

Estudio de las cepas de *Streptomyces* spp. causantes de sarna común en la papa en Uruguay

**Tesis de Maestría
María Inés Lapaz**

**Tutora: María Julia Pianzzola
2014**

**Estudio de las cepas de *Streptomyces* spp. causantes de sarna
común en la papa en Uruguay**

María Inés Lapaz Eugui

**Trabajo presentado para obtener el título de
MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGÍA**

Director de Tesis:

María Julia Pianzzola

Tribunal:

Federico Battistoni

Sandra Alaniz

José Huguet-Tapia

Francisco Vilaró

Montevideo

Diciembre de 2014

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

PEDECIBA BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo de las siguientes instituciones, agencias y programas: Facultad de Ciencias, Facultad de Química–Universidad de la República, PEDECIBA Biología. Beca de Finalización de Posgrado–CAP-UdelaR, Beca de Movilidad Pedeciba, Proyecto CSIC productivo-UdelaR (Modalidad I).

El llevar a cabo esta tesis en la Cátedra de Microbiología fue una experiencia muy linda. El mayor apoyo fueron las personas que me acompañaron en este camino haciendo que aquellos resultados buenos fueran una gran alegría compartida, así como dando alguna solución o aliento para aquellos resultados no tan esperados.

En primer lugar quiero agradecer a María Julia por la enseñanza y el aprendizaje proporcionado durante todos estos años. Pero quiero agradecerle sobre todo por la gran motivación, la confianza que tuvo en mi trabajo, por sus consejos y por respetar mis ideas.

Agradezco a mis compañeros de la Cátedra de Microbiología y en especial a los compañeros del laboratorio 12 los que están y los que se han ido: Vale, Vicky, Cesar, Rodrigo, Paola, Marianita, Mari R, Gabi, Susana, Eugenia, Betina, Diego, Caro, Bea, Matías y Analía que han hecho del laboratorio un ambiente especial al cual da gusto llegar todos los días. En especial quiero agradecerle a Analía la cual me enseñó muchas cosas y por estar siempre. Agradezco a María, Sonia y Gianna por tantos consejos.

A Enrique, muchas gracias por estar siempre dispuesto para enseñarme sobre la fitopatología, es un gusto trabajar contigo.

A los compañeros del Laboratorio de la Dra. Loria, Universidad de Florida, por recibirme con amabilidad, disponibilidad y por enriquecer mis conocimientos. En especial a José y Erin por recibirme y hacerme sentir como en casa.

A mis padres y hermanos por tanto amor y por apoyarme siempre en todo.

A Fede, por ser mi soporte y mi cable a tierra. Por estar durante mis alegrías pero sobre todo por hacer más leves mis tristezas. A él le dedico ésta tesis porque realmente la ha vivido a la par.

RESUMEN

La sarna común es una importante enfermedad de la papa causada por un complejo de especies del género *Streptomyces*, cuyo representante más antiguo es *Streptomyces scabiei*, distribuido mundialmente. Esta enfermedad se caracteriza por lesiones necróticas en la superficie del tubérculo. La presencia de síntomas de sarna reduce la calidad comercial de los tubérculos y sanitaria de la papa semilla. En Uruguay esta enfermedad constituye uno de los principales problemas sanitarios asociados al cultivo de papa. El objetivo general de esta tesis es generar conocimiento sobre las cepas de *Streptomyces* spp. que afectan los cultivos de papa en Uruguay, de forma de contribuir en el establecimiento de estrategias de control de la sarna común. Para ello se generó una colección 331 cepas aisladas a partir de tubérculos con síntomas y suelos. De acuerdo a ensayos en discos de papa o por presencia de los genes responsables de la producción de taxtomina A, ochenta y cinco *Streptomyces* spp. fueron clasificados como potenciales patógenos. La caracterización de los aislamientos de *Streptomyces* spp. patógenos se realizó mediante: (I) secuenciación del gen marcador taxonómico *rpoB* (subunidad β de las ARN polimerasa) (II) *fingerprinting* rep-PCR, (III) *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) y (IIII) *Multilocus Sequence Typing*. Mediante éstas técnicas se identificaron consistentemente cuatro grupos diferentes de *Streptomyces* patógenos. El Grupo 1A constituido con aislamientos identificados como *S. acidiscabies* y el Grupo 1B conformado por aislamientos que se agrupan cerca de ésta especie. El Grupo 2 contiene aislamientos identificados como *S. scabiei*, mientras que el Grupo 3 está constituido por aislamientos identificados como *S. europaeiscabiei*. Este es el primer reporte de la especie de *S. europaeiscabiei* en Uruguay. Según el relevamiento realizado, los *Streptomyces* causantes de sarna en Uruguay son muy diversos con respecto a sus características fenotípicas, genéticas y a su patogenicidad. Si bien no todos pudieron ser identificados, estos datos irían en consonancia con la reiterada preocupación sobre la aparición de *Streptomyces* spp. patógenos emergentes causantes de sarna común.

INDICE GENERAL

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	2
Importancia del cultivo de papa	2
Enfermedad: “Sarna común” en la papa	3
Agente causal: especies del género <i>Streptomyces</i>	6
<i>Streptomyces</i> spp. : Taxonomía y Clasificación	11
Patogenicidad en <i>Streptomyces</i>	14
Ciclo de la enfermedad	20
Control de sarna en la papa	22
Antecedentes de sarna en la papa en Uruguay	28
JUSTIFICACIÓN	30
OBJETIVOS Y DESCRIPCIÓN DE LA TESIS	31
CAPÍTULO 2	32
RESUMEN	33
CHAPTER 2	34
ABSTRACT	35
INTRODUCTION	36
MATERIALS AND METHODS	39
Bacterial strains and culture conditions	39
Isolation of <i>Streptomyces</i> spp. from necrotic lesions on potato tubers	39
Isolation of <i>Streptomyces</i> spp. from soil	40
CS pathogenicity assay	40
Morphology and physiological characterization	41
DNA isolation	41
PAI marker genes	42
Dot blot analysis of txtAB gene	42
Species identification by PCR	43
Amplicon purification, gene sequencing and sequence editing	45
Phylogenetic analyses of <i>rpoB</i> gene	45
RESULTS	46
Pathogenicity Test and PAI Genotyping	51
Morphological and physiological traits	52
Species identification by PCR	53
DISCUSSION	57
CAPÍTULO 3	62
RESUMEN	63
INTRODUCCIÓN	64

MATERIALES Y MÉTODOS	68
Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	68
Extracción de ADN genómico.....	68
<i>Multilocus Sequence Analysis</i> (MLSA)	68
<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	70
<i>rep-PCR</i>	70
RESULTADOS.....	73
<i>Multilocus Sequence Analysis</i> (MLSA)	73
<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	80
Genotipado utilizando <i>rep-PCR</i>	83
DISCUSIÓN	85
CAPÍTULO 4.....	89
DISCUSIÓN GENERAL	90
CAPÍTULO 5.....	92
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	93
CAPÍTULO 6.....	95
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXO I	108
ANEXO II	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Principales zonas de producción.....	3
Figura 1.2. Tipos de síntomas de sarna común en tubérculos de papa causados por <i>S. scabies</i>	5
Figura 1.3. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	7
Figura 1.4. Representación esquemática de la IPAS _t en <i>S. turgidiscabies</i> Car8.....	17
Figura 1.5. Ciclo de la enfermedad de sarna común causada por <i>S. scabiei</i>	22
Figura 2.1. CS symptom classification on potato tubers used in this study.....	46
Figura 2.2. Pathogenicity assays using potato cv. Chieftain tuber slices: necrotic.....	52
Figura 2.3 Agarose gel analysis of amplification products using species-specific 16S rDNA primer pairs and DNA template from different <i>Streptomyces</i> species.....	54
Figura 2.4 Phylogenetic relationships between 61 <i>Streptomyces</i> spp.....	56
Figura 3.1. Amplificación por PCR de los genes: A , <i>atpD</i> ; B , <i>trpB</i> ; C , <i>recA</i> ; D , <i>rpoB</i>	73
Figura 3.2. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen <i>atpD</i>	77
Figura 3.3. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen <i>recA</i>	77
Figura 3.4. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen <i>rpoB</i>	78
Figura 3.5. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen <i>trpB</i>	78
Figura 3.6. Árbol filogenético construido a partir del alineamiento de las secuencias parciales concatenadas de los cuatro genes <i>housekeeping atpD</i> , <i>recA</i> , <i>rpoB</i> y <i>trpB</i>	79
Figura 3.7. Resultados obtenidos mediante el programa <i>eBurst</i> para los aislamientos de <i>S. acidiscabies</i> y la cepa de referencia <i>S. acidiscabies</i> 84-104.....	82
Figura 3.8. Dendograma combinado basado en BOX y ERIC-PCR de 86 aislamientos de <i>Streptomyces</i> spp. aisladas en Uruguay.....	84

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Primer pairs used for amplification of gene fragments in <i>Streptomyces</i>	44
Tabla 2.2. Phenotypic and genetic characterization of <i>Streptomyces</i> spp. isolates predicted to cause CS on potato in Uruguay and reference strains.....	47-50
Tabla 3.1. Cebadores y condiciones utilizados para el análisis de cepas de <i>Streptomyces</i> mediante MLSA y rep-PCR.....	72
Tabla 3.2. Resultados de los test estadísticos para verificar si existe eventos de recombinación entre las secuencias de cada gen.....	80
Tabla 3.3. Número de alelo de cada gen y número de perfil alélico para cada aislamiento..	81

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
<i>atpD</i>	gen que codifica la cadena β de la ATP sintasa
CTAB	<i>Cetyl trimethylammonium bromide</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
ECIs	Elementos de Conjugación Integrativa
EEUU	Estados Unidos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
<i>gyrB</i>	gen que codifica la subunidad B de la ADN girasa
IGAs	Islas genómicas
INASE	Instituto Nacional de Semillas
Intst	tirosina recombinasa
ISP	<i>International Streptomyces Project</i>
IPA	Isla de patogenicidad
IPAsT	isla de patogenicidad descrita en <i>S. turgidiscabies car8</i>
Kb	Kilobases
MaxChi	<i>maximal chi-squared</i>
MGAP	Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
Mpb	<i>Mega pares de bases</i>
<i>nec1</i>	gene que codifica la proteína necrogénica Nec1
NPPC	Nistatina, Polimixina, Penicilina, Cicloheximida
NRDB	<i>non- redundant database</i>
NSS	<i>neighbour similarity score</i>
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHI	<i>pairwise homoplasy index</i>
<i>recA</i>	gen que codifica la recombinasa A
rep-PCR	<i>repetitive element palindromic PCR</i>
RNase	<i>ribonuclease A</i>
<i>rpoB</i>	gen que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa
SC	sarna común
SDS	Dodecil sulfato sódico
ST	<i>Sequence Type</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima ADN polimerasa)
TBE	Buffer Tris borato
TE	Buffer Tris EDTA
THG	Transferencia horizontal de genes
<i>tomA</i>	gen que codifica para una tomatinasa
Tris	Trihidroximetil aminometano
<i>trpB</i>	gen que codifica la cadena β de la triptófano sintasa
<i>txtAB</i>	Operón con los genes <i>txtA</i> y <i>txtB</i> que codifican para taxtomina sintetasas
UV	Ultravioleta
YME	<i>Yeast malt extract</i>

CAPÍTULO 1

***Streptomyces* spp.: agente causal de sarna común
en la papa**

INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia del cultivo de papa

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) se originó en los Andes y fue introducido en Europa a partir de la conquista de América. Desde el siglo XIX se expandió a través del continente europeo y luego a otros continentes, suministrando alimento para los trabajadores de la Revolución Industrial. Desde esa época la papa ha tenido una decisiva contribución a la seguridad alimentaria (MGAP & Mercado Modelo, 2011).

Es el cuarto cultivo alimentario más importante en el mundo después del trigo (*Triticum aestivum*), el maíz (*Zea mays*) y el arroz (*Oryza sativa*) (Gouws, 2006). Debido a sus características nutricionales la papa es una de las hortalizas más importantes en la dieta de muchos países y se considera la segunda mayor fuente de nutrientes para la humanidad, siendo superada sólo por el huevo. Por otra parte, es fácil de cultivar, posee un alto rendimiento por unidad de superficie en comparación con otros cultivos y existe una creciente demanda de producción. Según la FAO, en 2007, la producción mundial de papa fue de unos 320 millones de toneladas. En el 2008, los cinco productores de papa más importantes fueron China, India, Rusia, Estados Unidos, y Alemania (Correa, 2011).

El cultivo de papa es el principal cultivo hortícola en Uruguay. En el año agrícola 2011/12 la producción de papa fue de 109 mil toneladas, en una superficie de alrededor de 5.000 hectáreas, con un rendimiento promedio de 22 toneladas/ha. La producción de papa abastece el mercado interno con un consumo anual de unos 34,2 kg por habitante por año (MGAP & Mercado Modelo, 2011). Muy poco del producto se destina a la exportación, por ejemplo, en el año 2012 se exportaron 83 toneladas de papa (DIEA & MGAP, 2013). Las zonas de producción de este cultivo son: sur, este y norte (Figura 1.1). En la actualidad, la zona sur concentra el 81% de la producción, proveniente en su mayoría del departamento de San José. En segundo lugar la zona este contribuye con el 15% de la misma, en tanto, la zona norte aporta el 4% restante de la producción, siendo Tacuarembó el principal departamento productivo de esta zona. Los cultivares más plantados en el país son Chifan

y Red Magic. En los últimos años se ha importado alrededor del 30% de la papa semilla utilizada (DIEA & DIGEGRA, 2013).



Figura 1.1. Principales zonas de producción. La integración departamental de cada zona es la siguiente: **Zona Norte:** Tacuarembó, Rivera, Salto, Paysandú, Río Negro. **Zona Este:** Maldonado y Rocha; **Zona Sur:** Montevideo, Canelones, San José, Colonia, Soriano, Flores, Durazno, Florida.

Enfermedad: “Sarna común” en la papa

La sarna común (SC) 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. Es la enfermedad de mayor importancia económica dentro de las causadas por especies del género *Streptomyces*. Esta enfermedad reduce la comercialización y el procesamiento de la papa debido a los síntomas externos que produce. Además, la papa semilla asintomática puede ser un agente de diseminación de la enfermedad, en particular, si los controles fitosanitarios no son rigurosos. 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).

La sarna de la papa es una enfermedad bacteriana compleja, con diversidad de síntomas y de agentes causales. 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 en las diversas regiones donde se presenta, lo que complica los esfuerzos para comprender la contribución de cada componente en la enfermedad (Wanner, 2009). Mientras el ambiente determina las condiciones favorables o desfavorables para el patógeno, el cultivar tiene influencia en el desarrollo de la enfermedad de acuerdo con su resistencia / susceptibilidad a la infección. Una vez instalada la enfermedad, las variaciones en los síntomas y la severidad están determinadas por el patógeno causante y su grado de virulencia. Se pueden producir diferentes tipos de lesiones (elevadas, superficiales o profundas) con diferentes aspectos (lisas, rugosas, reticuladas o en forma de estrella) (Figura 1.2). Estas variaciones permiten la clasificación de la sarna en diferentes tipos.

