ Papa semilla sana.

3.1.3 Cebadores

Cebadores utilizados para la amplificación de genes por PCR convencional (Wanner, 2006; Kim *et al.*, 2004).

Tabla 5: Pares de cebadores y condiciones utilizadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección de genes de la isla de patogenicidad (IPA), marcadores filogenéticos y cebadores especie-específicos para el gen 16S ARNr .

<i>Gen</i>	<i>Par de cebadores</i>	<i>Temperatura de Hibridación (°C)</i>	<i>Concentración de MgCl₂ (mM)</i>	<i>Tamaño del producto (pb)</i>
Cebadores universales para bacteria	16s1F: 5'-CATTACGAGAGTTTGATCC-3' 16s 455-435: 5'-ACTTTCGCTTCTCCCTGCT-3'	55	1.5	458
	16s1R: 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' 16s1F (ver arriba)	55	1.5	1531
<i>rpoB</i>	SRPOF1: 5'-TCGACCACTTCGGCAACCGC-3' SRPOR1: 5'-TCGATCGGGCACATGCGGCC-3'	56	1.5	352
Cebadores especie-específicos dirigidos al gen de ARNr 16S				
<i>S. acidiscabies</i>	Ac1: 5'-TCACTCCTGCCTGCATGGGCG-3' Ac2: 5'-CGACAGCTCCCTCCCACAAG-3'	60	1,5	1278
<i>S. scabies</i> y <i>S. europaeiscabiei</i>	scab1m: 5'-CGACACTCTCGGGCATCCGA-3' scab2m: 5'-TTCGACAGCTCCCTCCCTTAC-3'	60	1,0	1278
<i>S. turgidiscabies</i>	Turg1m: 5'-CCCTCGCATGGGGGTGGGTTC-3' Turg2m: 5'-CGACAGCTCCCTCCCCGTGAG-3'	60	1,5	1273
Marcadores de patogenicidad				
<i>nec1</i>	Nf: 5'-ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGA-3' Nr: 5'-GCAGGTCGTCACGAAGGATCG-3'	60	2,0	700
<i>txtA</i>	TxtA1: 5'-CACGTACGCGCAGTTCAATG-3' TxtA2: 5'-AGATGATGTAGGCGGGACTC-3'	48	1,0	398
<i>txtAB</i>	TxtAB1: 5'-CCACCAGGACCTGCTCTTC-3' TxtAB2: 5'-TCGAGTGGACCTCACAGATG-3'	48	1,0	385
<i>tomA</i>	Tom3: 5'-GAGGCGTTGGTGGAGTTCTA-3' Tom4: 5'-TTGGGGTTGTACTCCTCGTC-3'	55	1,5	392

3.2 Métodos

3.2.1 Procesamiento de las muestras y obtención de aislamientos

Para la obtención de los aislamientos de *Streptomyces* spp., se procesaron las muestras (tubérculos con síntomas de sarna común) evaluando y comparando entre sí, los siguientes métodos de aislamiento:

- Siembra directa del micelio. El micelio y/o esporulación presentes en la lesión, se sembraron directamente en el medio selectivo NPPC agar (Nistatina, Polimixina, Penicilina, Cicloheximida) (Loria *et al.*, 2010).
- Macerado de lesión. El tubérculo con síntomas se lavó y se desinfectó superficialmente, en hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto y luego se enjuagó con agua destilada estéril. Se extrajo el tejido por debajo de la lesión (generalmente de color amarillo trigo) y se maceró con 5 ml de agua destilada estéril. Se mezcló 1 ml del macerado con 9 ml de una solución de fenol agua (1:140). Posteriormente se sembraron 100 µl de ésta mezcla y de su dilución 1/10, en 3 placas de Petri con el medio selectivo NPPC agar. Se evaluó además, la acción de la mezcla fenol-agua sobre los contaminantes, dejándola actuar durante 10 minutos antes del sembrado (Lindholm *et al.*, 1997).
- Inmersión en agua caliente. El tubérculo con síntomas se lavó y se desinfectó superficialmente de igual forma que el método anterior. Se extrajeron 4 trozos de lesiones y se colocaron en un tubo con 1 ml de agua destilada estéril a 60°C por 30 minutos. Dos de los trozos se sembraron directamente en el medio selectivo NPPC agar, los restantes se maceraron en 1 ml de agua destilada estéril y se sembraron por estriado en el mismo medio (Loria *et al.*, 2010).

Las placas de Petri con el medio NPPC agar se incubaron a 28-29°C por 10 a 12 días, para la observación del crecimiento de colonias con características similares al género *Streptomyces*. Las colonias sospechosas se repicaron posteriormente en el medio Yeast malt extract; Extracto de malta y levadura (YME) para su purificación y observación morfológica. Se incubaron a 28-29°C por 5 a 7 días (Loria *et al.*, 2010).

3.2.2 Conservación de las cepas

Las cepas puras se cultivaron en medio líquido YME, se les agregó glicerol 60% estéril hasta llegar a una concentración final del 20%, se homogeneizaron y se guardaron en freezer a -70°C (Wanner, 2006).

3.2.3 Características morfológicas

Se realizó la visualización del color del reverso de la colonia y color de la masa de esporas en medio YME, luego de una incubación de 14 días a 28-29°C (Park *et al.*, 2003).

Para la visualización microscópica se les realizó a cada aislamiento:

- La técnica de Gram (Madigan *et al.*, 1998) para observar la forma y disposición de las bacterias a 100x.
- Preparado en fresco, para la observación de las cadenas de esporas a 100x (Loria *et al.*, 2010).
- Cultivo en lámina para visualizar las cadenas de esporas a 40x. Para este método se cubrió un porta previamente esterilizado con medio agar agua, se dejó secar y se inoculó la cepa. Se incubó a 30°C por 7 días, dentro de una placa de Petri estéril (Figura 10).



Figura 10: Fotografía del cultivo en lámina de la cepa Db322.

3.2.4 Producción de melanina

Para la observación de la producción de melanina, pigmento color marrón oscuro, se sembraron todas las cepas por duplicado en tubos inclinados de agar tirosina. Se incubaron por 4 días a 28-29°C en oscuridad (Gouws, 2006).

3.2.5 Ensayo de patogenicidad en discos de papa

Se desinfectaron tubérculos sanos con una solución de hipoclorito de sodio al 1% y se enjuagaron con agua estéril. Bajo cámara de flujo laminar se cortaron en forma aséptica, en rodajas de aproximadamente un centímetro de espesor y se colocaron en placas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril. Los discos de papa se inocularon en su superficie, con colonias de cada aislamiento en estudio, en dos repeticiones. Luego, se incubaron a 28-29°C por tres días en la oscuridad. El mismo procedimiento se realizó con el testigo negativo, inoculando los discos de papa con agua estéril (Faucher *et al.*, 1992; Park *et al.*, 2003).

3.2.6 Técnicas Moleculares

3.2.6.1 Extracción de ADN

- Extracción de ADN clásica. A partir de una colonia aislada y pura en placa con YME, se inocularon caldos YME que se incubaron a 28°C por 3 días en agitación a 150rpm . Una vez crecidos los caldos se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos, descartándose el sobrenadante. El pellet obtenido se colocó a -20°C por 15-60 minutos. Luego, se resuspendió en 0,5 ml de buffer TE25S pH 8,0 y se agregaron 10µl de lisozima 100mg/ml en TE25S. Se incubó a 37°C durante 60 minutos.

Posteriormente, se agregaron 5µl de proteinasa K 100mg/ ml en TE25S fresca y 30µl de SDS 10%. Se mezcló suavemente por inversión y se incubó a 55°C por 60 minutos. Luego de la incubación, se agregaron 100µl de NaCl 5M y 65µl de CTAB/NaCl 0,7M. Se homogenizó y se incubó 10 minutos a 55°C.

Se enfrió a 37°C por unos minutos y se añadieron 500µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó por 30 minutos. Luego, se centrifugó durante 15 minutos a 10000rpm. Se transfirió la fase superior a un eppendorf nuevo y se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol frío para precipitar el ADN, se mezcló y se dejó precipitando a -20°C durante la noche. Se centrifugó a 12000rpm a 4°C por 10 minutos y se retiró el sobrenadante cuidadosamente. Luego, se lavó el pellet con etanol 70% frío y se centrifugó nuevamente.

Finalmente, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el ADN hasta comprobarse la desaparición de etanol en estufa a 37°C. El ADN se resuspendió en 30µl de agua miliQ. Se realizaron dos extracciones de ADN independientes de cada muestra. Se observó la calidad del ADN por electroforesis en gel de agarosa 0,8%, se utilizó como tinción bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se reveló con luz UV.

- Extracción de ADN mediante el uso del kit comercial Vivo Genomic DNA Purification Kits (ViVo Science). Se siguieron las instrucciones del proveedor.

3.2.6.2 Concentración de Ácidos Nucleídos por precipitación con etanol (EtOH)

Se llevó el volumen de la muestra a un volumen final de 200 µl. Se agregaron 20µl de NaAc 3M pH 5.2 y se llevó a 200 µl con agua miliQ. Luego se agregaron lentamente dos volúmenes (400 µl) de EtOH absoluto frío y se mezcló por inversión. Esta mezcla se incubó a -20°C por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 0°C por 20min a 12000rpm. Se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 900 µl de EtOH 70% a 0°C. Se centrifugó nuevamente y se retiró el sobrenadante, se dejó secando hasta que se

comprobó la desaparición del EtOH. Se resuspendió el precipitado en 20 µl de agua miliQ y se incubó a 65°C aproximadamente 30 min.