Sarna común, Sarna ácida y Sarna elevada

La sarna común, sarna ácida y sarna elevada son diferentes nombres para la misma enfermedad designados en base a las características de las lesiones y el patógeno asociado a ellas. Los tres tipos de sarnas se caracterizan por producir los mismos síntomas, los cuales van desde unas pocas manchas marrones superficiales o elevadas sobre la piel del tubérculo, 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).

La denominación de la enfermedad está asociada al tipo de patógeno y/o a las características ambientales para el desarrollo de la enfermedad. La sarna común está vinculada a *Streptomyces scabiei*, se desarrolla en suelos por encima de pH 5.2 mientras que la sarna ácida es causada por *S. acidiscabies*, ocurre en suelos ácidos con pH alrededor de 4.5 y, a la especie *S. turgidiscabies*, se la relaciona con la sarna elevada.

Estos tres tipos de sarna están asociados a la producción por el patógeno de una toxina, llamada taxtamina (Loria *et al.*, 1997). Dado que el mecanismo de patogenicidad en estas

tres sarnas es el mismo, la enfermedad puede ser denominada simplemente como sarna común, que es la más extendida mundialmente.

La taxtomina es una toxina que actúa necrosando el tejido, conduciendo a los síntomas característicos de la enfermedad (Lawrence *et al.*, 1990). La virulencia del patógeno depende de los factores de patogenicidad que la cepa posea y de cuánto se expresen, además de la producción de taxtomina. Se ha demostrado que la fitotoxina llamada taxtomina A producida por *S. scabiei*, 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).

Las especies *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* y *S. niveiscabiei* son productoras de taxtomina y causan sarna común de la papa. Las especies *S. puniscabiei* y *S. luridiscabiei* producen lesiones características de esta enfermedad, sin embargo hasta el momento no se ha confirmado la producción de taxtomina en estos patógenos (Healy *et al.*, 2000; King *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2003b).

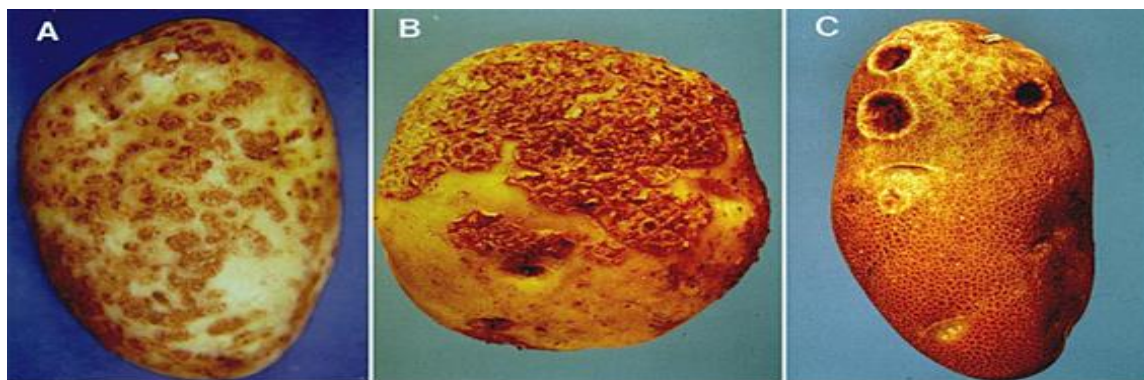


Figura 1.2. Tipos de síntomas de sarna común en tubérculos de papa causados por *S. scabies*. **A**, sarna reticulada; **B**, sarna elevada; **C**, sarna profunda. Extraído de Loria y colaboradores (1997).

Agente causal: especies del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* pertenece a la familia Streptomycetaceae y al orden de los Actinomicetales, incluye bacterias filamentosas, Gram-positivas, aerobias, saprofitas, capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía (Sanz, 2005; Janssen, 2006). Poseen un cromosoma lineal de gran tamaño, entre 6,5Mpb y 11.9 Mpb, con alto contenido GC (cercano al 70%) (Zhou *et al.*, 2011). Frecuentemente poseen plásmidos circulares y lineales que contribuyen a la capacidad de adaptación y sin duda, participan en la transferencia horizontal de genes (Loria *et al.*, 2006). El ciclo de vida de *Streptomyces* es complejo (Figura 1.3), implica la producción de hifas aéreas y la subsiguiente diferenciación de estas estructuras en cadenas de esporas. Éstas son uninucleadas, poseen una pared engrosada de naturaleza hidrofóbica que las protege de la desecación y les permite dispersarse en el medio que las rodea, pudiendo ser trasladadas por el agua o por artrópodos y nematodos presentes en el suelo. Las esporas germinan y forman micelios ramificados multinucleados. La red de filamentos secreta enzimas catabólicas que degradan el sustrato orgánico rompiéndolo en nutrientes digeribles y de esta manera se promueve el crecimiento de colonias. El crecimiento del micelio sustrato no se produce de forma indefinida; existen señales ambientales, dentro de las que se incluyen las de privación de nutrientes, que disparan la expresión de genes implicados en el desarrollo del micelio aéreo (Loria *et al.*, 2006). Las hifas aéreas se nutren de los productos de degradación del micelio sustrato y en una segunda etapa sufren un proceso de curvatura, enrollamiento, formación de septos y engrosamiento de la pared celular para dar lugar a una cadena de esporas, que se liberarán al medio y, en condiciones adecuadas, germinarán y desarrollarán un nuevo micelio sustrato (Sanz, 2005).

Las cadenas de esporas en *Streptomyces* presentan distintas formas y coloración lo que constituyen características taxonómicas importantes (Shirling & Gottlieb, 1966). La producción y secreción de metabolitos secundarios incluyendo compuestos antimicrobianos es coordinado con la senescencia del micelio sustrato (Horinouchi, 2002).

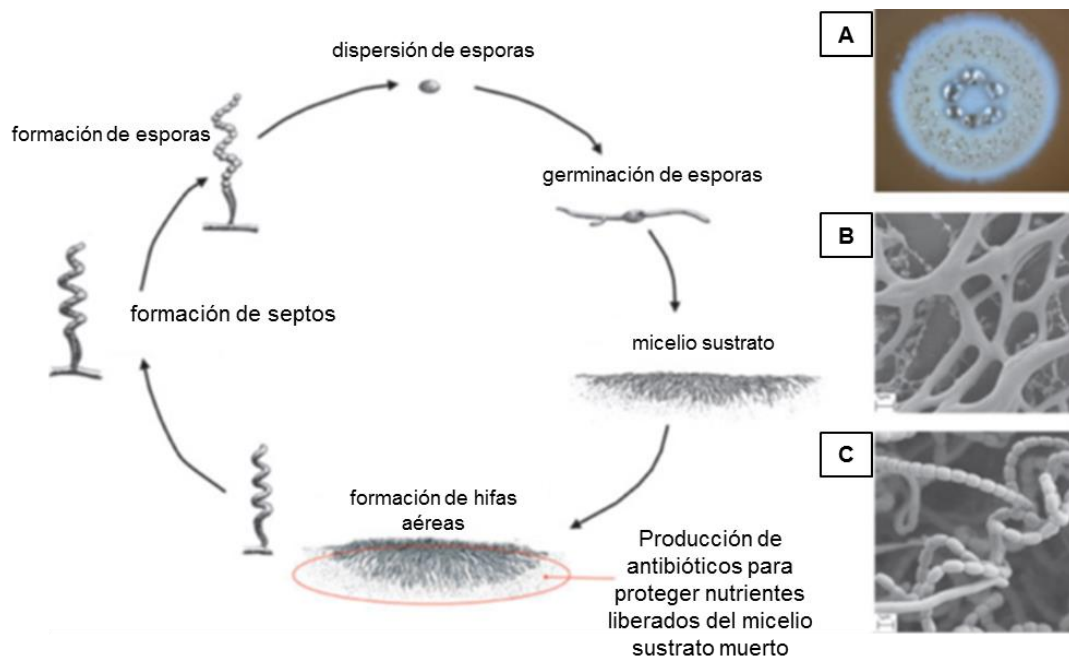


Figura 1.3. Ciclo de vida de *Streptomyces* extraído de Seipke y colaboradores 2012. Las imágenes de la derecha muestran: **A** una colonia de *Streptomyces* spp. Las imágenes **B** y **C** son micrografías electrónicas de barrido del micelio sustrato y de las hifas aéreas y cadenas de esporas de *Streptomyces coelicolor* respectivamente.

El género *Streptomyces* está compuesto por más de 650 especies (Euzéby, 2014). La mayor parte de las especies son saprofitas y viven en el suelo, participando en los procesos de reciclaje de nutrientes, produciendo una amplia gama de enzimas catabólicas que degradan polímeros biológicos complejos derivados de plantas y/o animales, como la celulosa, lignina y quitina (Loria *et al.*, 2008). Los miembros de este género se caracterizan por su capacidad de producir metabolitos secundarios biológicamente activos, incluyendo muchos antibióticos farmacéuticamente importantes y fármacos antitumorales (Berdy, 2005). Estos compuestos probablemente mejoran la capacidad de las especies de *Streptomyces* para sobrevivir en el suelo, el cual es un medio ambiente altamente competitivo. A pesar del gran número de especies que integran el género *Streptomyces*, sólo una pequeña proporción está integrada por patógenos de plantas o animales (Loria *et al.*, 1997).

La sarna de la papa, es una enfermedad causada por un complejo de especies del género *Streptomyces* (Dees & Wanner, 2012), las cuales presentan diferencias en morfología,

fisiología, características moleculares y patogenicidad. Estas han sido caracterizadas y encontradas en diferentes países. A continuación se detallan las características y distribución geográfica de las especies de *Streptomyces* de mayor relevancia que causan sarna en la papa.

Streptomyces scabiei

Es la primera especie descrita como causante de sarna común (sinónimo. *S. scabies*) (Lambert & Loria, 1989a). Está distribuida mundialmente, principalmente en suelos secos de pH neutro a alcalino. Es la especie patógena dominante en los EEUU y es menos frecuente en Europa (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000; Flores-González *et al.*, 2008; Leiminger *et al.*, 2013; Dees *et al.*, 2013). Este patógeno ha sido aislado de rábano, nabo, zanahoria y maní entre otros cultivos. Se caracteriza por poseer esporas grises que forman cadenas en espiral, producir el pigmento melanina en medios que contienen tirosina y utilizar todos los carbohidratos recomendados para la caracterización de especies del género *Streptomyces* por el *International Streptomyces Project* (ISP) (Shirling & Gottlieb, 1966; Lambert & Loria, 1989a).

Streptomyces europaeiscabiei y *Streptomyces stelliscabiei*

Bouček-Mechiche y colaboradores (2000) analizando cepas con características morfológicas y fisiológicas de *S. scabiei*, concluyeron que éstas podían ser divididas en tres especies genómicas diferentes basados en la relación ADN-ADN y la secuencia del gen del ARNr 16S. Estas especies son *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* y *S. stelliscabiei*.

La especie *S. europaeiscabiei* fue descrita en Francia (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000) y ha sido reportada en diferentes países de Europa como Alemania, España, Holanda, Noruega y el Reino Unido, indicando que *S. europaeiscabiei* es la principal especie asociada a la sarna común en Europa (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000; Flores-Gonzalez *et al.*, 2008; Leiminger *et al.*, 2013; Dees *et al.*, 2013). Esta especie bacteriana también fue reportada en

Canadá, Corea y Estados Unidos (Song *et al.*, 2004; Wanner, 2006). Produce esporas de color gris en cadenas espiraladas, es productora de melanina en medios con tirosina y utiliza todos los carbohidratos del ISP. Es sensible a 20µg de estreptomicina y crece en medio conteniendo 0.5 µg/mL de cristal violeta. Esta especie también ha sido aislada de zanahoria y boniato (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000).

La especie *S. stelliscabiei* ha sido reportada en Francia, Estados Unidos y Alemania (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000; Wanner, 2006; Leiminger *et al.*, 2013). Posee características fenotípicas muy similares a *S. europaeiscabiei*, se diferencian en que *S. stelliscabiei* no asimila 1-o-metil-galactopiranosido y 5-ceto-d-gluconato (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000).

Streptomyces acidiscabies

Descrita por Lambert y Loria (1989b), esta especie bacteriana tiene como característica principal su crecimiento en sustratos con pH por debajo de 5.2 causando sarna en tubérculos cultivados en suelos ácidos. La sarna ácida causada por *S. acidiscabies* fue reportada por primera vez en Maine (EE.UU) 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.

Estudios recientes demostraron que *S. acidiscabies* es la especie dominante en Corea (Mun *et al.*, 2007). También fue descrita en China, Japón, América del Norte, Reino Unido, Alemania y Uruguay (Lambert & Loria, 1989b; Song *et al.*, 2004; St-Onge *et al.*, 2008; Thwaites *et al.*, 2010; Tóth *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2010; Leiminger *et al.*, 2013; Lapaz *et al.*, 2012). Se caracteriza por la producción de esporas de color blanco a rosa que se agrupan formando cadenas flexuosas, no produce melanina en medios con tirosina y utiliza todos los carbohidratos del ISP excepto la rafinosa (Lambert & Loria, 1989b). Produce un pigmento difusible sensible al pH color rojo o amarillo (Loria *et al.*, 1997).

Streptomyces turgidiscabies

Esta especie se reportó en la isla de Hokkaio (Japón) en 1995 y fue descrita posteriormente por Miyajima y colaboradores (1998). También ha sido reportado en Finlandia, Corea, Suecia, América del Norte y Alemania (Lindholm *et al.*, 1997; Lehtonen *et al.*, 2004; Wanner, 2009; Leiminger *et al.*, 2013). 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). Se caracteriza por tener esporas grises que forman cadenas flexuosas. No produce pigmentos melanoideos, ni otros pigmentos difusibles y utiliza todos los carbohidratos recomendados por el ISP. Como *S. acidiscabies*, esta especie es tolerante a condiciones de pH ácido (Miyajima *et al.*, 1998).

Streptomyces luridiscabiei, *S. puniscabiei* y *S. niveiscabiei*

Park y colaboradores (2003b) mediante el secuenciado de la región espaciadora 16S-23S y la hibridación ADN-ADN caracterizaron tres nuevas especies de *Streptomyces*, aislados en Corea. Estas indujeron síntomas elevados en papas cultivadas en suelos ácidos. *S. luridiscabiei* posee esporas blancas-amarillas en cadenas flexuosas y rectas; *S. puniscabiei* produce esporas púrpuras-rojas, en cadenas rectas y *S. niveiscabiei* produce esporas blancas en cadenas flexuosas y rectas. Estas especies utilizan todos los carbohidratos del ISP. Sólo la especie *S. niveiscabiei* no produce melanina.