3.2.6.3 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para visualizar el ADN genómico y los productos de amplificación se realizó electroforesis en gel de agarosa. Los geles utilizados tenían un porcentaje de agarosa de 0.8% o 1.5% según los tamaños de los fragmentos a ser separados, estos geles se realizaron con buffer TBE 0.5x y se les agregó bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Las muestras se mezclaron con buffer 6x de carga para facilitar su posterior sembrado. La corrida se realizó en buffer TBE 0.5x utilizando un voltaje de 100V durante 20-30 minutos.

El ADN se visualizó mediante la exposición del gel en luz ultravioleta. Se utilizó como referencia un marcador de peso molecular comercial (*Smart ladder*, *Eurogentec*) el cual se muestra a continuación.

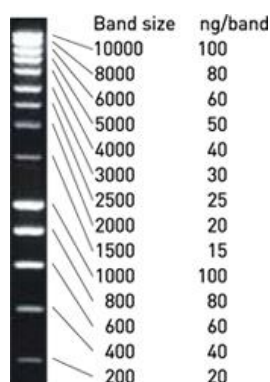


Figura 11: Marcador de peso molecular *Smart Ladder*, *Eurogentec* MW.1700-10.

3.2.6.4 Semicuantificación de ADN

Se realizó la semicuantificación de ADN en ng, a partir de la comparación de las bandas de las muestras de ADN y del marcador de peso molecular estándar (*Smart ladder*, *Eurogentec*) en electroforesis en gel de agarosa.

3.2.6.5 Amplificación mediante PCR convencional

La amplificación mediante PCR convencional se llevó a cabo en un volumen final de mezcla de reacción de 25µl, conteniendo 2.5µl de Buffer 10x, 1.0 a 2.0µl de MgCl₂ 25mM, 1µl de dNTP 5.0mM,

2.5µl de cada cebador 5µM (Tabla 5), 0.2µl de Taq polimerasa 5,0 U/µl (*Promega*), 1µl de la muestra de ADN y agua miliQ estéril hasta completar el volumen.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador de gradiente (*Corbett* CG1-96), se programó un primer paso de desnaturalización a 95°C por 3 minutos, y después por 40 ciclos se realizó desnaturalización a 95°C por 20s, hibridación por 30s con la temperatura según el par de cebadores utilizados (Tabla 5) y extensión a 72°C por 2 minutos. Por último se realizó una reacción de extensión a 72°C por 5 minutos y se mantuvo a 30°C por 3 minutos (Wanner, 2006). Para la amplificación del gen *rpoB*, la mezcla de reacción fue sometida a un primer paso de 2min a 95°C y a 30 ciclos de amplificación (30s a 95°C, 30s a 56°C y 45s a 72°C) seguidos de 5 min de extensión a 72 °C (Kim *et al.*, 2004).

Se verificó el tamaño del producto de la reacción por electroforesis en gel de agarosa 1,5% en buffer TBE 0.5x con tinción de bromuro de etidio, utilizando un marcador de peso molecular comercial (*Smart Ladder*, *Eurogenetc*).

3.2.6.6 Secuenciado y análisis de secuencia

Algunos de los productos de amplificación fueron parcialmente secuenciados (Sanger *et al.*, 1977) (Servicio de secuenciación Macrogen, Corea). Las secuencias se corrigieron manualmente y se analizó la similitud de cada secuencia con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank (NCBI) mediante el algoritmo BLASTn.

4 RESULTADOS

4.1 Aislamiento de cepas de *Streptomyces* a partir de tubérculos con síntomas severos de sarna común

Se obtuvieron 21 aislamientos con características similares al género *Streptomyces*, a partir del procesamiento de 10 muestras de tubérculos con síntomas severos de sarna común.

Tabla 6: Códigos de las muestras y sus respectivos aislamientos.

<i>Código</i>	<i>Aislamientos de la misma muestra</i>
1	1 ₁ , 1 ₂
2	2
3	3 ₁ , 3 _{H1} , 3 _{H2}
4	4 _{H1} , 4 _{H2}
5	5 ₃ , 5 ₅ , 5 _{H1}
6	6 ₁ , 6 ₂ , 6 ₃
536	536, 536 ₃ , 536 _H
1613	1613 _M
1617	1617 _H , 1617 _{HM}
4801	4801 _F

Todas las muestras fueron procesadas por los distintos métodos descritos en el ítem 3.2.1 de materiales y métodos, obteniéndose por cada uno el número de aislamientos según se muestra en la tabla 7.

Tabla 7: Métodos de procesamiento y cantidad de aislamientos obtenidos.

<i>Métodos de procesamiento</i>	<i>Número de aislamientos</i>
Micelio	1
Fenol-agua	12
Fenol-agua y 10 min.	0
Agua caliente	7
Agua caliente y macerado	1

4.2 Identificación de las cepas por métodos moleculares

Se extrajo ADN por duplicado de 42 cepas, incluyendo las aportadas por la Facultad de Agronomía. Se muestran algunas extracciones de ADN utilizando el kit comercial (Figura 13) y por medio de la extracción convencional (Figura 12).

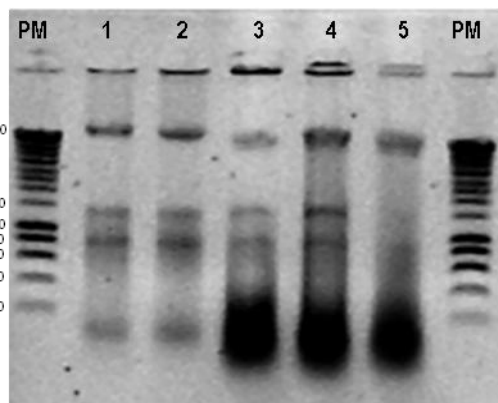


Figura 12: Extracción de ADN genómico a partir de cultivos puros. Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Carril 1-5: muestras 6₂, 4_{H1}, 1613_M, 1613_{HM}, 4810. Carriles PM: marcador de peso molecular (*Smart Ladder*, *Eurogenetec*); la flecha indica la banda que corresponde al ADN genómico.

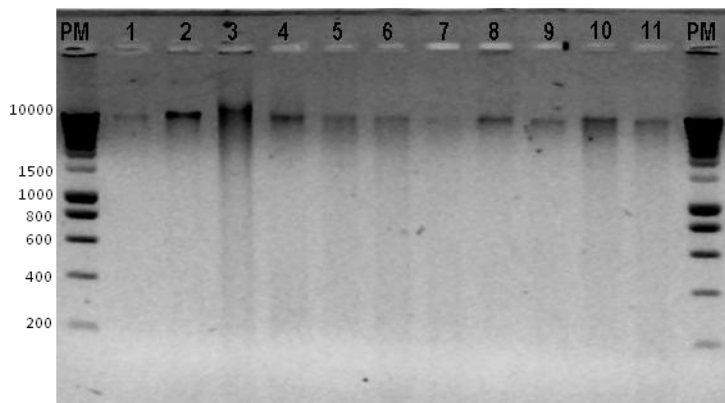


Figura 13: Extracción de ADN genómico a partir de cultivos puros utilizando el Kit de *ViVo Science*. Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Carril 1-11: muestras 1617_H, 3₁, 6₂, 536_H, 4H1, 5₃, 4_{H2}, 5_{H1}, 3_{H2}, 6₃, 536₃. Carriles PM: marcador de peso molecular (*Smart Ladder*, *Eurogenetec*); la flecha indica la banda que corresponde al ADN genómico.

4.2.2 Amplificación por PCR con cebadores dirigidos hacia el gen del ARNr 16S para el Dominio Bacteria

Para todos los ADNs extraídos, se realizó la reacción de PCR utilizando pares de cebadores universales para el Dominio Bacteria dirigidos al ARNr 16S (16s1F-16s455-435 y 16s1R-16s1F). Para todas las cepas se obtuvieron los productos de amplificación del tamaño esperado. En la siguiente figura se muestran algunos resultados de la PCR.

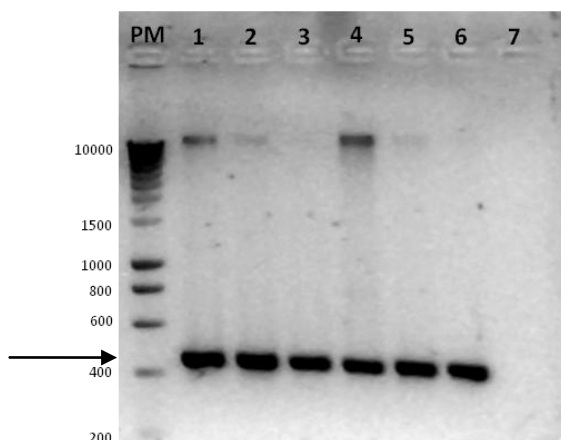


Figura 14: Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S con los cebadores 16s1F-16s 455-435. Fotografía de un gel de agarosa al 1,5%. Carril PM: marcador de peso molecular (*Smart Ladder*, *Eurogenetec*); Carriles 1-6: 1₁, 1₁/10, 1₁/100, 1₂, 1₂/10, 1₂/100, carril 7: control negativo. La flecha indica las bandas de los productos de amplificación del tamaño esperado aproximadamente 498pb.

Se seleccionaron algunos productos de amplificación del gen ARNr 16S y se enviaron a secuenciar. Las secuencias parciales de estos genes, se compararon con las secuencias de la base de datos Genbank, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: Cebadores universales utilizados para la amplificación de las secuencias del gen ARNr 16S y datos obtenidos a partir de la comparación de las secuencias con las de la base de datos NCBI (GenBank) usando BLASTn.