Streptomyces reticuliscabiei

Esta especie fue aislada de sarna reticulada en Francia y descrita por Bouček-Méchiche y colaboradores (2000). *S. reticuliscabiei* posee cadenas de esporas flexuosas con coloración gris y no produce melanina en medios con tirosina. Utiliza todos los carbohidratos del ISP como fuente de carbono.

Streptomyces caviscabies

S. caviscabies fue observada por Faucher y colaboradores (1992) y Faucher y colaboradores (1995), causando síntomas profundos en la región de Quebec, Canadá. Fue caracterizada y se describió por Goyer y colaboradores (1996). Posee esporas blancas formando cadenas flexuosas, no produce melanina, no crece a un pH de 4.5 y utiliza sólo rafinosa como fuente de carbono, de acuerdo con el ISP.

Además de las especies descritas anteriormente, recientemente se han identificado en América del Norte los grupos *Streptomyces sp. IdahoX* y *S. sp. DS3024* que causan sarna en la papa (Wanner, 2007b; Hao et al., 2009).

Streptomyces ipomoeae

Esta especie causa sarna en el boniato en América de Norte y fue descrita por Person y Martin (1940). *S. ipomoeae* utiliza todos los carbohidratos del ISP menos el ácido galacturónico. Produce esporas azules-verdes en medio de cultivo SGM formando cadenas en espiral (Loria et al., 1997).

***Streptomyces* spp. : Taxonomía y Clasificación**

El género *Streptomyces* es uno de los taxones más extensos y diversos dentro de las bacterias. Su taxonomía ha sufrido una sobreespeciación, en particular, debido a que las cepas productoras de compuestos antibióticos novedosos se describen como nuevas especies y son patentadas como parte del proceso de descubrimiento de antibióticos (Laskaris et al., 2012). La caracterización de aislados de *Streptomyces* puede ser realizada en base a pruebas fenotípicas y bioquímicas (Faucher et al., 1995). Sin embargo, para estas pruebas se utilizan técnicas elaboradas que demandan largos periodos de tiempo y no siempre es posible determinar con precisión la especie. Los métodos moleculares

basados en el análisis de secuencias de ADN se llevan a cabo en menos tiempo y ofrecen una mayor precisión y sensibilidad en la identificación de microorganismos en comparación con los métodos convencionales de análisis de caracteres fenotípicos. Varias técnicas moleculares están siendo utilizadas para la taxonomía y caracterización de especies de *Streptomyces* causantes de sarna. El "estándar de oro" para la definición de especies bacterianas es la hibridación ADN-ADN (Bouchek-Méchiche *et al.*, 2000), pero dado que es muy laborioso, para estudios de un gran número de cepas se utiliza la secuencia del gen del ARNr 16S que es más sencilla y rápida. Sin embargo, este gen tiene una alta similitud de secuencia entre las especies del género *Streptomyces*, por lo cual no permite una buena resolución taxonómica a nivel de especie (Labeda, 2011; Song *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2008). Otro método alternativo usado para la identificación de especies en este género ha sido la secuenciación de la región espaciadora intergénica 16S-23S la cual fue evaluada como marcador molecular para el análisis filogenético de cepas de *Streptomyces* causantes de sarna en la papa aisladas en Corea (Song *et al.*, 2004). No obstante, esta técnica no permitió discriminar entre las principales especies. También se han utilizado otras técnicas como la amplificación de ADN polimórfico al azar y el secuenciado de genes codificadores de proteínas tales como *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa) o *trpB* (cadena β de la triptófano sintasa). Recientemente se ha demostrado que la técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) permite resolver la filogenia de linajes estrechamente relacionados, demostrando alta eficacia de resolución inter e intraespecífica (Guo *et al.*, 2008). Esta técnica fue propuesta en 1998 como una herramienta alternativa en los estudios de sistemática microbiana y consiste en el secuenciamiento y análisis de fragmentos de 5 a 7 genes conservados (generalmente *housekeeping*), espaciados a lo largo del genoma bacteriano por lo menos 100 kilobases (Kb) de distancia (Maiden *et al.*, 1998). Los datos obtenidos a partir del MLST son de gran utilidad en la identificación y clasificación de microorganismos, en las investigaciones epidemiológicas a diferentes escalas y en los estudios de biología poblacional, patogenicidad y evolución de bacterias, principalmente patógenos humanos (Maiden, 2006; Spratt, 1999). La ventaja aportada por esta estrategia

es que las diferencias entre las cepas se registran directamente en secuencias de ADN, las cuales están disponibles en bases de datos de dominio público para ser comparadas con facilidad. Una variación de la técnica de MLST, es el método *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA), empleado para la identificación de especies de microorganismos. La técnica MLSA se utilizó en el estudio de filogenia de *Streptomyces griseus* basándose en las secuencias de los genes *atpD* (cadena β de la ATP sintasa), *gyrB* (gen estructural de la subunidad B de la ADN girasa), *recA* (recombinasa A), *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa), *trpB* (subunidad B de la triptófano sintasa) y el gen del ARNr 16S (Guo *et al.*, 2008). Estos genes, a pesar de que están conservados evolutivamente, exhibieron un número alto de sitios polimórficos, lo que permitió la identificación de las diferentes especies bacterianas. Algunos de estos genes también han sido utilizados individualmente para análisis filogenéticos del género *Streptomyces* como *trpB* (Egan *et al.*, 2001), *gyrB* (Hatano *et al.*, 2003) y *rpoB* (Kim *et al.*, 2004). El gen *rpoB* se utilizó por St-Onge y colaboradores (2008) y posibilitó la diferenciación de especies de *Streptomyces* asociados a sarna en la papa.

Los métodos de identificación para el género *Streptomyces* nombrados anteriormente están siendo sustituidos por el MLSA debido a que se ha demostrado que éste método ofrece una buena resolución para discriminar a nivel de especies en este género (Laskaris *et al.*, 2012; Labeda, 2011). Una razón para esto, es que el uso de múltiples secuencias ayuda a amortiguar las distorsiones generadas por recombinación en la filogenia. Actualmente se cuenta con un método de MLSA para el género *Streptomyces* que contiene cuatro de los seis genes utilizados por Guo y colaboradores (2008) (*atpD*, *recA*, *rpoB* y *trpB*). El gen *gyrB* fue descartado debido a qué se observó que el genoma de *Streptomyces scabiei* 87.22 posee dos copias del operón *gyrB* (una degenerada) (Labeda, 2011). El gen del ARNr 16S también fue descartado debido a que se encuentra en múltiples copias en el genoma y, aunque es raro, se han reportado cepas de *Streptomyces* que poseen secuencias del gen del ARNr 16S heterogénicas (Ueda *et al.*, 1999). Sin embargo, mediante el análisis de estos cuatro genes concatenados aún hay especies de *Streptomyces* fitopatógenas que no se pueden diferenciar entre sí (Labeda, 2011).

Patogenicidad en *Streptomyces*

Mecanismos de Virulencia

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

La patogenicidad en planta de *Streptomyces* está asociada a la producción de la toxina taxtomina, la cual es el único determinante de patogenicidad conocido para la SC (Bignell *et al.*, 2010; Dees & Wanner, 2012). Las taxtominas son dipéptidos cíclicos derivados de L-fenilalanina y L-triptófano. Contienen una fracción de 4-nitroindol esencial para su fitotoxicidad y son esenciales para la inducción de los síntomas característicos de la SC en los tubérculos de papa (King & Calhoun, 2009). La principal toxina taxtomina A purificada inoculada en tubérculos de papa inmaduros, reproduce lesiones necróticas similares a las características de SC (Lawrence *et al.*, 1990). La delección de genes biosintéticos de la taxtomina, resulta en la pérdida de la patogenicidad en la papa (Healy *et al.*, 2000). La diferente producción de taxtomina por algunas cepas explicaría variaciones en los síntomas de SC (Hiltunen *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la taxtomina A es sintetizada por *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* y *S. niveiscabiei* (Healy *et al.*, 2000; King *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2003b). 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). Todas las cepas patógenas poseen los genes de biosíntesis de la taxtomina organizados de forma similar, estos, como los otros genes asociados a patogenicidad, se encuentran en una isla de patogenicidad (IPA) que es muy grande en *S. turgidiscabies* (Kers *et al.*, 2005). Los genes *txtAB* que codifican para taxtomina sintetasa se encuentran cercanos a otros genes necesarios para la producción de la taxtomina, incluyendo el gen que codifica una monooxigenasa P450 *txtC*, una sintasa

de óxido nítrico (NOS/txtD), y un gen para una segunda P450 monooxigenasa (*txtE*). Un gen regulador AraC/tipo XylS y un gen *txtR* que controla la transcripción de la agrupación (Joshi *et al.*, 2007b).

Se han reportado algunos casos de cepas patógenas de *Streptomyces* carentes de genes para la biosíntesis de la taxtomina (Wanner, 2004; Park *et al.*, 2003a; Pánková *et al.*, 2012). Bignell y colaboradores (2014) sugieren que existen múltiples metabolitos secundarios fitotóxicos que estarían jugando un rol en el fenotipo patogénico de *Streptomyces* spp. en el medio ambiente y que no siempre las taxtominas estarían participando en el desarrollo de la enfermedad de la SC.

❖ Más allá de la taxtomina

Aún no se ha demostrado otro factor determinante de la patogenicidad en *S. scabiei* o en especies relacionadas, además de la taxtomina, varios genes localizados en el fragmento de 674 Kb en la IPA de *S. turgidiscabies* y en múltiples "islotos de patogenicidad" en *S. scabiei*, están implicados en la codificación de posibles factores de patogenicidad (Huguet-Tapia *et al.*, 2011; Kers *et al.*, 2005). Los genes relacionados con la virulencia *nec1* y *tomA* están presentes en muchas cepas de *Streptomyces* que inducen la SC, pero no en todas, y se ha demostrado que no son esenciales para la patogenicidad (Seipke & Loria, 2008; Wanner, 2009). El gen *nec1* codifica una proteína que induce la necrosis en el tejido vegetal (Bukhalid & Loria, 1997) que se especula es requerida por el patógeno para la colonización de la planta huésped suprimiendo las respuestas de defensa durante la infección (Bukhalid & Loria, 1997; Joshi *et al.*, 2007a). El contenido de GC del gen *nec1* es atípico en relación a las regiones codificantes características, lo que sugiere que fue adquirido a través de transferencia horizontal (Bukhalid *et al.*, 1998).

La proteína que codifica el gen *tomA* es miembro de la familia de las 10 glicosil hidrolasas y contiene un péptido señal de secreción (Seipke & Loria, 2008). Las saponina glicosil hidrolasas detoxifican fitoanticipinas, compuestos antimicrobianos producidos por las

plantas como defensa contra patógenos (Vanetten *et al.*, 1994). Genes que codifican para glicosil hidrolasas se han encontrado en hongos patógenos de plantas asociados a las interacciones planta-microorganismo (Bouarab *et al.*, 2002; Bowyer *et al.*, 1995). Además, un homólogo *tomA* está presente en la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis subespecie michiganensis* causante de la marchitez bacteriana y cancro del tomate (Kaup *et al.*, 2005). Sin embargo, un mutante *tomA* en *S. scabiei*, no se vio afectado en la virulencia (Seipke & Loria, 2008) y la conservación de este gen en especies de *Streptomyces* patógenos sugiere un papel en la interacción planta-patógeno (Kers *et al.*, 2005).

Existen otros genes en la secuencia del genoma de *S. scabiei* y *S. turgidiscabies* que podrían desempeñar un papel en la patogenicidad/agresividad. Estos incluyen: (a) el grupo de genes para la producción de ácido coronafácico, similar a un grupo de genes que se encuentran en fitopatógenos Gram-negativos; (b) gen de la cutinasa; (c) dos genes en *S. scabiei* (CS76661 y CS90061) que codifican expansinas; (d) genes homólogos a *iaaH* (indol-3-acetimide hidrolasa) e *iaaM* (triptófano-2-monooxigenasa) para la producción de fitohormona IAA; y (e) una versión microbiana de la enzima formadora de etileno (Bignell *et al.*, 2010). Otro interesante operón presente en IPA de *S. turgidiscabies* (pero no en *S. scabiei*) es el operón *fas*, que produce la fitohormona citoquinina (Huguet-Tapia *et al.*, 2011; Joshi & Loria, 2007). Los genes que participan en la diferenciación morfológica, el desarrollo del micelio aéreo y la esporulación, pueden desempeñar un rol en la patogenicidad ya que se requiere la expresión de estos genes para la iniciación de la síntesis de antibióticos y otros productos secundarios en un número de especies de *Streptomyces* (Flärdh & Buttner, 2009). A pesar de la ubicación en las IPAs o islotes de estos genes, hasta el momento no se ha demostrado que los genes antes mencionados tengan un rol en la formación o profundización de las lesiones de SC en papa (Bignell *et al.*, 2010).

Una Isla de patogenicidad (IPA) en *Streptomyces*

La sarna de la papa adquirió relevancia mundial en los últimos años por la aparición de cepas patógenas emergentes. Esto se ha asociado a la capacidad de este género para la transferencia horizontal de genes de patogenicidad, ubicados dentro de islas genómicas (IGAs) (Kers *et al.*, 2005). La transferencia horizontal de genes es un mecanismo importante en la evolución de los genomas microbianos. Las islas de patogenicidad (IPAs) son elementos genéticos móviles que contribuyen a rápidos cambios en el potencial de virulencia y han contribuido a la evolución del genoma por transferencia horizontal de genes (THG) en varios patógenos bacterianos. Las IPAs contienen uno o más genes asociados con la virulencia, un contenido de GC que difiere del resto del cromosoma, se asocian comúnmente con los genes de ARNt y frecuentemente están flanqueadas por secuencias repetidas. Algunas IGAs exhiben características de Elementos de Conjugación Integrativa (ECIs) (Dobrindt *et al.*, 2004). Estos elementos genéticos son principalmente estructuras circulares, y muy pocos tienen propiedades de auto-replicación (Grohmann, 2010). Los ECIs se mueven por conjugación desde un donante a un receptor y se integran en lugares específicos en el cromosoma.

La patogenicidad en las especies de *Streptomyces* está asociada a una isla de patogenicidad (IPAS_t) móvil descrita en *S. turgidiscabies* *car8* (Figura 1.4), la primer IPA descrita en una bacteria Gram-positiva fitopatógena (Kers *et al.*, 2005).