Código	Par de cebadores	Largo de secuencia obtenida	pb/pb	Homología	Similar a
1 ₁	16s1F 16s455-435	363pb	363/363	100%	<i>Streptomyces</i> spp. HQ992713.1
1 ₂	16s1F 16s455-435	354pb	354/354	100%	<i>Streptomyces</i> spp. HQ992713.1
6 ₁	16s1F 16s455-435	346pb	346/346	100%	<i>S. acidiscabies</i> FJ007427.1
5 ₅	16s1F 16s455-435	325pb	325/325	100%	<i>S. flaveolus</i> EF654098.1
5 ₃	16s1F-16s1R	357pb	357/357	100%	<i>Streptomyces</i> spp. HQ292264.1

4.2.3 Amplificación por PCR con cebadores especie-específicos dirigidos hacia el gen del ARNr 16S

Para todas las cepas aisladas se realizaron las reacciones de PCR con los cebadores dirigidos hacia las especies que comúnmente causan sarna común: *S. scabies*, *S. turgidiscabies* y *S. acidiscabies*. No se obtuvo ningún amplicón con los cebadores dirigidos para *S. scabies* y *S. turgidiscabies*.

De las 42 cepas analizadas por PCR convencional utilizando los cebadores especie-específicos para *S. acidiscabies*, en 26 cepas se obtuvieron un amplicón del tamaño esperado (1278pb) (Figura15).

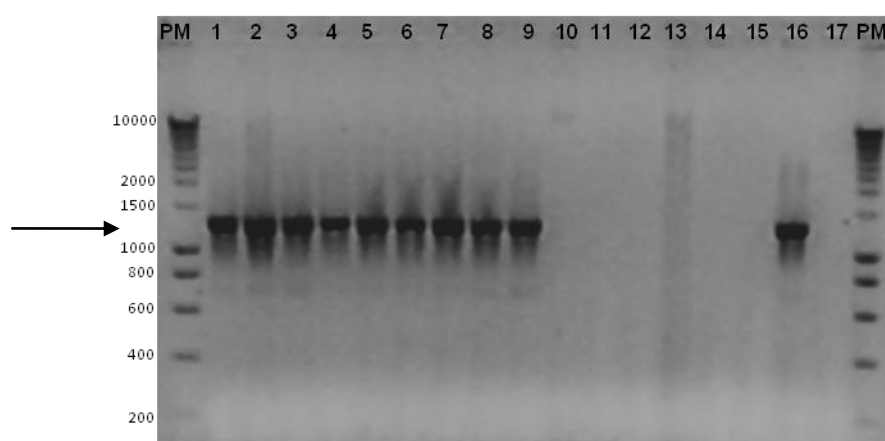


Figura 15: Amplificación por PCR con los cebadores (Aci1-Aci2) especie-específicos para *S. acidiscabies*. Fotografía de un gel de agarosa al 1,5%. Carril PM: marcador de peso molecular (*Smart Ladder*, Eurogenetec); Carriles 1-15: 1A, 1A2, 1B1, 2A22, 2B1, 2B2, 3A1, 3B1, 4A22, 2/ 10, 2/100, 5_{H1}, 5_{H1}/10, 5_{H1}/100 carril 16: control positivo y carril 17: control negativo. La flecha indica: bandas que corresponden a los amplicones del tamaño esperado aproximadamente 1278pb.

Se enviaron a secuenciar 11 productos de PCR. Las secuencias se compararon con las de la base de datos GenBank mediante el algoritmo Blastn. Todas las secuencias de las cepas fueron ingresadas al banco de datos y se encuentran registradas por los números de acceso GenBank que se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias del gen del ARNr 16S, datos obtenidos a partir de la comparación de las secuencias con las de la base de datos NCBI (GenBank) usando BLASTn y número asignado para cada secuencia por GenBank.

Código	Número de acceso GenBank	Par de cebadores	Largo de secuencia obtenida	pb/pb	Homología	Similar a
1 ₁	JN206666	Aci1- Aci2	467pb	467/467	100%	<i>S. acidiscabies</i> FJ547387.1
3 ₁	JN206667	Aci1- Aci2	676pb	619/619	100%	<i>S. acidiscabies</i> FJ546739.1
6 ₁	JN206668	Aci1- Aci2	295pb	295/295	100%	<i>S. acidiscabies</i> FJ007427.1
6 ₂	JN206669	Aci1- Aci2	672pb	672/672	100%	<i>S. acidiscabies</i> FJ546739.1
6 ₃	JN206672	Aci1- Aci2	675pb	675/675	100%	<i>S. acidiscabies</i> FJ546739.1
1A	JN206670	Aci1- Aci2	668pb	668/668	100%	<i>S. acidiscabies</i> FJ546739.1
1B1	JN206673	Aci1- Aci2	906pb	906/906	100%	<i>S. acidiscabies</i> AB301487.1
2B1	JN206674	Aci1- Aci2	695pb	695/695	100%	<i>S. acidiscabies</i> FJ546739.1
3A1	JN206675	Aci1- Aci2	743pb	743/743	100%	<i>S. acidiscabies</i> FJ546739.1
3B1	JN206671	Aci1- Aci2	665pb	665/665	100%	<i>S. acidiscabies</i> FJ546739.1
4A2	JN206676	Aci1- Aci2	487pb	485/487	99%	<i>S. acidiscabies</i> GU479448.1

4.2.4 Amplificación por PCR con cebadores dirigidos hacia el gen *rpoB*

Las cepas 6₃, 4_{H1}, 1613_M, Db321, Db322, Db31, Db341 y Db342 se amplificaron por PCR con los cebadores dirigidos al gen *rpoB*. Para todas las cepas se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado 352pb.

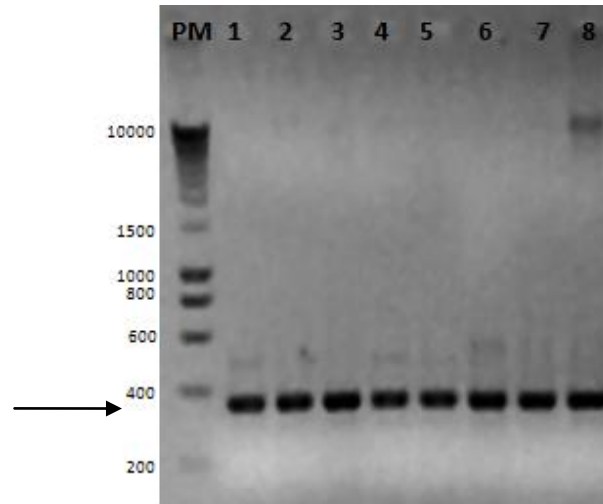


Figura 16: Amplificación por PCR del gen *rpoB* con los cebadores SRPOF1-SRPOR1. Fotografía de un gel de agarosa al 1,5%. Carril PM: marcador de peso molecular (*Smart Ladder*, Eurogenetec); Carriles 1-8: 6₃, 4_{H1}, 1613_M, Db321, Db322, Db31, Db341 y Db342. La flecha indica: bandas de los productos de amplificación del tamaño esperado aproximadamente 352pb.

Se realizó el análisis de las secuencias para las 8 cepas amplificadas, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 10).

Tabla 10: Cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias y datos obtenidos a partir de la comparación de las secuencias con las de la base de datos NCBI (GenBank) usando BLASTn.

Código	Par de cebadores	Largo de secuencia obtenida	pb/pb	Homología	Similar a
6 ₃	SrpoF1-SrpoR1	249pb	249/249	100%	<i>S. acidiscabies</i> EF101622.1
Db321	SrpoF1-SrpoR1	255pb	254/255	99%	<i>S. scabies</i> FJ007456.1
Db322	SrpoF1-SrpoR1	203pb	203/203	100%	<i>S. scabies</i> FJ007456.1
Db31	SrpoF1-SrpoR1	245pb	243/245	99%	<i>S. olivochromogenes</i> AY280762.1
Db341	SrpoF1-SrpoR1	265pb	263/265	99%	<i>S. olivochromogenes</i> AY280762.1
Db342	SrpoF1-SrpoR1	228pb	226/228	99%	<i>S. olivochromogenes</i> AY280762.1
4 _{H1}	SrpoF1-SrpoR1	247pb	247/247	100%	<i>S. albidoflavus</i> DQ978980.1
1613 _M	SrpoF1-SrpoR1	249pb	249/249	100%	<i>S. flaveolus</i> AY520425.1

4.3 Identificación de las cepas por métodos convencionales

La observación de las cepas al microscopio mostró bacterias Gram-positivas, filamentosas con cadenas de esporas onduladas.

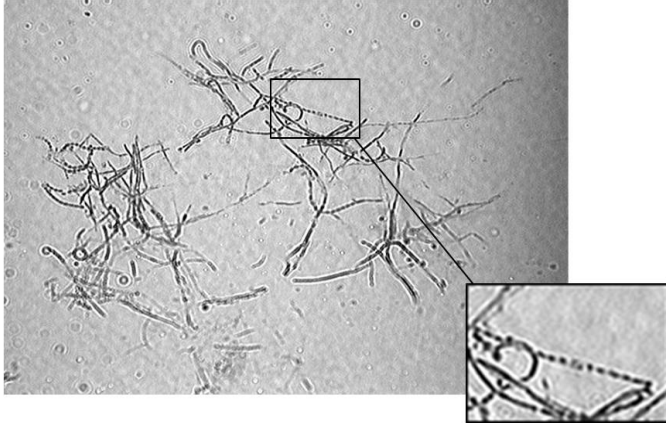


Figura 17: Fotografía del Gram de la cepa 6₁ observado a 100x.

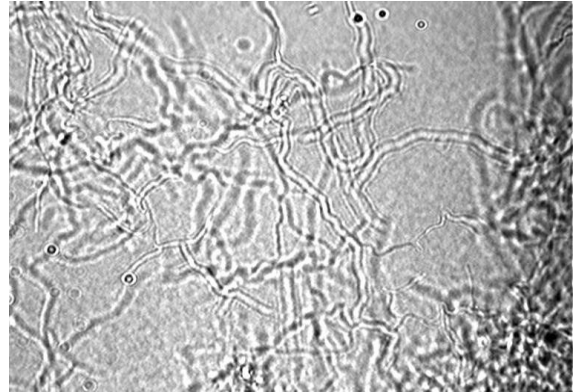


Figura 18: Fotografía del fresco de la cepa Db322, observado a 100x.

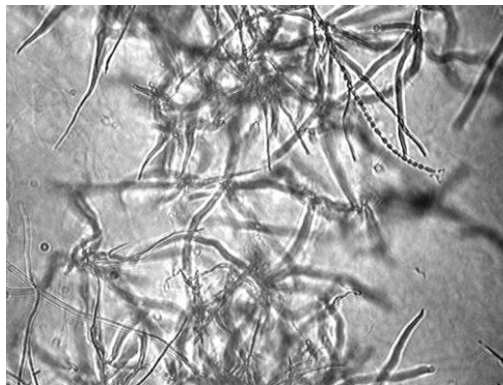


Figura 19: Fotografía del cultivo en lámina de la cepa Db322, observado a 40x.

A algunas de las cepas que amplificaron por PCR con los cebadores específicos para *S. acidiscabies* se les realizó el ensayo de la producción de melanina (Figura 22), la visualización del color del reverso de la colonia y color de la masa de esporas en medio YME. Se muestran los diferentes resultados para la masa de esporas (Figura 20) y para el reverso de la colonia (Figura 21). En la tabla se detallan los resultados obtenidos.

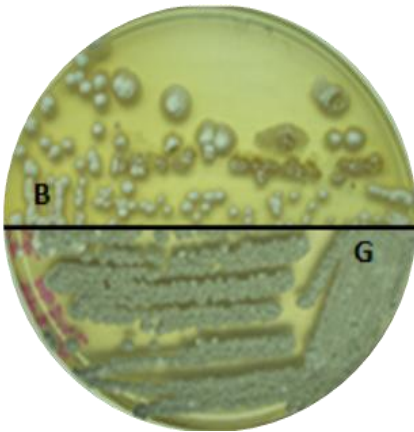


Figura 20: Fotografía del frente de las colonias para diferentes cepas crecidas en medio YME. Se puede apreciar los distintos colores de la masa de esporas: B, blanco; G, gris.

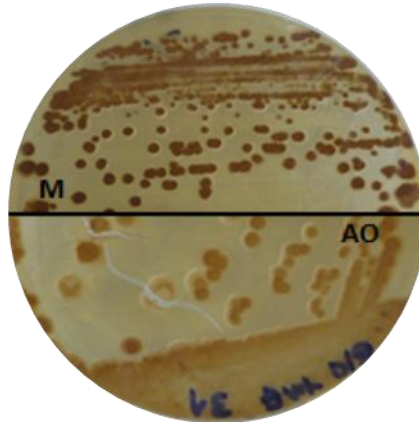


Figura 21: Fotografía del reverso de las colonias para diferentes cepas crecidas en medio YME. Se puede apreciar los diferentes colores: M, marrón; AO, amarillo ocre.

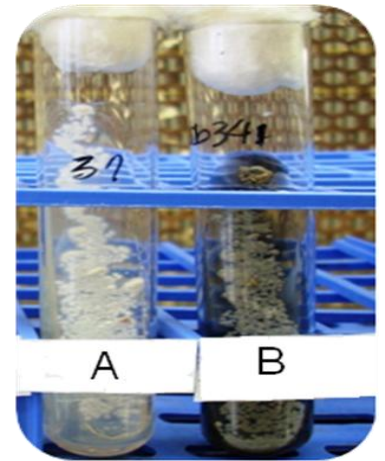


Figura 22: Fotografía del ensayo para la producción de melanina. Resultados: A, negativo y B, positivo.

Tabla 11: Características fenotípicas para cepas que amplificaron por PCR con los cebadores específicos para *S. acidiscabies*.

Cepas	Producción de melanina ^a	Color de la masa de esporas ^b	Color del reverso de la colonia ^c
1 ₁	-	B	AO
1 ₂	-	B	AO
3 ₁	-	B	M
6 ₁	-	B	M
6 ₂	-	B	M
6 ₃	-	B	M
1A	-	B	M
2A22	-	B	M
3A1	-	B	M
4A1	-	B	M
Db321	+	G	M
Db322	+	G	M
Db341	+	G	M
Db342	+	G	M
Control (-)	-	-	-

^a (+), reacción positiva; (-), reacción negativa. ^b B, blanco; G, gris. ^c AO, amarillo ocre; M, marrón ; C, crema.

4.4 Determinación de factores de patogenicidad

4.4.1 Amplificación mediante PCR de genes marcadores de patogenicidad

Se amplificaron por PCR los siguientes genes marcadores de patogenicidad: los genes de la biosíntesis de la taxtomina A *txtAB* y *txtA*, el gen homólogo de la tomatinasa *tomA* y el gen *nec1*. De las 42 cepas analizadas, en al menos 9 se obtuvo amplificación por PCR convencional de uno de los genes marcadores de patogenicidad (Tabla 12).

Tabla 12: Resultados obtenidos para todas las cepas por la amplificación mediante PCR de diferentes genes marcadores de patogenicidad.

Cepas	<i>S. acidiscabies</i>	Genes marcadores de patogenicidad			
		<i>tomA</i>	<i>nec1</i>	<i>txtAB</i>	<i>txtA</i>
1 ₁	+	+	+	-	banda mayor
1 ₂	+	+	+	-	-
2	-	ND	-	ND	ND
3 ₁	+	-	-	-	banda mayor
3 _{H1}	-	-	-	-	-
3 _{H2}	-	-	-	-	-
4 _{H1}	-	+	-	-	-
4 _{H2}	-	-	-	-	-
5 ₃	-	-	-	-	-
5 ₅	-	-	-	-	-
5 _{H1}	-	ND	banda mayor	ND	ND
6 ₁	+	+	+	+	+
6 ₂	+	+	+	+	+
6 ₃	+	+	+	-	+
536	-	-	-	-	-
536 ₃	-	-	-	-	-
536 _H	-	-	-	-	-
1613 _M	-	-	+	ND	ND
1617 _H	-	-	-	-	-
1617 _{HM}	-	-	-	ND	-
4801 _F	-	-	-	ND	-
1A	+	-	-	ND	-
1A2	+	-	-	ND	-
1B1	+	-	-	ND	-
1B3	+	-	-	ND	-
2A22	+	-	-	ND	-
2B1	+	-	-	ND	-
2B2	+	-	-	ND	-
2B3	+	-	-	ND	-
3A1	+	-	-	ND	-
3A2	+	-	-	ND	-
3B1	+	-	-	ND	-
4A1	+	-	-	ND	-
4A2	+	-	-	ND	-
4B1	+	-	-	ND	-
4B2	+	-	-	ND	-
Db3	+	-	-	ND	-
Db321	+	-	-	ND	-
Db322	+	-	-	ND	-
Db341	+	-	-	ND	-
Db342	+	-	-	ND	-
Ba5	-	-	-	ND	-

(+) Amplificación del tamaño esperado, (-) no hubo amplificación y ND: no determinado.

Algunos productos de PCR se enviaron a secuenciar para verificar la identidad de los genes marcadores de patogenicidad y las secuencias obtenidas se compararon con las del banco de datos GenBank mediante el algoritmo Blastn.

Tabla 13: Cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias y datos obtenidos a partir de la comparación de las secuencias con las de la base de datos NCBI (GenBank) usando BLASTn.

Código	Par de cebadores	Largo de secuencia obtenida	NCBI (GenBank) match	pb/pb	Homología	Número de acceso GenBank
1 ₁	Tom3-Tom4	259pb	<i>tomA</i>	259/259	100%	AY707079.1
6 ₁	Nf -Nr	585pb	<i>nec1</i>	584/585	99%	EU864246.1
6 ₂	Nf -Nr	613pb	<i>nec1</i>	613/613	100%	EU864246.1
6 ₁	TxtA1- TxtA2	292pb	<i>txtA</i>	292/292	100%	FN554889.1
6 ₁	TxtAB1-TxtAB2	248pb	<i>txtAB</i>	248/248	100%	AF255732.1

4.4.2 Ensayo de patogenicidad

Se realizó el ensayo de patogenicidad en discos de papa a las cepas que amplificaron por PCR con los cebadores específicos para *S. acidiscabies*. El control negativo se inoculó con agua estéril (Figura 23A), las muestras positivas para el ensayo mostraron crecimiento y lesión en la papa (Figura 23C), mientras que las negativas solo crecimiento (Figura 23B). De las 14 muestras seleccionadas para el ensayo, 8 dieron positivas (Tabla 14).

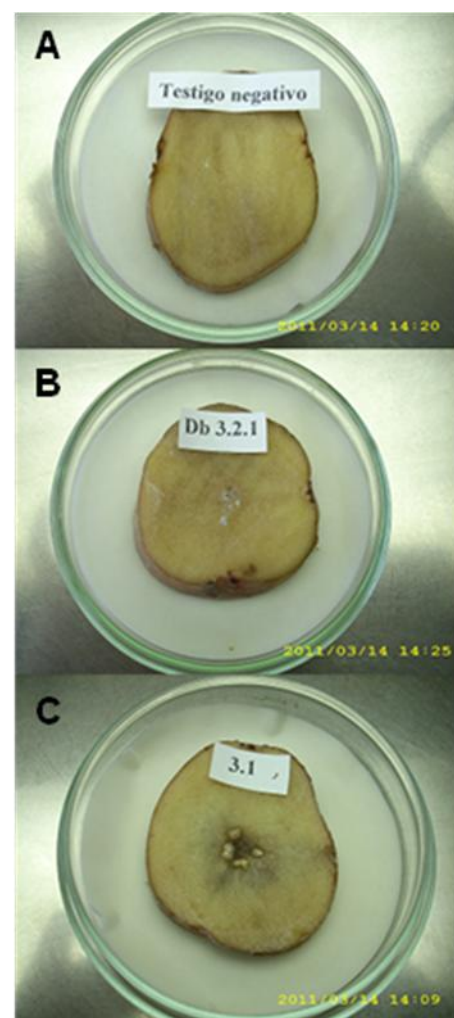


Figura 23: Resultados del ensayo de patogenicidad en discos de papa. **A**, control negativo; **B**, resultado negativo y **C**, resultado positivo.