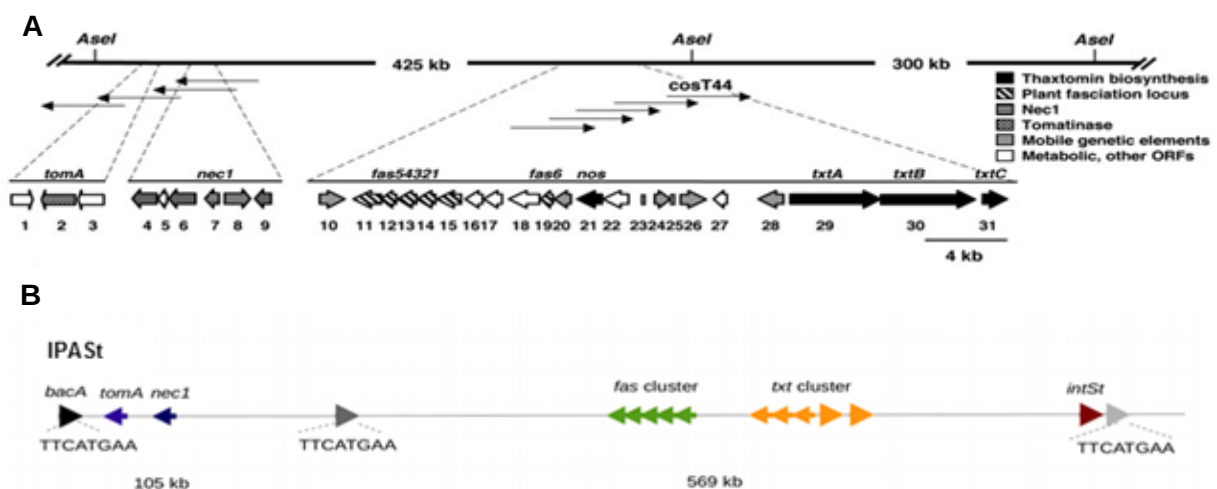


Figura 1.4. A. Organización genética del loci de virulencia en *S. turgidiscabies*. Extraído de Bignell *et al.*, 2010. B. Representación esquemática de la IPAS_t en *S. turgidiscabies* Car8. Extraído de Huguet-Tapia y colaboradores (2014) con modificaciones.

Estudios previos revelaron que la IPAS_t es una gran isla genómica de 674 Kb, con características típicas de los ECI (Huguet-Tapia *et al.*, 2011; Kers *et al.*, 2005). La isla genómica está flanqueada por dos palíndromos de 8 pb (TTCATGAA). Uno de ellos (attL) se encuentra en el extremo 3' del gen de resistencia a la bacitracina *bacA* y el otro (attR) está situado dentro de una duplicación de 141 pb del extremo 3' de *bacA*. La IPAS_t también contiene un palíndromo interno de 8 pb situado dentro de una tercera copia del extremo 3' de *bacA* (attI). La distribución de los sitios att en la IPAS_t divide el elemento en dos módulos de tamaños diferentes. El primer módulo de 105 Kb codifica una tomatinasa (*tomA*) y una proteína necrogénica (*nec1*); ambas son proteínas secretadas implicadas en la virulencia (Seipke & Loria, 2008; Bukhalid *et al.*, 1998). El segundo módulo de 569 Kb contiene la ruta biosintética de la fitotoxina taxtomina (txt) (Loria *et al.*, 2008), genes de biosíntesis de una citoquinina codificados por el operón (FAS) (Joshi & Loria, 2007), y una tirosina recombinasa (Intst) (Huguet-Tapia *et al.*, 2014). La IPAS_t puede movilizarse desde *S. turgidiscabies* e integrarse dentro del cromosoma de cepas no patógenas tales como *S. coelicolor*, *S. diastochromogenes* y *S. lividans* durante el apareamiento (Kers *et al.*, 2005). En algunos casos, tal integración transfiere el fenotipo patógeno. La integración de la IPAS_t en otras especies de *Streptomyces* ocurre mediante la recombinación sitio específica en la secuencia palindrómica TTCATGAA localizada dentro del extremo 3' del gen *bacA* en las cepas receptoras. La distribución de los sitios att dentro de la IPAS_t, la presencia de la Intst y la evidencia de la transferencia parcial de la isla a nuevos huéspedes sugiere que el IPAS_t puede transferirse en forma de módulos. Los transconjugantes pueden contener la secuencia completa 674 Kb de la IPAS_t o el módulo de 105 Kb, integrado en el cromosoma. Análisis comparativos de los homólogos de la IPAS_t en *Streptomyces scabies* 87-22 y *Streptomyces acidiscabies* 84-104 indican que estas islas han sido fijadas por cambios (erosión) en la secuencia de la Intst y los sitios de recombinación. Se cree que la IPAS_t es una estructura dinámica capaz de escindir, movilizar, y capturar ADN. Estas características afectan la evolución del genoma de *S. turgidiscabies* y la presencia de una isla modular puede proporcionar una ventaja evolutiva. La producción de algunos metabolitos asociados

con la virulencia puede ser metabólicamente costosa pero necesaria en ciertas condiciones en la interacción con la planta. La escisión iterativa de uno de estos módulos y su integración en la cepa huésped puede facilitar la adaptación de su metabolismo a los estilos de vida saprofitos y patógenos. La ausencia de la integrasa (Intst) en cepas de *S. scabiei* y *S. acidiscabies* aisladas de diferentes lugares sugiere que la integrasa y la erosión del sitio att son procesos generalizados en estas especies (Huguet-Tapia *et al.*, 2014). La transferencia horizontal de esta isla de patogenicidad entre bacterias del género *Streptomyces* sugiere la posibilidad de aparición de nuevas especies patógenas (Wanner, 2009). Sin embargo, dado que la patogenicidad es un fenotipo muy raro entre *Streptomyces*, la movilización de la IPA sería un evento poco frecuente en la naturaleza o la adquisición del IPA conferiría un fenotipo de patogenicidad en sólo una pequeña proporción de los beneficiarios (Kers *et al.*, 2005).

Mediante estudios de Microarrays y secuenciado completo de la IPA conservadas en *S. scabiei*, *S. acidiscabies* y en diferentes cepas de *S. turgidiscabies*, se ha observado una gran diversidad genética entre especies y cepas de la misma especie. Se ha determinado la presencia de genes previamente caracterizados y genes candidatos de virulencia en esta IPA (Huguet-Tapia *et al.*, 2011; Aittamaa *et al.*, 2010; Huguet-Tapia *et al.*, 2014). La diversidad de islas genómicas en *Streptomyces* patógenos es aún un tema que requiere de investigación debido a que todavía no hay mucha información del estatus de otras islas u otros aislamientos (Huguet-Tapia *et al.*, 2014).

La evaluación de la presencia de genes de patogenicidad presentes en la isla de patogenicidad, principalmente el operón *txtAB*, los genes *nec1* y *tomA* se ha utilizado para la caracterización de *Streptomyces* patógenos, diferenciando las cepas patógenas de las saprofitas presentes en las lesiones de sarna. Diferentes estudios han demostrado una correlación entre la patogenicidad de *Streptomyces* spp. y la detección de genes de patogenicidad, especialmente los relacionados con la biosíntesis de la taxtomina y la proteína necrogénica Nec1 (Bukhalid *et al.*, 1998; Wanner, 2006). Por lo tanto, la amplificación por PCR de genes de patogenicidad puede utilizarse como una herramienta

adicional para la caracterización y detección de *Streptomyces* patógenos causantes de sarna común, sustituyendo en algunos casos las pruebas de patogenicidad (Cullen & Lees, 2007).

Ciclo de la enfermedad

La infección 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 (Bignell *et al.*, 2010).

Las especies de *Streptomyces* saprofitos sobreviven en el suelo o en tejidos vegetales infectados en forma de micelio vegetativo o esporas. Las esporas de *S. scabiei* pueden sobrevivir hasta 20 años en suelos secos mientras que las hifas no son tolerantes a la alta humedad del suelo. *S. scabiei* invade los tejidos de los tubérculos a nivel de campo, siendo el suelo la principal fuente de inóculo (Cancino, 2003). Las esporas germinan y pueden ser propagadas por la lluvia, el viento, vectores, tierra adherida a herramientas o a través de papas semilla contaminadas (Lehtonen *et al.*, 2004). Respecto a la influencia de los vectores en la epidemiología de la sarna en la papa, algunos insectos pueden propagar las bacterias en el suelo, así como promover la entrada de la enfermedad en el tubérculo. El inóculo contenido en la papa semilla no solo contribuye a la dispersión de la enfermedad, sino que introduce el patógeno a nuevas áreas (Wilson *et al.*, 1999).

La invasión del patógeno en los tejidos se produce a través de lenticelas, heridas, estomas y, en tubérculos jóvenes, directamente. Desde el inicio de la tuberización, los tejidos del tubérculo se encuentran sometidos a un proceso de crecimiento continuo. Es este periodo el de mayor susceptibilidad del tubérculo a la infección por *Streptomyces*, ya que las lenticelas jóvenes no están completamente suberizadas. Por otro lado, los tubérculos maduros se vuelven resistentes a la infección debido a que las lenticelas están totalmente suberizadas (Adams & Lapwood, 1978).

Después de la penetración, el patógeno coloniza inicialmente los espacios intercelulares y poco después los intracelulares. La bacteria crece entre las capas de la peridermis, nutriéndose del tejido muerto (Agrios, 2005) y produce fitotoxinas, como taxtomina, que inducen la producción de suberina en las células adyacentes, lo que conduce a la formación de una capa de corcho alrededor del tejido infectado. El sector afectado es empujado sobre la superficie del tubérculo, formando superficies ásperas y suberizadas (síntoma de la sarna), permitiendo a su vez la diseminación del patógeno hacia células vecinas (Babcock *et al.*, 1993; Agrios, 2005). Estas capas de células corchosas no solo inhiben el avance del patógeno sobre las células sanas, 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). El desarrollo de la enfermedad se produce durante el periodo de crecimiento del tubérculo, entre las 6 a 8 semanas de su formación (Agrios, 2005; Loria *et al.*, 1997) (Figura 1.5).

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). Inicialmente las lesiones son pequeñas (5-8 mm) y superficiales, pero a medida que el agente patógeno coloniza 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). En lesiones superficiales la peridermis del tubérculo se mantiene intacta. Pero en lesiones más profundas, la peridermis del tubérculo se rompe y se forman hasta tres capas de "corcho" (Gouws, 2006).

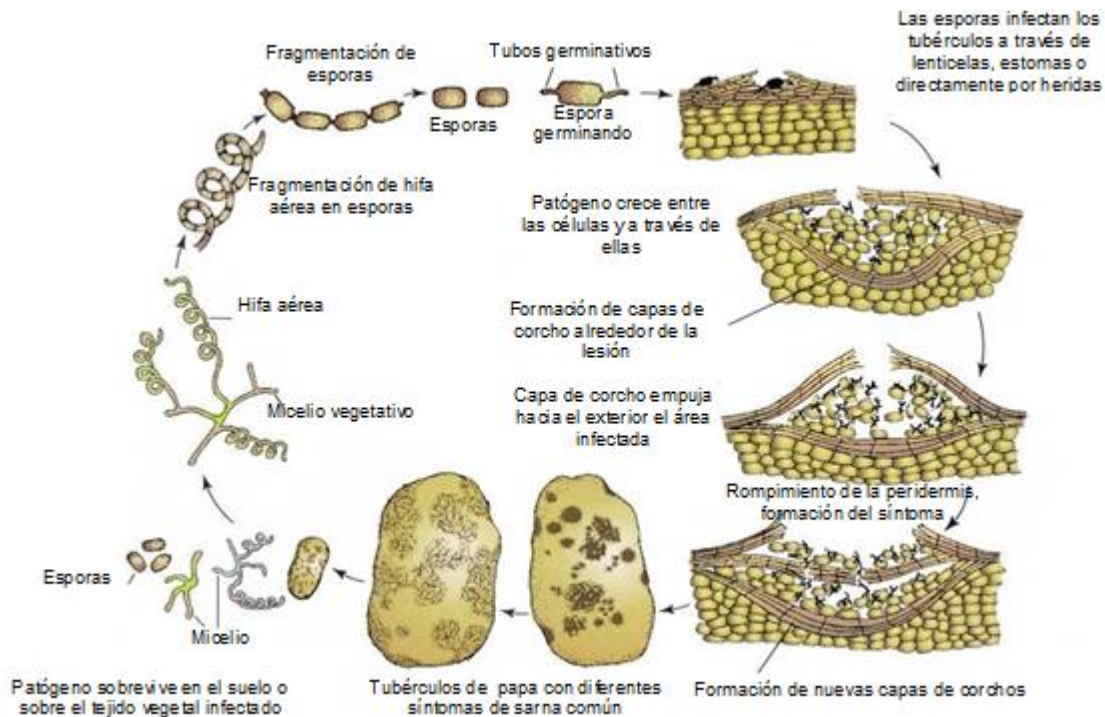


Figura 1.5. Ciclo de la enfermedad de sarna común causada por *S. scabiei*. Extraído de Agrios, 2005.