Tabla 14: Resultados del ensayo de patogenicidad en discos de papa.

Cepas	Patogenicidad
1 ₁	-
1 ₂	-
3 ₁	+
6 ₁	+
6 ₂	+
6 ₃	+
1A	+
2A22	+
3A1	+
4A1	+
Db321	-
Db322	-
Db341	-
Db342	-
C(-)*	-

*Control negativo. (+) hubo lesión en la papa; (-) no hubo lesión en la papa.

4.5 Resumen de los resultados

Tabla 15: Características de las muestras (tubérculos) y, resultados de patogenicidad de las cepas identificadas por métodos moleculares como especies causantes de sarna común.

Cepa	Especie	Departamento	Tipo de Síntoma	Patogenicidad en papa	tomA	nec1	txtAB	txtA
1 ₁	<i>S. acidiscabies</i>	-*	Reticulada	-	+	+	-	banda mayor
1 ₂	<i>S. acidiscabies</i>	-*	Reticulada	-	+	+	-	-
3 ₁	<i>S. acidiscabies</i>	San José	Profunda	+	-	-	-	banda mayor
6 ₁	<i>S. acidiscabies</i>	San José	Profunda	+	+	+	+	+
6 ₂	<i>S. acidiscabies</i>	San José	Profunda	+	+	+	+	+
6 ₃	<i>S. acidiscabies</i>	San José	Profunda	+	+	+	-	+
1A	<i>S. acidiscabies</i>	San José	Profunda	+	-	-	ND	-
2A22	<i>S. acidiscabies</i>	San José	Profunda	+	-	-	ND	-
3A1	<i>S. acidiscabies</i>	Canelones	Profunda	+	-	-	ND	-
4A1	<i>S. acidiscabies</i>	Canelones	Profunda	+	-	-	ND	-
Db321	<i>S. scabies</i>	San José	Reticulada	-	-	-	ND	-
Db322	<i>S. scabies</i>	San José	Reticulada	-	-	-	ND	-

* Muestra de papa semilla importada Canadiense.

Cepas con genes de patogenicidad.
 Cepas patógenas en papa.
 Cepas patógenas en papa y con genes de patogenicidad.
 Cepas no patógenas.

5 DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento de cepas de *Streptomyces* a partir de tubérculos con síntomas severos de sarna común

De los cinco métodos de procesamiento evaluados, el método de siembra directa del micelio resultó poco eficiente, básicamente por problemas de contaminación por crecimiento de hongos, logrando solo un aislamiento para una muestra.

El método que resultó más eficiente fue el que usa fenol-agua (sin dejar 10 minutos de espera antes de la siembra). En este caso se obtuvieron 12 aislamientos con las características morfológicas esperadas para el género *Streptomyces*.

5.2 Identificación de las cepas por métodos moleculares

5.2.1 Extracción de ADN

Comparando los dos métodos de extracción de ADN ensayados, se pudo concluir que a partir de la extracción clásica se obtiene mayor cantidad de ADN genómico y plásmidos (estos son frecuentes en el género *Streptomyces*). Inesperadamente en la extracción mediante el Kit comercial Vivo Genomic DNA Purification Kits (*ViVo Science*) la cantidad de ADN obtenido es menor y no se extrajeron los plásmidos. Sin embargo, el ADN se encuentra más limpio.

Para determinar si el ADN estaba libre de contaminantes que interfiriesen en la PCR, se realizó la amplificación por PCR con cebadores universales para el dominio Bacteria.

5.2.2 Amplificación por PCR con cebadores dirigidos hacia el gen del ARNr 16S para el dominio Bacteria

Se obtuvieron para todos los ADNs ensayados el producto de amplificación por PCR del tamaño esperado según los cebadores dirigidos al ARNr 16S. Esto confirmó que los microorganismos aislados pertenecían al dominio Bacteria. En este punto debemos destacar que dada las características del género *Streptomyces*, fue necesario adquirir cierta experiencia antes de diferenciar sus colonias de otras muy parecidas que eran de hongos. La flora presente en los tubérculos a pesar de los tratamientos previos realizados antes de los aislamientos, dio lugar a un gran número de colonias muy variadas. Por otra parte, estas amplificaciones permitieron confirmar que los ADNs extraídos eran amplificables por PCR, o sea, que no poseían trazas de algún producto de la extracción (etanol, cloroformo, etc.) que impidiera la reacción de PCR.

Para conocer la identidad de las cepas, se enviaron a secuenciar los fragmentos amplificados y se analizaron las secuencias por comparación con las de la base de datos GenBank. Se obtuvieron para todas las cepas secuenciadas (Tabla 8) porcentajes de similitud muy altos ($\geq 99\%$). A partir del

secuenciado del gen ARNr 16S se identificaron algunas cepas hasta el género y otras hasta la especie, lo que permitió concluir que las cepas 1₁, 1₂, 5₃, 5₅ y 6₁ pertenecen al género *Streptomyces*. Por otra parte, la cepa 5₅ pertenece a la especie *S. flaveolus* la cual no es causante de la enfermedad. Sin embargo la cepa 6₁ pertenece a un patógeno emergente *S. acidiscabies*, causante de sarna común en la papa, el cual no ha sido reportado en Uruguay hasta la fecha.

Los resultados obtenidos a partir de la secuencia del gen del ARNr 16S demuestran que si bien nos hemos enfocado al aislamiento de las cepas presentes en las lesiones de sarna, esta flora es muy variada y no sólo presenta los microorganismos patógenos sino también a otros microorganismos acompañantes.

5.2.3 Amplificación por PCR con cebadores especie-específicos

Algunas cepas amplificaron el fragmento esperado con los cebadores específicos para la especie *Streptomyces acidiscabies*. La identidad de las cepas se confirmaron por el análisis de secuencia, en los que se obtuvo un porcentaje de similitud muy alto ($\geq 99\%$).

Las cepas identificadas como *S. acidiscabies* fueron aisladas de la lesión de sarna común de tubérculos cultivados en los departamentos de San José, Canelones y de la papa semilla. Las condiciones en que se realizaron los cultivos fueron suelos con un pH menor a 5 y muy húmedos. Todos estos datos sugieren que *S. acidiscabies* podría ser el patógeno causante del brote de sarna común en nuestro país en la zafra de otoño 2010.

Por otra parte, llamó la atención que ninguna cepa aislada haya amplificado con los cebadores específicos para *S. scabies*, ya que este está distribuido mundialmente y es el mayor agente causal de sarna en la papa. Una razón podría ser que los aislamientos se hicieron directamente de las lesiones y las condiciones de la zafra de otoño de 2010 que no fueron las más adecuadas (suelos con humedad baja y pH mayor a 5.2) para que *S. scabies* indujera la enfermedad. Sin embargo esto no significa que este patógeno no se encuentre en nuestros campos.

5.2.4 Amplificación por PCR con cebadores dirigidos hacia el gen *rpoB*

A aquellas cepas que no pudieron ser identificadas con cebadores dirigidos al gen ARNr 16S, se les realizó la amplificación por PCR con cebadores dirigidos al gen *rpoB*. Este gen codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa. Según bibliografía este posee algunas ventajas sobre el gen ARNr 16S. Por un lado, tiene una sola copia en el genoma, mientras que el gen ARNr 16S es un gen de copias múltiples y aunque es poco frecuente, se ha informado que el 6.9% de las especies de *Streptomyces* poseen múltiples copias de este gen con diferentes secuencias (Kim *et al.*, 2004).

Dado el número de cepas obtenidas, se seleccionaron para secuenciar el gen *rpoB* aquellas cepas en las que se demostró que tenían genes de patogenicidad y a aquellas cepas que habían amplificado con

los cebadores específicos para *S. acidiscabies* pero cuyas características fenotípicas no concordaban con dicha especie.

Las cepas 4_{H1} y 1613_M, que confirmaron por PCR poseer genes de patogenicidad, se identificaron por secuenciado del gen *rpoB* como especies de *Streptomyces* que no están reportadas como causantes de sarna común: *S. albidoflavus* y *S. flaveolus* respectivamente. Estas especies podrían haber adquirido los genes de patogenicidad por transferencia horizontal de la isla de patogenicidad, pero no todos los genomas son buenos receptores de la misma, por lo que es posible que estos genes no se estén expresando.

Por otra parte, las cepas Db31, Db321, Db322, Db341 y Db342 que amplificaron con los cebadores específicos para *Streptomyces acidiscabies* pero que tenían características fenotípicas diferentes, se identificaron por secuenciado del gen *rpoB* como otras especies de *Streptomyces*. Estos resultados han sido de gran relevancia pues nos han indicado que los cebadores descritos en bibliografía como específicos para *S. acidiscabies* no lo son tanto. Mientras que las cepas Db31, Db341 y Db342 dada la secuencia del gen *rpoB* pertenecerían a la especie *S. olivochromogenes* (no causante de sarna común en la papa), las secuencias de las cepas Db321 y Db322 corresponden a *S. scabies*, patógeno causante de sarna común. Esto nos estaría mostrando que efectivamente el patógeno de sarna *S. scabies* (distribuido mundialmente), también está presente en nuestros campos. Sin embargo, estas cepas no amplificaron en nuestras reacciones de PCR con los primers especie específicos para *S. scabies* descritos en bibliografía y no se había logrado determinar la especie con la secuencia del gen ARNr 16S. Por lo tanto, el gen *rpoB* ha demostrado ser mejor para la identificación de las cepas aisladas. Dado que los cebadores especie específicos para *S. scabies* que poseíamos no amplificaron dichas cepas, y que hemos corroborado que su secuencia está presente en el genoma secuenciado de *S. scabies* 87-22 (Accession Number NC_013929) concluimos que los cebadores Scab1m-Scab2m posiblemente no hayan sido correctamente sintetizados.

5.3 Identificación de las cepas por métodos convencionales

Todas las cepas aisladas se observaron en microscopio óptico, observándose en todos los casos bacterias Gram positivas filamentosas: morfología esperada para el género *Streptomyces*. Si bien la tinción de Gram permitió la observación de las esporas, no se distinguió la forma de las cadenas de esporas, característica que diferencia *S. scabies* de *S. acidiscabies*. Esperando poder distinguir esto, se prepararon frescos de las cepas, donde se visualizaron cadenas de esporas onduladas, pero no las típicas cadenas en espiral de *S. scabies*. Para corroborar este resultado se realizaron cultivos en lámina en los cuales se observaron también cadenas onduladas. Este método permitió visualizar mejor las características del cultivo.

Otras propiedades distintivas de las dos especies mencionadas son el color de la masa de esporas en medio YME después de 14 días de incubación a 28°C y la producción de melanina. Estas

características se observaron para algunas cepas que habían amplificado con los cebadores específicos para *S. acidiscabies*. Estos resultados llamaron la atención, ya que no todas las cepas tenían las características fenotípicas de *S. acidiscabies* (color de la masa de esporas blanca y la no producción de melanina). Por lo tanto, como forma de dilucidar la identidad de estas cepas y de acuerdo a las ventajas anteriormente mencionadas respecto al gen *rpoB*, se determinaron las secuencias de este gen para estas cepas. El análisis de las secuencias resultó en la identificación de las cepas Db321 y Db322 como *S. scabies*. Esta identificación concuerda con las características fenotípicas (color de la masa de esporas gris y producción de melanina) para dichas cepas. Por otra parte, las cepas Db341 y Db342 se verificaron por secuenciado que corresponden a *S. olivochromogenes*, especie que no es agente causante de sarna común.

5.4 Determinación de factores de patogenicidad

5.4.1 Amplificación mediante PCR de genes marcadores de patogenicidad

Se realizó la amplificación por PCR de los genes de la biosíntesis de la taxtomina A (*txtA* y *txtB*), el gen que codifica para un homólogo de la tomatinasa (*tomA*) y el gen que codifica una proteína necrogénica (*nec1*) para todas las cepas aisladas. Se enviaron a secuenciar los productos de PCR que se encontraban limpios y con la concentración exigida por el servicio de secuenciado de MacroGen (Corea). El análisis de las secuencias mostró una gran similitud ($\geq 99\%$) con los genes esperados, lo que es indicativo de que estas cepas son potencialmente patógenas. De nueve cepas que amplificaron al menos un gen marcador de patogenicidad, siete fueron identificadas como *S. acidiscabies*. Las otras dos se identificaron como especies no causantes de sarna común *S. albidoflavus* y *S. flaveolus*.

No obstante, la presencia de los genes *txtA* y *txtAB* codificantes para las enzimas taxtomina sintetasas, no nos asegura que la toxina taxtomina se produzca y sea activa ya que estos genes forman parte de la vía biosintética de la enzima que es bastante compleja (Figura 7A). Confirmar que estas cepas producen la toxina taxtomina A sería la única forma de asegurar que estas cepas son patógenas (Loria *et al.*, 2010). De todas formas, tal como hemos mencionado en la introducción, está muy documentada la correlación de la presencia de estos genes con la patogenicidad (Loria *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2008; Wanner, 2006). En nuestro trabajo para dos cepas, las amplificaciones con los cebadores para el gen *txtA*, resultaron en la amplificación de fragmentos de mucho mayor tamaño al esperado, lo que podría indicar una inserción en el gen, resultado que en este trabajo no profundizamos.

Respecto a los genes *nec1* y *tomA* codifican directamente para las proteínas Nec1 y el homólogo de la tomatinasa. Estas proteínas suprimen la respuesta de defensa del huésped durante la infección. Como mencionamos para el caso de la taxtomina A, podemos decir que las cepas que contienen estos genes son potencialmente patógenas, dado que su presencia no nos asegura su expresión ni su funcionalidad en la bacteria.

Sin embargo, la reciente disponibilidad de la secuencia del genoma de *S. scabies* ha proporcionado una nueva comprensión de los factores genéticos. A partir de análisis genómicos se sugirió que la patogenicidad de *Streptomyces* puede tener múltiples determinantes genéticos además de la taxonomía A y los factores de virulencia Nec1 y tomatinasa (Bignell *et al.*, 2010). Por lo tanto, aún aquellas cepas que no amplificaron para ninguno de los tres genes marcadores de patogenicidad, no se pueden descartar como patógenas.

5.4.2 Ensayo de patogenicidad

De acuerdo a la bibliografía, se han encontrado cepas de *Streptomyces* que producen patogenicidad en papa y no contienen ninguno de los genes marcadores de patogenicidad. Por otra parte, también se han descrito cepas que los contienen y no se muestran patógenas a la hora de ser inoculadas en papa. Para determinar las características de nuestras cepas, realizamos el ensayo de patogenicidad en discos de papa. En nuestro caso, no todas las cepas de *S. acidiscabies* produjeron patogenicidad en papa. Algunas cepas de *S. acidiscabies* produjeron patogenicidad en discos de papa y contenían genes de patogenicidad mientras que otras no. Por otra parte hemos constatado la presencia de cepas de la especie *Streptomyces acidiscabies* que mostraron patogenicidad en los ensayos de inoculación en papa y que fueron aisladas de tubérculos con lesiones profundas, procedentes de campos paperos de Uruguay. Pero también hemos aislado cepas de *S. acidiscabies* y *S. scabies* que no dieron patogenicidad en discos de papa y que fueron aisladas de tubérculos con sarna reticulada (síntoma más leve de sarna común). Esto podría indicar que las cepas aisladas de sarna reticulada serían menos agresivas y nuestras condiciones del ensayo en discos de papa no permitieron expresar su patogenicidad.

6 CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

Se aislaron 42 cepas de *Streptomyces* spp. a partir de síntomas de “pozo o cráter” de 2-3 cm de diámetro por 1 cm de profundidad aproximadamente de tubérculos que presentaron esta nueva sintomatología asociada no conocida en Uruguay.

De las técnicas de aislamiento utilizadas resultó la más eficiente la que contiene fenol-agua (sin dejar 10 minutos de espera antes de la siembra).

Los aislamientos obtenidos se identificaron por técnicas clásicas y moleculares.

Para la identificación molecular de las cepas el secuenciado del gen *rpoB* resultó ser más ventajoso que el del gen ARNr 16S.

La presencia de genes marcadores de patogenicidad no se correlacionó para todos los aislamientos con el ensayo de patogenicidad en discos de papa.

Se identificó a *Streptomyces acidiscabies* como el patógeno causal de la sarna común de los cultivos de papa, en la zafra de otoño de 2010 en los departamentos de San José y Canelones. Lo cual representa el primer reporte de éste patógeno en el cultivo de papa en Uruguay.

Este trabajo ha permitido construir la primera colección de cepas de *Streptomyces* en Uruguay.

Las perspectivas que surgen a partir de este trabajo son:

- Continuar estudiando las cepas de *Streptomyces* causantes de sarna común en Uruguay, aislándolas de tubérculos con cualquier tipo de síntomas de sarna común.
- Aislar cepas de *Streptomyces* a partir de suelos de campos con diferentes antecedentes.
- Determinar si las cepas de *Streptomyces* aisladas son patógenas.
- Caracterizar y comparar las cepas patógenas aisladas a partir de métodos de *fingerprinting*
- Diseñar mejores cebadores para la identificación de especies causantes de sarna común.
- Diseñar y optimizar un método molecular de diagnóstico específico, sensible y confiable.
- Sugerir cambiar el método inspectivo para control de sarna de los tubérculos semillas que ingresan al país. Esto resulta crucial para el sector productivo de papa, ya que la observación visual se utiliza como método inspectivo para la determinación de la entrada al país de papa semilla importada. Este método no permite detectar la presencia asintomática del patógeno en el tubérculo, que en bajas concentraciones podría ser diseminado por su progenie.

7 APÉNDICE

7.1 Medios de cultivos

- YME (Yeast malt extract): 4g de extracto de lavadura, 10g de extracto de malta, 4g de dextrosa, se lleva a 950ml con agua destilada, se ajusta el pH a 7.3 y se completa hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).
Para cultivo sólido se agrega 20 g/L de bacto agar (Loria *et al.*, 2010).
- NPPC (Nistatina, Polimixina, Penicilina, Cicloheximida): solución stock (500mg de Nistatina, 50mg de sulfato de β -polimixina, 10mg de Penicilina-G sódica, 500mg de cicloheximida se lleva a 100ml con agua destilada). Esta solución se esteriliza por filtración. Luego se agrega esta solución a 20 g/l de bacto agar enfriado a menos de 55°C después de su esterilización por calor húmedo (15 minutos a 121°C) (Loria *et al.*, 2010).
- Agar Tirosina: 15.0g de glicerol, 0.5g de L-tirosina, 1.0g de L-asparagina, 0.5g de K_2HPO_4 , 0.5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5g de NaCl, 0.01g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y 20.0g de Bacto-agar. Llevar a un litro de agua destilada y ajustar el pH entre 7.2 y 7.4. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C) (Shirling and Gottlieb, 1966).