Control de sarna en la papa

Aunque la sarna común de la papa fue descrita por primera vez hace más de 100 años (Loria *et al.*, 1997), los científicos aún tienen poca comprensión sobre los factores que contribuyen a la aparición y gravedad de la enfermedad. Con respecto al patógeno, es necesario profundizar el conocimiento sobre la diversidad genética y las bases genéticas que permiten las diferencias de agresividad entre aislamientos, lo cual es un obstáculo para el desarrollo de estrategias de control. Conocer la diversidad del patógeno es esencial para la selección del germoplasma resistente a sarna común. Con respecto a la planta, es necesario conocer sobre las bases fisiológicas o genéticas implicadas en las diferencias de severidad de la SC en diferentes cultivares de papa. Aún la fuente de resistencia a sarna

común no ha sido identificada (Agrios, 2005; Hosaka *et al.*, 2000; Powelson *et al.*, 1993). Las diferencias fisiológicas tales como las propiedades de la piel y la sensibilidad a la taxtomina pueden explicar en parte la susceptibilidad diferencial de los cultivares. Es necesaria más investigación sobre los mecanismos de resistencia/susceptibilidad a la SC (Dees & Wanner, 2012). Los factores ambientales, tales como el pH, humedad y la flora microbiana del suelo, en combinación con el cultivar de papa y la virulencia del patógeno, hacen que el manejo de la SC sea una tarea difícil. Diferentes métodos utilizados para controlar la SC se resumen a continuación:

Uso de cultivares resistentes

El método más conveniente para controlar la SC, es utilizar cultivares de papa resistentes a la enfermedad, los cuales evitan o reducen el uso de pesticidas, minimizando el impacto ambiental y el costo de producción. Desafortunadamente, en la actualidad no hay cultivares completamente resistentes y los comercialmente disponibles tienen distintos grados de resistencia o tolerancia a la SC. El mecanismo y la genética de la tolerancia para la SC aún no son entendidos. Aunque varios estudios genéticos se han publicado concluyendo que uno o pocos genes son responsables de la resistencia a SC en las poblaciones de papas haploides o diploides (Cipar & Lawrence 1972; Murphy *et al.*, 1995), esto no parece ser el caso para cultivares de papa (tetraploide) (Goth *et al.*, 1993; Haynes *et al.*, 2010). La variación casi continua en la severidad de los síntomas SC entre una selección aleatoria de cultivares de papa comerciales y líneas de mejoramiento, sugieren fuertemente que varios genes están involucrados (Driscoll *et al.*, 2009). Es necesario a corto plazo, contar con un fenotipo de papa resistente a SC con el fin de comprender la genética subyacente. La ausencia de un cultivar de este tipo es un obstáculo importante en las pruebas fenotípicas para la resistencia de SC. Recientemente, Wilson y sus colegas utilizaron células somáticas seleccionadas frente a taxtomina A para aislar variantes de papa cv. Russet Burbank con fuerte resistencia a la SC (Wilson *et al.*, 2010). Hiltunen y colaboradores (2011) también han

demostrado que la eliminación de la progenie SC-sensible de una población de plantas en un ensayo de mejoramiento se puede lograr usando taxtamina A como un agente selectivo. Los prometedores resultados de estos estudios podrían eliminar años de ensayos de campo en la detección de resistencia y elevar los niveles de resistencia a SC en las variedades generadas por los programas de mejoramiento de papa. Actualmente muchos programas de mejoramiento genético de papa, poseen germoplasmas que son significativamente más resistentes a la SC que los cultivares antiguos (Douches *et al.*, 2001; Haynes *et al.*, 2010). Parte de la resistencia a la SC ha sido introducida desde especies silvestres, con potencial para proporcionar nuevos genes de resistencia a la SC (Hosaka *et al.*, 2000).

Control Químico

La fumigación del suelo y el uso de variedades de papa resistentes siguen siendo el principal medio para el control de las plagas y enfermedades de plantas, incluyendo SC. La fumigación es cada vez más limitada por el aumento de los costos, la urbanización y sus impactos ambientales negativos. Los agentes químicos de control en suelo son caros y poco amigables con el medio ambiente, cada vez están siendo más regulados o retirados del mercado. El fumigante de suelo que se utiliza en el cultivo de papa, pentacloronitrobenzeno, también conocido como Blocker® (AMVAC), ha sido probado con cierto éxito (Davis *et al.*, 1976; Hutchinson, 2005). Pic-plus (cloropicrina más un solvente) ha demostrado cierta eficacia contra la SC en los ensayos en Michigan, Ontario, y Florida (Hutchinson, 2005). Los requisitos para su aplicación; temperaturas del suelo mínimas superiores a 7°C y 30 días post-plantación, limitan su uso en zonas más frías. Por otro lado es cara, y los efectos parecen durar una sola temporada (Dees & Wanner, 2012). Por otra parte, los fertilizantes de azufre proporcionan cierta mitigación contra la SC, alterando el pH del suelo y las comunidades microbianas (Davis *et al.*, 1974; Pavlista, 2005).

Mantenimiento de la humedad del suelo

La alta humedad del suelo desfavorece la enfermedad debido a que el patógeno se desarrolla mejor en suelos porosos y aireados que en suelos anegados. Sin embargo, se han reportado datos contradictorios para esta estrategia. Por ejemplo, Lapwood y colaboradores mostraron que el riego durante el inicio de la formación del tubérculo disminuyó la SC en cultivares de papa susceptibles (Lapwood *et al.*, 1973). Por otro lado Larkin y colaboradores (2011) encontró que la irrigación aumentó la SC, mientras que ha sido reportado que *S. turgidiscabies* tolera niveles altos de humedad. A pesar de las disparidades en los resultados de un año a otro, el riego es considerado una herramienta útil para el control de la SC, particularmente, en combinación con otras estrategias de control.

Acidificación del suelo

El uso de fertilizantes nitrogenados en forma de sulfato de amonio disminuye el pH del suelo y desfavorece la ocurrencia de *S. scabiei* y otras especies de *Streptomyces*. Sin embargo, las especies emergentes tales como *S. acidiscabies* y *S. turgidiscabies* toleran un pH inferior a 5 (Lambert & Loria, 1989b; Lindholm *et al.*, 1997). Por otro lado, esta práctica puede conducir a la reducción de la producción de la papa, ya que los nutrientes del suelo están más disponibles a pH más alto (cerca de 6.5) y también limita las especies de plantas que se pueden emplear en la rotación de cultivos (Lambert & Loria, 1989a). Se considera que típicamente la SC es inhibida por el pH bajo del suelo (Lacey & Wilson, 2001). Sin embargo, curiosamente, el pH del suelo por encima de 8.5 se ha demostrado que también puede inhibir SC (Waterer, 2002).

Rotación de cultivos

La rotación de cultivos es un factor importante a considerar en la planificación de los cultivos de producción de papa. Esta estrategia no sólo está relacionada con las características fitosanitarias, sino también con la fertilidad y estructura del suelo. La rotación con cereales y gramíneas no hospederos de *Streptomyces*, tales como el arroz y el trigo, por ejemplo, permite la reducción de la población de patógenos y la mayor difusión de oxígeno, también consumida por el sistema de raíces de la papa. Estudios recientes realizados por Larkin y colaboradores (2010) muestran que rotaciones frecuentes de canola y colza, reducen la gravedad de SC. El efecto combinado de canola o colza y la rotación de cultivos de cobertura de centeno de invierno reduce la severidad de la SC en un 20-33% en comparación con el cultivo continuo de papa, sin cultivo de cobertura. Un estudio realizado en el 2005 demostró que las papas plantadas en suelos donde se había cultivado maíz o alfalfa el año anterior tenían menores niveles de SC que las papas cultivadas en un sistema de cultivo de papa continua (Wiggins & Kinkel, 2005).

Es importante destacar que esta medida no siempre es exitosa en el tratamiento de la sarna, porque los patógenos pueden persistir por mucho tiempo en una diversidad de cultivos e incluso en el suelo. Algunos cultivos, como la remolacha, rábano, zanahoria, nabo, repollo, perejil, batata, berenjena y cebolla son considerados hospederos de *Streptomyces* spp. y no deben utilizarse ya que pueden constituir fuentes de inóculo para el cultivo de papa (Correa, 2011).

Control Biológico

El control biológico de la SC ofrece una alternativa atractiva a las estrategias de control clásicas. Especies de *Streptomyces* no patógenas productores de antibióticos y enzimas extracelulares, tienen potencial como agentes de control biológico contra la SC (Doubou et al., 2001), así como de otras enfermedades donde el patógeno se encuentra en el suelo

(Sabaratnam & Traquair, 2002; Xiao *et al.*, 2002). Streptomycetes antagonistas presentes de forma natural en los campos de papa pueden suprimir la SC (Lorang *et al.*, 1995; McQueen *et al.*, 1985). Se han obtenido resultados exitosos utilizando cepas no patógenas de *Streptomyces* en la inhibición de *Streptomyces* patógenos (Liu *et al.*, 1995). Investigaciones recientes indican que especies *Streptomyces* estrechamente relacionadas con las causantes de SC se encuentran en abundancia en la piel de los cultivares SC-resistentes y son más frecuentes en las lesiones menos severas (superficiales) que en las lesiones profundas de SC (Wanner, 2007a). La mayoría de los estudios hasta la fecha se han centrado en los antagonistas de *S. scabiei* (Beauséjour *et al.*, 2003; Lorang *et al.*, 1995) y solo un antagonista contra *S. turgidiscabies* se ha reportado (Hiltunen *et al.*, 2009). Una *Pseudomonas* ha sido asociada recientemente con el control de la SC. Esta *Pseudomonas* produce ácido fenazina-1-carboxílico, conocido por su supresión y efecto antagonista sobre los hongos, pero no conocido previamente por inhibir actinomicetos. Esta cepa de *Pseudomonas* inhibe el crecimiento de *S. scabiei in vitro*, reprime la expresión de *txtA* y *txtC*, y protege contra la SC de la papa en ensayos de invernadero (St-Onge *et al.*, 2011). Se ha demostrado el control de la SC utilizando *Bacillus* sp. *sunhua*, que tiene un efecto supresor sobre la SC y disminuye la tasa de infección del 75% al 35% (Han *et al.*, 2005). También se ha reportado que aislamientos pertenecientes a nueve especies de hongos, en su mayoría ascomicetos, poseen actividad antagónica contra los patógenos de SC de la papa (Tagawa *et al.*, 2010). La actividad antagonista de estos hongos se incrementa en condiciones de pH bajo, lo que sugiere que estos hongos podrían combinarse con los métodos tradicionales, como la acidificación del suelo, para mejorar el control biológico. El uso de bacteriófagos para reducir la infección por *S. scabiei* en tubérculos se ha investigado, pero aún el trabajo es incipiente para su utilización como agentes de control biológico en el campo (Goyer, 2005; McKenna *et al.*, 2001).

Antecedentes de sarna en la papa en Uruguay

En Uruguay hasta el año 2007, la enfermedad sarna común no había sido un problema para la producción ya que hasta ese momento se habían observado solo síntomas leves (lesiones superficiales), por lo que la papa podía ser comercializada sin problemas. Sin embargo, desde entonces se han suscitado diversos problemas asociados a la importación de papa semilla. Aproximadamente el 30% de la papa semilla utilizada para la producción de papa en Uruguay es importada. Por otra parte, el control fitosanitario de la papa-semilla con respecto a la sarna es visual, permitiéndose la entrada de hasta el 2% de semilla con ataque severo, 5% de moderado y 20% de leve, teniendo en cuenta la cantidad de muestra analizada (INASE, 2010). Esto significa que aun cumpliéndose las exigencias del control, es posible el ingreso y dispersión de patógenos de sarna común.

La zafra en la cual hubo mayores pérdidas a causa de esta enfermedad, fue la del otoño de 2010 (Grela *et al.*, 2010). En esa ocasión, de 3202 hectáreas que se plantaron en el país (DIEA & MGAP, 2010), unas mil hectáreas presentaron serios problemas de descarte de tubérculos de papa por presencia de síntomas muy severos de sarna común. 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 la característica de la sarna común observada 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 además esporulación y presencia de micelio blanquecino que, confluían cubriendo gran parte del tubérculo haciéndolo no apto para el comercio ni para su uso como semilla. Lo anteriormente descrito evidenció 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, no se correspondía con las condiciones más favorables para el desarrollo de *Streptomyces scabiei*, patógeno distribuido mundialmente.

Lo antes expuesto llevó a considerar la posibilidad de estar ante un nuevo patógeno. Además, esta situación dejó en evidencia el desconocimiento que existía respecto al tema sarna de la papa en nuestro país y en particular, de las cepas de *Streptomyces* patógenas que podrían estar presentes. Respondiendo a la preocupación de los productores, se elaboró un proyecto presentado al Programa CSIC-UdelaR que fue aprobado y ejecutado (2011-2013). Como resultado de mi tesina de grado poseíamos una colección de unas 42 cepas de *Streptomyces* spp. aisladas a partir de tubérculos con síntomas, las cuales fueron parcialmente identificadas mediante técnicas clásicas y moleculares. 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 representó el primer reporte de este patógeno en Uruguay (Lapaz *et al.*, 2012).

Hasta el inicio de este trabajo poco se sabía respecto a la sarna de papa en nuestro país, en particular, sobre la epidemiología de esta enfermedad en las diferentes regiones productoras. En este sentido, los resultados obtenidos sobre identificación y caracterización de cepas de *Streptomyces* patógenos de papa en Uruguay contribuirán a la implementación de mejores métodos de manejo de la enfermedad con el fin de garantizar una mayor producción. También serán un importante insumo en los programas de mejoramiento genético de variedades de papa, de forma de conocer el grado de resistencia/susceptibilidad de los cultivares a las cepas patógenas presentes, así como en estudios epidemiológicos.

JUSTIFICACIÓN

La papa es uno de los principales alimentos consumidos en Uruguay y el primer cultivo hortícola en superficie cultivada. La producción total es de 109 a 150 mil toneladas anuales. Durante las últimas zafras de papa en Uruguay, se han observado pérdidas significativas de tubérculos por la presencia de sarna común, provocando disminución de la calidad y por consiguiente, pérdidas económicas muy importantes para los productores. Debido a que las bacterias del género *Streptomyces* son saprofitas y capaces de sobrevivir en el suelo la situación se agrava más, ya que en los suelos en donde el patógeno ha estado presente no se podría recultivar con papa.

En los últimos años se ha enfocado la atención sobre diversos aspectos de la sarna común, incluyendo las especies patógenas y su distribución, los métodos de detección, patogenicidad y mecanismos de interacción entre la bacteria y la planta. Sin embargo, todavía no existen métodos totalmente eficaces para el control de esta enfermedad. Los cultivares de papa resistentes serían el mejor y más deseable método de control, pero aún no hay cultivares comercialmente disponibles completamente resistentes. En tanto la sarna común conduce a la disminución del valor de mercado por la deteriorada apariencia de los tubérculos infectados, esta enfermedad sigue siendo un problema de importancia mundial.

La investigación reciente se ha centrado en dos áreas: (1) el conocimiento del patógeno, su distribución, y determinación de las circunstancias en que se produce la enfermedad, y (2) desarrollo de cultivares resistentes. Los factores que han obstaculizado el desarrollo de cultivares resistentes incluyen las variables en las condiciones ambientales, la necesidad de mejores fuentes de resistencia (en *Solanum. tuberosum*) y la variación genética en las poblaciones de patógenos. Por estas razones, las medidas de control tradicionales son insuficientes y a menudo fracasan. El uso integrado de los métodos disponibles, especialmente la plantación de variedades con la mejor resistencia a los patógenos presentes en la región, es actualmente la mejor opción para el control. Para ello es indispensable conocer cuáles son las especies patógenas presentes en el país de interés

(Dees & Wanner, 2012). El objetivo de nuestro proyecto es la generación de conocimiento en el tema, en particular, determinar cuáles son las especies de *Streptomyces* patógenas de papa en nuestro país y su variabilidad genética, de forma de contribuir al establecimiento de mejores estrategias para el control de la enfermedad.

OBJETIVOS Y DESCRIPCIÓN DE LA TESIS

El objetivo general de esta tesis es generar conocimiento sobre las cepas de *Streptomyces* spp. que afectan los cultivos de papa en Uruguay, de forma de contribuir en el establecimiento de estrategias de control de la sarna común.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar e identificar cepas de *Streptomyces* causantes de sarna común en Uruguay.
2. Caracterizar los aislamientos en función de su patogenicidad en papa y presencia de genes de patogenicidad.
3. Evaluar la diversidad genética de los aislamientos mediante técnicas moleculares (rep-PCR y MLST).