7.2 Reactivos (Sambrook and Russell *et al.*, 2001)

- Solución de EDTA (Ácido etilendiamino-tetra-acético) 0.5M pH 8.0: 7.3g de EDTA, 50ml de agua destilada y agregar 1g de NaOH hasta ajustar el pH a 8.0. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).
- Solución de Tris-HCl 1M pH 8.0: 12.1g de Tris-Cl, 95.8 de agua destilada y en campana se agrega 4.2ml de HCl. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).
- Tampón TE pH 8.0: 0.2ml de EDTA 0.5M pH 8.0, 1ml de la solución de Tris-Cl 1M pH 8.0, se lleva a 100ml con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).
- Tampón TE25S pH 8,0: 10.3g de sacarosa, 5ml de solución de EDTA 0.5M pH 8.0, 2.5ml de solución de Tris-Cl 1M pH 8.0, se ajusta el pH a 8.0 y se lleva a 100ml con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).
- NaCl 5M: 14.6g de NaCl en 50ml de agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).
- Solución CTAB/NaCl (0.7M NaCl y 10% CTAB): 4.1g de NaCl en 100ml de agua destilada, agregar y disolver en baño a 55°C 10g de CTAB.

7.3 Ubicación de las secuencias de los cebadores utilizados en el gen del ARNr 16S

A continuación se muestran las posiciones de las secuencia de los cebadores especie-específicos utilizados, los cuales se encuentran en las regiones variable del gen ARNr 16S de *Streptomyces*.

γ variable region

	170	180	190	200
scab1m				
971124 scabiei				
scabI				
AJ007423 europaeiscabiei				
D63868 bottropensis				
ID01-6.2A group X				
Stell1				
5263074 stelliscabiei				
acidi1				
AB026220 acidiscabies				
turg1m				
AB026221 turgidiscabies				
971132 diastatochromog				

α variable region

	970	980	990	1000	1010
ASE3					
971124 scabiei					
AJ007423 europaeiscabiei					
971132 diastatochromog					
AB026220 acidiscabies					
ID01-6.2A group X					
Stell3					
5263074 stelliscabiei					
D63868 bottropensis					
Turgret3					
AB026221 turgidiscabies					

1435 variable region

	1430	1440	1450	1460	1470
scab2m					
971124 scabiei					
AJ007423 europaeiscabiei					
T2St2					
5263074 stelliscabiei					
turg2m					
AB026221 turgidiscabies					
acidi2					
D63868 bottropensis					
971132 diastatochromog					
AB026220 acidiscabies					
ID01-6.2A group X					

Figura 24: Regiones variables en la secuencia del ADNr 16S de especies patógenas de *Streptomyces*. Se describe la secuencia de los cebadores especie específicos en negrita y su ubicación en las regiones variables. Las secuencias de las cepas aisladas (sin negrita) por Wanner *et al.*, 2006 se encuentran alineadas con la secuencia de los cebadores. Extraído de Wanner, 2006.

7.4 Fotos de las muestras

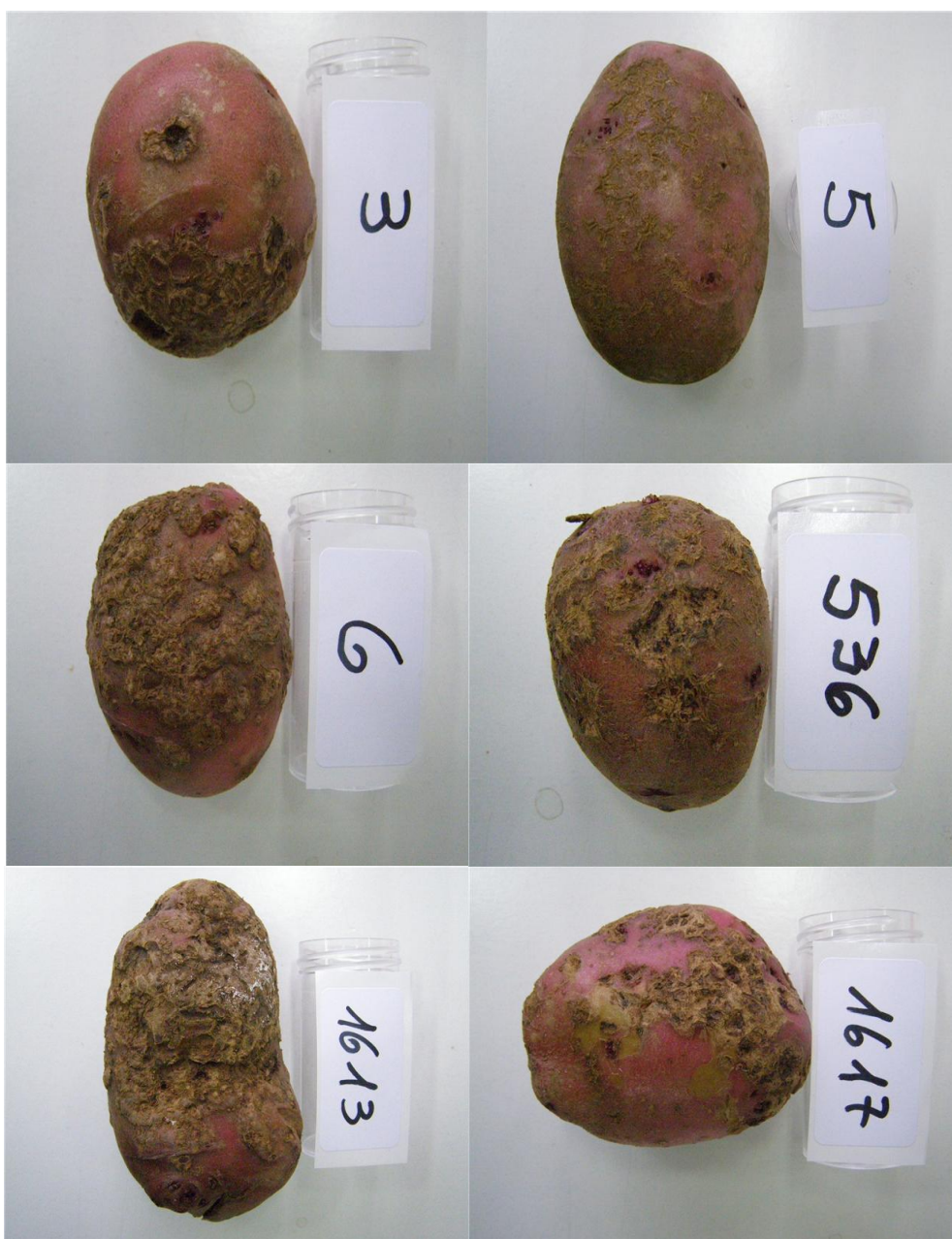


Figura 25: Fotografías de algunas muestras de tubérculos con síntomas de sarna común utilizadas en este trabajo.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G.N.** 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press. Cap. 12: 675-674.
- Bignell D.R., J.C. Huguet-Tapia, M.V. Joshi, G.S. Pettis and R. Loria.** 2010. What does it take to be a plant pathogen: genomic insights from *Streptomyces* species. Antonie van Leeuwenhoek DOI 10.1007/s10482-010-9429-1.
- Bischoff V., S.J. Cookson, S. Wu and W.R. Scheible.** 2009. Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. J. Exp. Bot. 60:955-965.
- Bouchek-Mechiche K., L. Gardan, P. Normand and B. Jouan.** 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:91-99.
- Bukhalid R.A. and R. Loria.** 1997. Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative pathogenicity factor. J. Bacteriol. 179:7776-7783.
- Bukhalid R.A., S.Y. Chung and R. Loria.** 1998. *nec1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plantpathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. Mol. Plant. Microbe. Interact. 11:960-967.
- Bukhalid R.A., T. Takeuchi, D. Labeda, and R. Loria.** 2002. Horizontal transfer of the plant virulence gene, *nec1*, and flanking sequences among genetically distinct *Streptomyces* strains in the Diastatochromogenes cluster. Appl. Environ. Microbiol. 68: 738-744.
- Cancino L.S.** 2003. Evaluación del daño causado por *Streptomyces scabies* (Thaxter) sobre tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* Hawkes.) durante el almacenaje. Tesis de grado. Universidad Austral de Chile.
- Claessen D., W. de Jong, L. Dijkhuizen and H.A.B. Wosten.** 2006. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky!. TRENDS in Microbiology. 14:313-319.
- Cullen D.W. and A.K. Lees.** 2006. Detection of the *nec1* virulence gene and its correlation with pathogenicity in *Streptomyces* species on potato tubers and in soil using conventional and real-time PCR. J. Appl. Microbiol. 102:1082-1094.
- DIEA-MGAP.** 2010. Estadísticas Agropecuarias. Encuesta de Papa. N° 297. <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,111,O,S,0,MNU;E;42;7;MNU;>
- Doering-Saad C., P. Kampfer, S. Manulis, G. Kritzman, J. Schneider, J. Zakrzewska-Czerwinska, H. Schrempf and I. Barash.** 1992. Diversity among *Streptomyces* strains causing potato scab. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3932-3940.
- Duval I., V. Brochu, M. Simard, C. Beaulieu and N. Beaudoin.** 2005. Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. Planta. 222: 820-831.