El primer y el segundo objetivo específico se desarrollan en el capítulo 2, donde se presentan los resultados de la caracterización de una colección de cepas de *Streptomyces* spp. aisladas a partir de tubérculos con síntomas y suelos de diferentes regiones paperas en Uruguay.

En el capítulo 3, se presentan los resultados de la identificación de los aislamientos mediante el método de MLSA y la evaluación de la diversidad genética de los aislamientos mediante las técnicas moleculares rep-PCR (BOX-ERIC-PCR) y MLST.

CAPÍTULO 2

Aislamiento y caracterización de especies de *Streptomyces* causantes de sarna común de la papa en Uruguay

El contenido de este capítulo fue enviado para su publicación en *Plant Pathology* en
Noviembre de 2014 con el título:

*Isolation and characterization of Streptomyces species causing potato common scab in
Uruguay.*

Autores: Lapaz M.I., Verdier E., Pianzzola M.J

RESUMEN

En respuesta a las pérdidas económicas significativas en el cultivo de papa ocurridas durante el otoño de 2010 en Uruguay, se realizó el aislamiento y caracterización de *Streptomyces* spp. patógenos causantes de sarna común provenientes de tubérculos de papa y suelos de diferentes regiones paperas. Se generó una colección de 331 aislamientos que fue analizada respecto a la presencia de los genes *nec1*, *txtAB* y *tomA* presentes en una isla de patogenicidad (IPA). La patogenicidad fue evaluada en discos de papa donde los aislamientos patógenos inducen necrosis. De acuerdo a ensayos en discos de papa o por presencia de los genes responsables de la producción de taxtomina A, ochenta y cinco de los 331 aislamientos de *Streptomyces* spp. fueron clasificados como potenciales patógenos. Se determinó la presencia de siete genotipos de la IPA: (n=56) *txtAB+/nec1+/tomA+*, (n=6) *txtAB+/nec1+/tomA-*, (n=6) *txtAB+/nec1-/tomA+*, (n=7) *txtAB+/nec1-/tomA-*, (n=2) *txtAB-/nec1+/tomA-*, (n=1) *txtAB-/nec1-/tomA+* and (n=7) *txtAB-/nec1-/tomA-*. Según el relevamiento realizado, los *Streptomyces* causantes de sarna en Uruguay son muy diversos con respecto a sus características morfológicas y fisiológicas y en particular, en el análisis de secuencias del gen *rpoB*. En base a las relaciones filogenéticas derivadas del análisis del gen *rpoB*, se identificaron aislamientos principalmente como *S. scabiei*/*S. stelliscabiei* y *S. acidiscabies*, pero no todos los aislamientos pudieron ser identificados por éste método.

CHAPTER 2

Isolation and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay

The content of this chapter was submitted to Plant Pathology on November, 2014, as:

Isolation and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay.

Authors: Lapaz M.I., Verdier E., Pianzzola M.J

ABSTRACT

Isolation and characterization of common scab (CS) pathogen *Streptomyces* spp. from Uruguayan potato tubers and soil samples was done in response to significant economic losses due to CS on potato in autumn 2010. A collection of 331 isolates obtained were analyzed for presence of *Streptomyces* Pathogenicity Island (PAI) genes *nec1*, *txtAB* and *tomA*. Pathogenicity was evaluated on tuber slices where pathogenic isolates induce necrosis. Eighty-five of the 331 isolates were classified as putatively pathogenic in that they were able to induce necrosis on tuber disks, or if they harbored genes responsible for thaxtomin A production. Seven PAI genotypes were found; (n=56) *txtAB*+/*nec1*+/*tomA*+, (n=6) *txtAB*+/*nec1*+/*tomA*-, (n=6) *txtAB*+/*nec1*-/*tomA* +, (n=7) *txtAB*+/*nec1*-/*tomA*-, (n=2) *txtAB*-/*nec1*+/*tomA*-, (n=1) *txtAB*-/*nec1*-/*tomA*+ and (n=7) *txtAB*-/*nec1*-/*tomA*-. *Streptomyces* causing CS on potato in Uruguay were found to represent a range of different species by virtue of their diverse morphological and physiological and in particular *rpoB* sequence analysis. On the basis of the phylogenetic relationships derived from *rpoB* sequences, we identified isolates primarily as *S. scabiei*/*S. stelliscabiei* and *S. acidiscabies* and some isolates could not be identified by this method.

INTRODUCTION

Potato common scab (CS) is a widespread disease resulting in significant economic losses throughout the world due to lesions affecting tuber surfaces. The causal agents are soil-inhabiting Gram-positive bacteria belonging to *Streptomyces* consisting of more than 650 species (Loria *et al.*, 2006; Euzéby, 2014). *Streptomyces* play a major role in nutrient cycling and some produce antibiotics and other useful metabolites (Loria *et al.*, 2006). The large and diverse number of important bioactive compounds known to be produced by these bacteria, however, may correspond to only 10% of their total capacity for production (Guo *et al.*, 2008). Despite the diversity of this genus, only a few species are plant pathogens. Among them, the first described and best-characterized species, *S. scabiei* (synonym *S. scabies*), seems to be cosmopolitan, although several recent reports indicate that it is infrequently found in Europe. Other more geographically limited species are also associated with CS. Among these are, e.g., *S. acidiscabies*, isolated from acid soils where *S. scabiei* is normally suppressed and *S. turgidiscabies* first described in Japan. These species are considered to be newly emerging pathogens (Loria *et al.*, 2006; Bignell *et al.*, 2010). Other *Streptomyces* species that cause CS include *S. europaeiscabiei* identified in Europe, Korea and North America (Bouchek-Mechiche *et al.*, 2000; Flores-Gonzalez *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2004; Wanner, 2009) and *S. stelliscabiei* reported to be in France and the U.S. (Bouchek-Mechiche *et al.*, 2000; Wanner, 2006).

CS pathogenicity is associated with production of phytotoxic dipeptide, thaxtomin A, that induces characteristic symptoms. The biosynthetic genes for this compound are clustered together on the chromosomes of *S. scabiei*, *S. turgidiscabies* and *S. acidiscabies*. The *txt* gene cluster is localized to a mobile pathogenicity island (PAI) in *S. turgidiscabies* (Kers *et al.*, 2005; Huguet-Tapia *et al.*, 2014). This suggests that horizontal gene transfer likely played a role in the acquisition of the *txt* gene cluster by *Streptomyces* spp., and consequent potential emergence of new pathogenic *Streptomyces* (Loria *et al.*, 2006; Bignell *et al.*, 2014). Some studies have shown, however, that a number of *Streptomyces* isolates not

having thaxtomin A genes are also CS pathogens (Wanner, 2004; Park *et al.*, 2003a; Pánková *et al.*, 2012). Bignell *et al.* (2014) recently described other phytotoxic secondary metabolites that may contribute to CS symptom development. This might explain why isolates without thaxtomin A genes are still pathogenic and incite characteristic symptoms. Genes including *nec1* and *tomA* are involved in enhancing pathogenicity although they are not essential for symptom development (Seipke & Loria, 2008; Wanner, 2009).

Identification of *Streptomyces* isolates is very difficult due the numerous species described for this genus. The several sequenced genomes for *Streptomyces* are also very large, i.e, between 6.5 and 11.9 MB (Zhou *et al.*, 2011). The size as well as the plasticity of the *Streptomyces* genome make species identification difficult (Labeda, 2011). The classical approaches for identification of *Streptomyces* species involve describing morphological traits, microscopy and biochemical techniques which are time-consuming and laborious. Although these methods allow progress in the identification of isolates, it is not always possible to identify the species. In recent years, development or refinement of molecular methods offers many new possibilities for species identification. These methods include species specific 16S rDNA gene sequencing, species-specific marker PCR methods, detection of pathogenicity determinants and several DNA fingerprinting techniques (Guo *et al.*, 2008).

Potato is both the most cultivated and economically the most important horticultural crop in Uruguay (MGAP & Mercado Modelo, 2011). Potato production in 2010, however, resulted in unusually high economic losses due to CS, corresponding to losses of 29% of total potato cultivation. Specifically, the disease was very aggressive and many tubers showed particularly pitted and raised scab lesions (Lapaz *et al.*, 2012). Uruguayan potato producers have usually imported ca. 30% of seed tubers used in recent years, (DIEA & DIGEGRA, 2013). Plant health regulations allow importation of seed tubers that pass a visual control for CS. This visual control is not rigorous enough to avoid entrance of the causal agent for CS disease, and new strategies to screen for the presence of the pathogen are clearly needed. To our knowledge, an exhaustive identification and genetic characterization of *Streptomyces*

spp. causing CS in Uruguay, traditionally a potato producing country, was not previously undertaken. The aim of the present study was to isolate and characterize *Streptomyces* species from CS lesions on potato and from horticulture field soils in Uruguay.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Five *Streptomyces* spp. reference strains representing the most important species associated with potato CS were included for phenotyping and genotyping studies: *S. scabiei* DSM41658^T (T, type strain); *S. stelliscabiei* DSM41803^T; *S. europaeiscabiei* DSM41802^T; *S. acidiscabies* DSM41668^T and *S. turgidiscabies* DSM41838^T. Type strains were purchased from the DSMZ culture collection (Braunschweig, Germany). Additionally, 20 unknown *Streptomyces* spp. strains were kindly provided by Departamento de Protección Vegetal (Fitopatología), Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay. These strains were isolated from potato tubers during the severe CS outbreak in 2010. *Streptomyces* isolates and reference strains were routinely cultured on yeast-malt extract agar (YME) (Shirling & Gottlieb, 1966) at 28°C and maintained as spore suspensions in 20% glycerol at -70°C.

Isolation of *Streptomyces* spp. from necrotic lesions on potato tubers

Potato tubers and imported seed potato showing symptoms of CS were obtained from potato growers and farmer advisers. The potato tuber samples were from main potato-growing areas, departments San José, Canelones and Rocha, Uruguay in 2010, 2011 and 2012.

Several methods were used to isolate *Streptomyces* spp. from tubers. In the first method, tubers were washed, surface-sterilized with 1.0% sodium hypochlorite (NaOCl) for 1 min and rinsed with sterile distilled water. Scab lesions were excised and ground with a mortar and pestle in sterile distilled water (1 g/10 mL). One mL of homogenate was mixed with 9 mL of phenol-water suspension (1:140). Dilutions of the homogenate/water-phenol mixture were spread on Nystatin, polymixin, penicillin, cycloheximide (NPPC) water agar (Williams & Davies, 1965) and incubated at 28°C for 4 to 14 days (Lehtonen *et al.*, 2004).

The second, method used was that of Loria *et al.* (2010). This involved surface sterilization of tubers as above. A portion of whole tissue was placed in a tube containing 1 mL sterile

distilled water and immersed in a 60°C water bath for 0.5 h, then spread onto NPPC water agar.

The third method for isolating *Streptomyces* spp. from scab lesions is a modified method of Loria *et al.* (2010). A portion of lesion was sterilized and rinsed as the tubers above and then macerated in 2 mL sterile distilled water. Dilutions of macerated tissue were spread on NPPC water agar and incubated at 28 °C for 10 to 14 days.

For all methods, colonies characteristic of *Streptomyces* were transferred onto fresh YME and incubated at 28°C for 5 to 7 days. Subsequent transfer to fresh medium was done to obtain pure cultures.

Isolation of *Streptomyces* spp. from soil

Soil samples were collected from various potato fields in San José, Uruguay. Isolation of *Streptomyces* spp. from soil was done essentially as described by Loria *et al.* (2010). Air dried soil (10 g) was added to 100 mL sterile distilled water, and agitated on a shaker for 10 min. Five successive tenfold dilutions of the soil suspension were made using sterile water and 0.1 mL of the three most dilute suspensions were spread uniformly on NPPC water agar. Plates were incubated at 28°C for 7 to 10 days and characteristic powdery *Streptomyces* colonies were transferred to fresh medium. Pure cultures were obtained through repeated culturing of single colonies on YME medium.

CS pathogenicity assay

Pathogenicity was tested on tuber slices as described previously (Loria *et al.*, 1995). Cultures of test strains were grown on YME agar medium for 5 to 7 days at 28°C, and agar plugs from the sporulating colonies were transferred onto disks of excised tuber tissue. Disks were incubated at 28°C in the dark and evaluated for the presence of necrosis after 5 days.

S. scabies DSM41658 was included as positive control and sterile water was used as negative control. All tuber slice assays were repeated three times.

Morphology and physiological characterization

Morphological and physiological characterization was based on methods of the International *Streptomyces* Project (ISP) (Shirling & Gottlieb, 1966; Loria *et al.*, 2010). YME (ISP2) agar was used to assess colony and spore color. Tyrosine agar (ISP7) was used to determine production of melanin. Water agar cultures were used to determine spore-chain type by direct microscopic examination. Carbon utilization medium (ISP9) was used to assess utilization of D-glucose and raffinose. Carbon source solutions were sterilized by filtration and added to autoclaved ISP9 medium to 1% final concentration (w/v). Growth on different carbon sources at 28°C was assessed for up to 10 days.

DNA isolation

Genomic DNA was isolated from *Streptomyces* by the method of Zhou *et al.* (1996) with slight modification. Strains were grown in 5 mL YME for 2 days at 30°C then cells were harvested by centrifugation for 20 min and frozen at -20°C. Resulting pellets were suspended in 0.5 mL TE25S buffer (25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8.0; 0.3 M sucrose). Lysozyme was added to a concentration of 2 mg/mL and incubated at 37°C for 0.5-1 h. SDS and proteinase K were then added at final concentrations of 0.6% and 0.2 mg/mL, respectively, and incubated at 55°C for 1 h. 0.2 volumes of 5 M NaCl was added to the lysed cell suspension, followed by 0.1 volume 10% Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) in 0.7 M NaCl and incubated for 10 min at 55°C. One volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added and the lysate was incubated at room temperature for 0.5 h with frequent inversion. The mixture was centrifuged at 4500 *g* for 15 min and aqueous phase was

transferred to a new tube. RNase A was added to the aqueous phase to 50 µg/mL and incubated at 37°C for 0.5 h. DNA was precipitated by adding 0.6 volumes of ice-cold isopropanol and centrifuged at 13000 *g* at 4°C for 10 min. DNA was rinsed with 0.5 mL 70% ethanol, dried and dissolved in 50 µL of sterile distilled water.

PAI marker genes

Genomic DNA from reference strains and *Streptomyces* spp. isolates was analyzed by PCR for the presence of genes characteristic of the *S. turgidiscabies* PAI as described by Kers *et al.* (2005). Amplifications were performed using specific primer pairs: TxtAB1- TxtAB2 (Wanner, 2006) and TxtA1-TxtA2 for the *txtAB* operon (Wanner, 2004), Tom3-Tom4 for the *tomA* gene (Wanner, 2006), and Nf-Nr for the *nec1* gene (Bukhalid *et al.*, 1998) (Table 2.1). PCR analyses were done in 25 µL containing 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20, 1.0 to 2.0 mM MgCl₂ (Wanner, 2006), 200 µM each dNTP, 12.5 pmol each primer, 1.0 U of Taq DNA polymerase (recombinant) (*Thermo Scientific*) and 2 to 25 ng of DNA template. The time and temperature conditions for PCRs were done as described by Wanner (2006). Amplified DNA fragments were separated on 1.5% agarose gels and analyzed after staining with ethidium bromide.

Dot blot analysis of *txtAB* gene

Dot blot analysis was done to confirm presence/absence of the *txtAB* operon in isolates using *S. scabiei* strain DSM 41658 as positive control and *Ralstonia solanacearum* strain UW551 as negative control. The *txtAB* PCR amplicon (385 bp) was gel purified using a QIAquick[®] Gel extraction kit (*Qiagen*). 1 µg purified amplicon was biotinylated with dATP using the BioNick[™] Labeling System kit (*Invitrogen*) for use as probe. Total genomic DNAs were extracted as described above. The quantity and quality of eluted DNA was measured using a NanoDrop spectrometer. 2 µg of each DNA sample was spotted onto a Hybond-N+

membrane (Amersham) and dried 2 h at room temperature. The membrane was placed in a bag and washed with 2x SSC. The 2x SSC solution was then poured out and replaced with denaturation solution (0.5 M NaCl, 0.2 M NaOH) and incubated for 5 min. The membrane was rinsed with neutralization solution (1 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0) for 10 min. Prehybridization solution (0.34 M Na₂HPO₄, 0.16M NaH₂PO₄.H₂O, 7.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, pH 7.2) was added and the membrane was incubated at 65°C for 1 h. The pre-hybridization solution was replaced with the hybridization mix consisting of pre-hybridization solution and biotinylated probe, and incubated at 65°C for 16-24 h. After hybridization, the membrane was washed for 5 min in 2x SSC/1% SDS followed by two 15 min washes with 2x SSC/0.1% SDS, 20 min at 42°C, then rinsed in 1x SSC, 0.1% SDS twice, and finally 15 min in 0.5x SSC, 0.1% SDS at 42°C. Detection was done using the Phototope-Star Detection Kit (New England BioLabs[®] Inc.). Finally, membranes were dried and exposed to Hyperfilm[™] MP (Amersham Biosciences) for 2 h to detect and measure hybridization.

Species identification by PCR

Taxonomy-related 16S rRNA and the RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) genes were amplified by PCR using primer pairs 16S1F/16s 455-435 (Bukhalid *et al.*, 2002) and SRPOF1/SRPOR1 (Kim *et al.*, 2004), respectively (Table 2.1). Additional primers for *Streptomyces* spp. identification based on 16S rDNA were also tested (Wanner, 2006). Specific primers used for *Streptomyces* spp. included *S. scabiei* and *S. europaeiscabiei* (scab1m and scab2m), *S. acidiscabies* (Aci1 and Aci2), *S. stelliscabiei* (Stel3 and T2st2) and *S. turgidiscabies* (Turg1m and Turg2m) (Table 2.1). PCR reaction using primers based on 16S rRNA gene were done as described above for PAI marker genes. Thermal cycling conditions were done as described by Wanner (2006). The *rpoB* amplifications were done in 25 µL containing 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20, 1.5 mM MgCl₂, 250 µM each dNTP, 12.5 pmol each primer, 1.25 U of Taq DNA polymerase

(recombinant) (*Thermo Scientific*), 25 to 140 ng DNA template. The *rpoB* gene was amplified using thermal cycling conditions modified from Kim *et al.* (2004) preceded by an initial denaturing step at 95°C for 3 min and a annealing temperature of 56°C. Amplified DNA fragments were separated on 1.5% agarose gels and visualized with ethidium bromide under UV light.

Table 2.1. Primer pairs used for amplification of gene fragments in *Streptomyces*

Target gene	Primers	Nucleotide sequence (5'-3')	Reference^a
Universal Bacterial (16S rRNA)	16s1F	ACTTTCGCTTCTTCCCTGCT	1, 2
	16s 455-435	CATTACGGAGAGTTTGATCC	
<i>S. acidiscabies</i> (16S rRNA)	Aci1	TCACTCCTGCCTGCATGGGCG	2
	Aci2	CGACAGCTCCCTCCCACAAG	
<i>S. scabiei</i> / <i>S.</i> <i>europaeiscabiei</i> (16S rRNA)	scab1m	CGACACTCTCGGGCATCCGA	2
	scab2m	TTCGACAGCTCCCTCCCTTAC	
<i>S. stelliscabiei</i> (16S rRNA)	Stel3	GAAAGCATCAGAGATGGTGCC	2
	T2st2	CGACAGCTCCCTCCCCGTAAG	
<i>S. turgidiscabies</i> (16S rRNA)	Turg1m	CCCTCGCATGGGGGTGGGTTC	2
	Turg2m	CGACAGCTCCCTCCCCGTGAG	
<i>nec1</i> gene	Nf	ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGA	4
	Nr	GCAGGTCGTCACGAAGGATCG	
<i>txtA</i> gene	TxtA1	CACGTACGCGCAGTTCAATG	3
	TxtA2	AGATGATGTAGGCGGGACTC	
<i>txtAB</i> operon	TxtAB1	CCACCAGGACCTGCTCTTC	2
	TxtAB2	TCGAGTGGACCTCACAGATG	
<i>tomA</i> gene	Tom3	GAGGCGTTGGTGGAGTTCTA	2
	Tom4	TTGGGGTTGTACTCCTCGTC	
<i>rpoB</i> gene	SRPOF1	TCGACCACTTCGGCAACCGC	3
	SRPOR1	TCGATCGGGCACATGCGGCC	

References: 1 (Bukhalid *et al.*, 2002); 2 (Wanner, 2006); 3 (Kim *et al.*, 2004); 4 (Bukhalid *et al.*, 1998); 5 (Wanner, 2004).

Amplicon purification, gene sequencing and sequence editing

16S rDNA and *rpoB* amplicons were purified and sequenced by Macrogen Services (Kumchun-ku, Seoul, Korea), using primers listed in Table 2.1. Sequences were edited and analyzed using BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.4.1 software (Hall, 1999) and compared to the GenBank nr database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1997). New sequences generated in this study were deposited in GenBank under accession numbers KM283417-KM283420 and KM504303-KM504377.

Phylogenetic analyses of *rpoB* gene

Sequences of an uninterrupted 306 bp internal fragment of the *rpoB* gene amplified from DNA of a number of different isolates as well as control strains were aligned using ClustalW Mega. Phylogenetic trees were inferred using the neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), and maximum-parsimony (Fitch, 1972) methods. The distance (percent divergence) was calculated between all pairs of sequences based on the alignment. The neighbor-joining and maximum-parsimony methods were done using MEGA version 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). The resultant neighbor-joining tree and topology were evaluated using 1000 bootstrap analyses (Hillis & Bull, 1993).

RESULTS

CS pathogens were collected from 2010 through 2012 from fields located in the main potato production regions in Uruguay. Tubers sampled in this survey exhibited diverse symptoms, ranging from mild superficial to deep-pitted lesions (Figure 2.1). A total of 331 *Streptomyces* isolates were obtained from both necrotic tuber lesions and from soils. Eighty-five *Streptomyces* spp. isolates of the 331 were determined to be putatively pathogenic, including 52 isolates from necrotic lesions on potato tubers and 33 isolates from soil samples (Table 2.2). This Table includes whether isolates were from seed potato or a potato growing region in Uruguay, the year obtained, species designation, whether they were obtained from one of the three CS symptom types on tubers or from soil, data on PAI gene presence and pathogenicity on tuber discs as well as morphological and physiological data used in differentiating species.

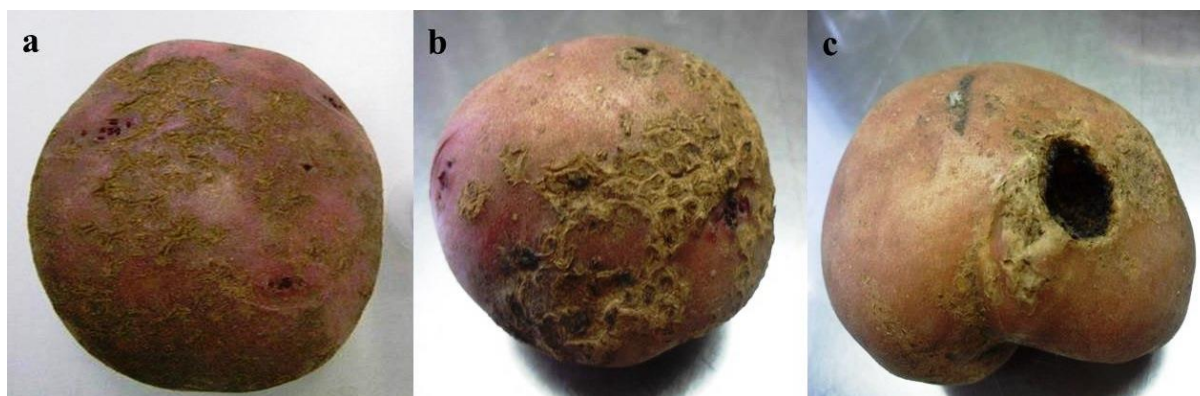


Figure 2.1. CS symptom classification on potato tubers used in this study. (a) Superficial lesions. (b) Raised lesions. (c) Pitted lesions.

Table 2.2 Phenotypic and genetic characterization of *Streptomyces* spp. isolates predicted to cause CS on potato in Uruguay and reference strains.

Isolate/type strain	General species ^a	Origin		Sample		Morphological and physiological traits					
		Year	Location	Source of isolates	Symptom	Spore color ^b	Colony color ^b	Melanin production ^c	Utilization		Pathogenicity assay ^f
									of Raffinose ^d	PAI ^e	
ST101	Ssp	2010	Seed	Tuber	Superficial	W	Be	m	r	TNT	-
ST102	Ssp	2010	Seed	Tuber	Superficial	W	Be	m	r	TNT	-
ST103	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST104	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST105	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST106	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST107	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST108	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST109	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST1010	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST1011	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST1012	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	tnt	+
ST1013	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST1014	Sac	2010	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST1015	Sac	2010	Canelones	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST1016	Sac	2010	Canelones	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST1017	Sac	2010	Canelones	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST1018	Sac	2010	Canelones	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST1019	Sac	2010	Canelones	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST1020	Sac	2010	Canelones	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	Tnt	+
ST1021	Sac	2010	Canelones	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	tnt	+
ST111	Sac	2011	San José	Tuber	Superficial	W	Br	m	r	TNT	+
ST112	Sac	2011	San José	Tuber	Superficial	W	Br	m	r	TNT	+
ST113	Sac	2011	Rocha	Tuber	Raised	W	Br	m	r	TNT	+

Isolate/type strain	General/species ^a	Origin		Sample		Morphological and physiological traits					Pathogenicity assay ^f
		Year	Location	Source of isolates	Symptom	Spore color ^b	Colony color ^b	Melanin production ^c	Utilization of Raffinose ^d	PAI ^e	
ST114	Sac	2011	Rocha	Tuber	Superficial	W	Br	m	r	TNT	+
ST115	Sac	2011	Rocha	Tuber	Raised	W	Br	m	r	TNT	+
ST116	Sac	2011	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TNT	+
ST119	Ssp	2011	San José	Soil		W	Be	M	NT	TNT	+
ST1113	Ssc/Sst	2011	San José	Tuber	Raised	G	Br	M	R	TNT	+
ST1114	Ssc/Sst	2011	San José	Tuber	Pitted	G	Br	M	R	TNT	+
ST1115	Ssp	2011	Seed	Tuber	Superficial	G	Br	M	NT	TNT	+
ST1116	Ssp	2011	Seed	Tuber		W	Be	M	NT	TnT	+
ST1117	Ssp	2011	San José	Soil		G	Be	M	NT	TNT	-
ST1118	Ssp	2011	San José	Soil		W	Be	NT	NT	TNt	+
ST1119	Ssp	2011	San José	Soil		W	Be	m	NT	tnt	+
ST1121	Ssp	2011	San José	Soil		G	Br	M	NT	TNt	+
ST1122	Ssp	2011	San José	Soil		G	Be	m	NT	tNt	-
ST1123	Ssp	2011	San José	Soil		G	Br	m	NT	Tnt	+
ST1124	Ssp	2011	San José	Soil		G	Br	m	NT	TNT	+
ST1125	Ssp	2011	San José	Soil		G	Br	M	NT	TNT	+
ST1126	Ssp	2011	San José	Soil		G	R	m	NT	TNT	-
ST1127	Ssp	2011	San José	Soil		G	Br	m	NT	TNt	+
ST1128	Ssp	2011	San José	Soil		W	Br	m	NT	TNT	+
ST1130	Ssp	2011	San José	Soil		G	Be	m	NT	TNt	+
ST1131	Ssp	2011	San José	Soil		G	Br	M	NT	TnT	+
ST1132	Ssp	2011	San José	Soil		G	Be	m	NT	tNt	+
ST1133	Ssp	2011	San José	Soil		W	Br	m	NT	tnt	+
ST1134	Ssp	2011	San José	Soil		G	Br	NT	NT	TNT	+
ST1135	Ssp	2011	San José	Soil		W	Be	M	NT	Tnt	+
ST1136	Ssp	2011	San José	Soil		W	Br	M	NT	TnT	+