- Duval I. and N. Beaudoin.** 2009. Transcriptional profiling in response to inhibition of cellulose synthesis by thaxtomin A and isoxaben in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant. Cell. Rep.* 28:811-830.
- Faucher E., T. Savard and C. Beaulieu.** 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can. J. Plant. Pathol.* 14: 197-202.
- Flores-González R., I. Velasco and F. Montes.** 2008. Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. *Plant. Pathol.* 57: 162-169.
- Grela A., E. Caubet y J. A. Proto.** 2010. Informe de situación calidad de la semilla importada. http://www.ansepa.com.uy/userfiles/informacion/items/126_pdf.pdf
- Gouws R.** 2006. Etiology and integrated control of common scab on seed potatoes in South Africa. Master's Thesis. University of Pretoria, South Africa.
- Healy F.G. and D.H. Lambert.** 1991. Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:479-482.
- Healy F.G., R.A. Bukhalid and R. Loria.** 1999. Characterization of an insertion sequence element associated with genetically diverse plant pathogenic *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* 181:1562-1568.
- Healy F.G., M. Wach, S.B. Krasnoff, D.M. Gibson and R. Loria.** 2000. The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 38:794-804.
- Healy F.G., S.B. Krasnoff, M. Wach, D.M. Gibson and R. Loria.** 2002. Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. *J. Bacteriol.* 184:2019-2029.
- Hopwood D.A.** 2006. Soil to genomics: The *Streptomyces* chromosome. *Annu. Rev. Genet.* 40:1-23.
- Janssen P.H.** 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1719-1728.
- Johnson E.G., J.P. Sparks, B. Dzikovski, B.R. Crane, D.M. Gibson and R. Loria.** 2008. Plant-pathogenic *Streptomyces* species produce nitric oxide synthase-derived nitric oxide in response to host signals. *Chem. Biol.* 15:43-50.
- Johnson E.G., S.B. Krasnoff, D.R. Bignell, W.C. Chung, T. Tao, R.J. Parry, R. Loria and D.M. Gibson.** 2009. 4-Nitrotryptophan is a substrate for the non-ribosomal peptide synthetase TxtB in the thaxtomin A biosynthetic pathway. *Mol. Microbiol.* 73:409-418.
- Joshi M., X. Rong, S. Moll, J. Kers, C. Franco and R. Loria.** 2007a. *Streptomyces turgidiscabies* secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 20:599-608.

- Joshi M.V., D.R. Bignell, E.G. Johnson, J.P. Sparks, D.M. Gibson, R. Loria.** 2007b. The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*. Mol. Microbiol. 66:633-642.
- Kers J.A., K.D. Cameron, M.V. Joshi, R.A. Bukhalid, J.E. Morello, M.J. Wach, D.M. Gibson and R. Loria.** 2005. A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. Mol. Microbiol. 55:1025-1033.
- Kers J.A., M.J. Wach, S.B. Krasnoff, J. Widom, K.D. Cameron, R.A. Bukhalid, D.M. Gibson, B.R. Crane and R. Loria.** 2004. Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. Nature. 429:79-82.
- Kim B-J., C-J. Kim, J. Chun, Y-H. Koh, S-H. Lee, J-W. Hyun, C-Y. Cha and Y-H. Kook.** 2004. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:593-598.
- King R.R. and C.H. Lawrence.** 1995. 4-Nitrotryptophans associated with the in vitro production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies*. Phytochemistry. 40:41-43.
- King R.R., C.H. Lawrence and L.A. Calhoun.** 1996. Isolation and identification of pigments generated in vitro by *Streptomyces acidiscabies*. J. Agric. Food. Chem. 44:2849-2851.
- King R.R. and L.A. Calhoun.** 2009. The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. Phytochemistry. 70:833-841.
- Kreuze J.F., S. Suomalainen, L. Paulin and J.P.T Valkonen.** 1999. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the *nec1* gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland. Phytopathology. 89:462-469.
- Lambert D.H. and R. Loria.** 1989a. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:393-96.
- Lautru S., D. Oves-Costales, J.L. Pernodet and G.L. Challis.** 2007. MbtH-like protein-mediated cross-talk between nonribosomal peptide antibiotic and siderophore biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* M145. Microbiology. 153:1405-1412.
- Lehtonen M.J., H. Rantala, J.F. Kreuze, H. Bang, L. Kuisma, P. Koski, E. Virtanen, K. Vihlman and J.P.T. Valkonen.** 2004. Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. Plant. Pathol. 53:280-287.
- Lerat S., A.H. Babana, M. El Oirdi, A. El Hadrami, F. Daayf, N. Beaudoin, K. Bouarab and C. Beaulieu.** 2009. *Streptomyces scabiei* and its toxin thaxtomin A induce scopoletin biosynthesis in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. Plant. Cell. Rep. 28:1985-1903.
- Lindholm P., H. Kortemaa, M. Kokkola, K. Haahtela, M. Salkinoja-Salonen and J.P.T. Valkonen.** 1997. *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. Plant. Dis. 81:1317-1322.

- Loria R., R.A. Bukhalid, R.A. Creath, R.H. Leiner, L.M. Olivier and J.C. Steffens.** 1995. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species in vitro. *Phytopathology*. 85:537-541.
- Loria R., R.A. Bukhalid, B.A. Fry and R.R. King.** 1997. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant. Dis.* 81:836-846.
- Loria R., J. Kers and M. Joshi.** 2006. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:469-487.
- Loria R., D.R. Bignell, S. Moll, J.C. Huguet-Tapia, M.V. Joshi, E.G. Johnson, R.F. Seipke and D.M. Gibson.** 2008. Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94:3-10.
- Loria R., C.A. Clark, R.A. Bukhalid and B.A. Fry.** 2010. Gram positive bacteria. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3th ed. APS Press. NW Schaad Editor. 236-249.
- Madigan M.T., J.M. Martinko y J. Parker.** 1998. *Brock Biología de los microorganismos* 8th ed. Prentice Hall, Madrid. Cap 3:56-57.
- Miyajima K., F. Tanaka, T. Takeuchi and S. Kuninaga.** 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:495-502.
- Ndowora T.C.R., L.L. Kinkel, R.K. Jones and N.A. Anderson.** 1996. Fatty acid analysis of pathogenic and suppressive strains of *Streptomyces* species isolated in Minnesota. *Phytopathology*. 86:138-143.
- Park D.H., Y.M. Yu, J.S. Kim, J.M. Cho, J.H. Hur and C.K. Lim.** 2003. Characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Korea. *Plant. Dis.* 87:1290-1296.
- Qu X., L.A. Wanner and B.J. Christ.** 2008. Using the TxtAB Operon to Quantify Pathogenic *Streptomyces* in Potato Tubers and Soil. *Phytopathology*. 98:405-412.
- Sambrook J. and D.W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3th ed. Cold Spring Harbor, NY. Vol. 3. Appendix 1.
- Sanger F., S. Nicklen and R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74:5463-5467.
- Sanz A.** 2005. Aislamiento y caracterización de genes de la ruta biosintética de un antifúngico oxopentaeno producido por *Streptomyces* spp. Tesis doctoral. Universidad de Alcalá, Madrid.
- Scheible W-R., B. Fry, A. Kochevenko, D. Schindelasch, L. Zimmerli, S. Somerville, R. Loria and C.R. Somerville.** 2003. An *Arabidopsis* mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. *Plant. Cell*. 15:178-1794.
- Shirling E.B. and D. Gottlieb.** 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16:313-340.

- Song J., S-C. Lee, J-W. Kang, H-J. Baek and J-W. Suh.** 2004. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S–23S rDNA internally transcribed spacer sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:203-209.
- St-Onge R., C. Goyer, R. Coffin and M. Fillion.** 2008. Genetic diversity of *Streptomyces* spp. causing common scab of potato in eastern Canada. *Syst. Appl. Microbiol.* 31:474-484.
- Takeuchi T., H. Sawada, F. Tanaka and I. Matsuda.** 1996. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:476-479.
- Vilaro F.** 2008. Situación y perspectivas del cultivo de papa en Uruguay. <http://www.argenpapa.com.ar/default.asp?id=3814>
- Wanner L.A.** 2006. A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. *Phytopathology.* 96:1363-1371.
- Wanner L.A.** 2007b. A new strain of *Streptomyces* causing common scab in potato. *Plant. Dis.* 91:352-359.
- Wanner L.A.** 2009. A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. *Am. J. Pot. Res.* 86:247-264.
- Wolpert M., B. Gust, B. Kammerer and L. Heide.** 2007. Effects of deletions of *mbtH*-like genes on chlorobiocin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology.* 153:1413-1423.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A María Julia por dejarme entrar en el mundo de la investigación, dedicarme su preciado tiempo llena de paciencia y optimismo, enseñarme tanto y compartir sus conocimientos con el mejor sentido del humor.

A Enrique por darme la oportunidad de trabajar con él, trasmitirme sus conocimientos y brindarme su ayuda incondicional.

Analia, por ser mi profe de laboratorio, quien me enseñó a trabajar de verdad y ser un ejemplo como persona.

A toda la cátedra de Microbiología y en especial a los miembros del 12, con los cuales compartí muchas cosas buenas durante este proceso de aprendizaje.

A Caro, Mari, Flor, Belén, Pati y Romí por compartir todo este tiempo entre libros y hacer todo más llevadero.

A mis amigas de siempre Chicha, Natassha, Ale, Belén V, Romí, Nadis y Belén G por estar siempre. Las quiero nunca cambien !!

A mi novio por vivir este proceso como el suyo, por bancarse estos cambios de humor que el estudio nos causa y por ser esa compañía que no tiene valor en esos momentos en los que uno descarga con llantos y risas su estado de ánimo.

Mamá, Papá, Emi, Vicky y Tinito a ellos dedico mi Carrera entera por estar siempre cerca, acompañarme en situaciones y etapas difíciles lejos de mi Ciudad natal en los que uno pasa de ser un simple residente a ser estudiante, ama de casa, cocinero entre otras múltiples funciones. Y por sobre todas las cosas ser la fuente de felicidad de mi vida...

No creo que existan tantas palabras para agradecer sino hechos y a ellos dedicaré mi vida a esta vocación a la cual me ayudaron a descubrir: La investigación.

Agradezco a CSIC-UDELAR, a la Asociación Nacional de semilleristas de Papa del Uruguay (ANSEPA) y a las empresas DAILINTOR, MAGRIC, SAUDU y CELINCO por financiar este trabajo a través del proyecto CSIC productivo modalidad I *“Primer estudio sobre el agente responsable de la sarna común de la papa en Uruguay, dirigido a su identificación molecular y diagnóstico”*.

Agradezco también a la ANII por otorgarme la beca de iniciación a la investigación.