Isolate/type strain	General/species ^a	Origin		Sample		Morphological and physiological traits					Pathogenicity assay ^f
		Year	Location	Source of isolates	Symptom	Spore color ^b	Colony color ^b	Melanin production ^c	Utilization of Raffinose ^d	PAI ^e	
ST1137	Ssp	2011	San José	Soil		G	Br	NT	NT	tnT	+
ST1140	Ssp	2011	Seed	Tuber	Raised	G	Br	M	R	TNT	+
ST1141	Ssp	2011	Seed	Tuber	Superficial	W	Br	NT	NT	Tnt	+
ST1142	Ssp	2011	San José	Soil		G	Br	M	NT	TNt	+
ST121	Ssp	2012	San José	Tuber	Pitted	W	Br	m	r	TnT	+
ST122	Ssp	2012	San José	Tuber	Pitted	G	Br	m	r	TNT	+
ST123	Ssp	2012	San José	Tuber	Pitted	G	Be	M	R	TnT	+
ST124	Ssc/Sst	2012	San José	Tuber	Superficial	G	Br	M	R	TNT	+
ST125	Ssc/Sst	2012	San José	Tuber	Pitted	G	Br	M	R	TNT	+
ST126	Ssc/Sst	2012	San José	Tuber	Superficial	G	Br	M	R	TNT	+
ST127	Ssc/Sst	2012	San José	Tuber	Pitted	G	Br	M	NT	TNT	+
ST128	Ssc/Sst	2012	San José	Tuber	Pitted	G	Br	M	R	TNT	+
ST129	Ssc/Sst	2012	San José	Tuber	Pitted	G	Br	M	R	TNT	+
ST1210	Ssc/Sst	2012	San José	Tuber	Pitted	G	Br	M	R	TNT	+
ST1211	Ssp	2012	San José	Soil		G	Br	M	NT	TnT	+
ST1212	Ssp	2012	San José	Soil		W	Be	M	NT	TNT	+
ST1213	Ssp	2012	San José	Soil		G	Br	m	NT	TNT	+
ST1214	Ssp	2012	San José	Soil		G	Br	m	NT	TNT	+
ST1216	Ssp	2012	San José	Soil		G	Be	m	NT	tnt	+
ST1217	Ssp	2012	San José	Soil		G	Br	m	NT	tnt	+
ST1218	Ssp	2012	San José	Soil		W	Br	m	NT	TNT	+
ST1219	Ssp	2012	San José	Soil		G	Br	m	r	TNT	+
ST1221	Ssp	2012	San José	Soil		G	Br	m	NT	Tnt	+
ST1222	Ssp	2012	San José	Soil		W	Be	m	NT	tNt	+
ST1223	Ssp	2012	San José	Soil		G	Br	M	NT	tnt	+
ST1224	Ssp	2012	San José	Soil		G	Br	m	NT	TNt	+

Isolate/type strain	General/species ^a	Origin		Sample		Morphological and physiological traits					Pathogenicity assay ^f
		Year	Location	Source of isolates	Symptom	Spore color ^b	Colony color ^b	Melanin production ^c	Utilization of Raffinose ^d	PAI ^e	
ST1225	Ssp	2012	San José	Soil		G	Br	m	NT	Tnt	+
ST1226	Ssp	2012	San José	Tuber	Superficial	G	Br	m	r	TNT	-
ST1227	Ssp	2012	San José	Tuber	Superficial	G	Be	M	NT	TNT	+
ST1228	Ssp	2012	San José	Tuber	Superficial	G	Be	m	NT	Tnt	+
ST1229	Ssp	2012	San José	Tuber	Pitted	G	Br	M	R	TNT	+
ST1230	Ssc/Sst	2012	San José	Tuber	Superficial	G	Br	M	R	TNT	+
ST1232	Ssc/Sst	2012	San José	Tuber	Superficial	G	Br	M	R	TNT	+
ST1233	Ssp	2012	San José	Tuber	Pitted	G	Br	M	R	TNT	+
ST1234	Ssp	2012	San José	Tuber	Superficial	G	Br	M	R	TNT	+
ST1236	Ssc/Sst	2012	San José	Tuber	Superficial	G	Br	M	R	TNT	+
DSM41658	Ssc					G	Br	M	R	TNT	+
DSM41803	Sst					G	Br	M	R	TNT	+
DSM41802	Seu					G	Br	M	R	TNT	+
DSM41668	Sac					W	Br	m	r	TNT	+
DSM41838	Stu					G	Be	m	R	TNT	+

^a Ssp, *Streptomyces* spp., *S. scabies* (Ssc), *S. turgidiscabies* (Stu), *S. acidiscabies* (Sac), *S. europaeiscabiei* (Seu) and *S. stelliscabiei* (Sst).

^b G, gray; W, white; Br, brown; Be, beige; R, red.

^c M = production of melanin. m = No production of melanin. NT, not tested.

^d R = Utilization of raffinose. r = no utilization of raffinose.

^e Presence of genes associated with the *Streptomyces* PAI: first T= *txtAB* present, t=*txtAB* absent; N= *nec1* present, n=*nec1* absent; second T=*tomA* present, t=*tomA* absent.

^f + = Necrosis. - = No necrosis.

Phatogenicity Test and PAI Genotyping

The 85 putatively pathogenic isolates were designated according to either their pathogenicity on potato tuber slices or presence of genes involved in thaxtomin A production (i.e, *txtAB* operon) as tested by PCR (see Table 2.2).

Amongst the isolates that were predicted to be pathogenic, seven PAI genotypes were found; (n=56) *txtAB+/nec1+/tomA+*, (n=6) *txtAB+/nec1+/tomA-*, (n=6) *txtAB+/nec1-/tomA+*, (n=7) *txtAB+/nec1-/tomA-*, (n=2) *txtAB-/nec1+/tomA-*, (n=1) *txtAB-/nec1-/tomA+* and (n=7) *txtAB-/nec1-/tomA-* (Table 2.2). Isolates with haplotype *txtAB-/nec1+/tomA+* were not found. Plant pathogenicity in *Streptomyces* is considered to be based on production of thaxtomin A toxin, which is also reported to be the only known pathogenicity determinant for CS (Bignell *et al.*, 2010). The primer pair for amplifying the *txtAB* operon yielded no PCR product for ten isolates (Table 2.2). Dot blot analysis was performed to confirm the absence of the *txtAB* operon in these ten isolates. The dot blot assay showed that a *txtAB* probe hybridized with *S. scabiei* strain DSM 41658 genomic DNA but not with DNA from isolates St1012, St1021, St1119, St1132, St1133, St1137, St1216, St1217, St1222, St1223 and the negative control *R. solanacearum* strain UW551. These results confirmed that these ten isolates lack a *txtAB* operon homolog; however, they were still able to incite CS in the pathogenicity assay.

Pathogenicity testing revealed that 83 of the isolates were pathogenic. Necrosis was visible 4 days after inoculation on potato tuber disks inoculated with positive control *S. scabiei* strain DSM 41658. No necrosis or any color changes of the tuber disks were observed when sterile distilled water was used as negative control (Figure 2.2). Seventy three of 75 isolates PCR positive for *txtAB* were able to induce necrosis on tuber disks. Two isolates with PAI genotype *txtAB+/nec1+/tomA+*, were unable to induce necrosis on tuber disks in our assay. The ten isolates PCR negative for the *txtAB* operon but were still pathogenic in tuber disks indicates, that factors other than production of thaxtomin A can be responsible for CS symptom development. Also, a nonpathogenic isolate of *Streptomyces* spp. (St1122) had

the PAI genotype, *txtAB-/nec1+/tomA-*. This suggests that host background may be necessary for PAI function. This isolate was included in Table 2.2.

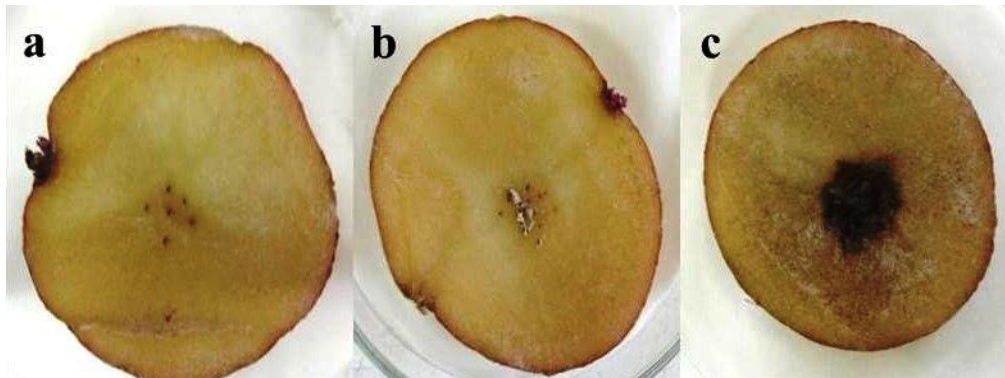


Figure 2.2. Pathogenicity assays using potato cv. Chieftain tuber slices: necrotic halos produced around agar plugs from 5-day-old YME agar cultures of isolates St1227 (right), St1126 (middle), and water only (left).

Morphological and physiological traits

A total of 331 isolates formed colonies phenotypically characteristic of *Streptomyces* spp. when grown on yeast malt extract (YME) media. Eighty-five pathogenic isolates, five references strains and a nonpathogenic isolate were compared for colony and spore color in mass. Appearance, colony and spore color varied among isolates on YME media. Pathogenic isolates had colony colors ranging from cream to brown and red and produced spores ranging in color from white and light gray to dark gray. Isolates were tested for melanin production and raffinose utilization. Amongst the pathogenic isolates, nine different phenotypes were found; G/Be/M/R, G/Be/m/NT, G/Br/M/R, G/Br/m/r, W/Be/m/r, W/Be/M/NT, W/Br/m/r, W/Br/M/NT and G/R/m/NT (Table 2.2). These morphological and physiological traits, though consistent with previous studies (Wanner, 2006), did not provide sufficient information to distinguish *Streptomyces* isolates at the species level.

Species identification by PCR

Diversity in *Streptomyces* species in the Uruguayan isolate collection was analyzed using four PCR primers to specifically amplify 16S rDNA gene fragments from five plant-pathogenic *Streptomyces* spp.: *S. scabiei*/*S. europaeiscabiei*, *S. acidiscabies*, *S. stelliscabiei* and *S. turgidiscabies* (Table 2.1). As shown in Fig. 2.3A and B, primer pairs designed to specifically amplify 16S rDNA from DNA of strains of *S. acidiscabies* (A) and strains of *S. scabiei*/*S. europaeiscabiei* (B), amplified a fragment of the expected size from strains of *S. acidiscabies* (A, lane 2) and strains of *S. scabiei*/*S. europaeiscabiei* (B, lanes 1 and 3), respectively. Some background amplification is also seen in other lanes showing amplification products produced from DNA of the five species being tested for both Fig. 2.3A and B. Fig. 2.3C shows that the primer pair specific for *S. turgidiscabies* indeed amplifies the expected fragment from DNA of *S. turgidiscabies* (C, lane 5), however this primer pair also significantly amplifies a fragment from *S. acidiscabies* (C, lane 2), in addition to background amplification as noted above. The primer pair specific for *S. stelliscabiei* was found to be the least specific of these 4 primer pairs. In addition to amplifying a fragment from *S. stelliscabiei*, nearly the same amplification was also seen using either *S. scabiei* (D, lane 1) or *S. turgidiscabies* (D, lane 5) DNA as template. Significant amplification was also seen with this primer pair using *S. acidiscabies* or *S. europaeiscabiei* DNA as template. As such, we found that only 2 of the 4 primers were suitable for distinguishing and identifying the four species analyzed. As discussed below, however, there are other described species of *Streptomyces* that can incite CS, and our study in addition suggests that even more species may be found. We then investigated other markers that might be useful in distinguishing *Streptomyces* species.

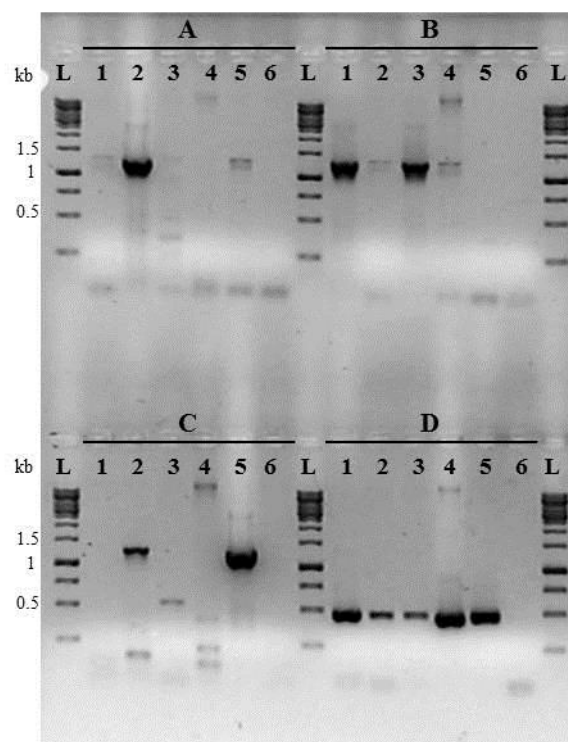


Figure 2.3. Agarose gel analysis of amplification products using species-specific 16S rDNA primer pairs and DNA template from different *Streptomyces* species. A, strains of *S. acidiscabies*; B, strains of *S. scabiei*/*S. europaeiscabiei*; C, strains of *S. turgidiscabies*; and D, strains of *S. stelliscabiei*. Lanes 1 to 5 are reference strains (*S. scabiei* DSM41658; *S. acidiscabies* DSM41668; *S. europaeiscabiei* DSM41802; *S. stelliscabiei* DSM41803 and *S. turgidiscabies* DSM41838, respectively). Lane 6 is the negative control (miliQ water). L, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Phylogenetic analysis based on *rpoB* sequences suggests that this is a powerful tool for phylogenetic analysis and species differentiation within the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* (Kim *et al.*, 2004). Using the *rpoB* primer set SRPOF1 and SRPOR2, a 352 bp fragment was generated from 61 pathogenic isolates and reference strains (*S. stelliscabiei*; *S. scabiei*; *S. acidiscabies* and *S. turgidiscabies*). Sequence analysis of the 61 fragments resulted in resolving a common continuous 306 bp segment that could be used for phylogenetic analysis. The sequences of 5 reference strains (EF101622.1, EF101631.1, EF101626.1, EF101632.1 and EF101624.1) and an outgroup (CP002441.1) were obtained from public databases and included in the analysis. Multiple alignment of the 306 bp *rpoB* sequences analyzed did not result in any gaps or additions.

The *rpoB* phylogenetic analysis revealed genetic variation among isolates from Uruguay. In the tree shown in Fig. 2.4, Group 1 (25 isolates) clustered with or in close proximity to *S.*

acidiscabies reference strains. These isolates had morphological and physiological characteristics similar to those of *S. acidiscabies* type strain DSM41668. They produced white spores, did not produce melanin on tyrosine agar and did not utilize raffinose as a carbon source. This group is divided into two smaller groups, with Group 1A clustering closer to *S. acidiscabies* reference strains than Group 1B. Group 2 (12 isolates) clustered with or in close proximity to *S. scabiei* and *S. stelliscabiei*. These isolates had characteristics similar to type strains for *S. scabiei* and *S. stelliscabiei*. They produced gray spores, produced melanin on tyrosine agar medium and utilized raffinose as a carbon source.

Group 3 consisted of five isolates that are in the same cluster with *S. europaeiscabiei* and *S. turgidiscabies*. Isolates of Group 3 had phenotypic characteristic similar to *S. europaeiscabiei*. The Group 4 (3 isolates) clustered in close proximity to *S. ipomoeae* reference strains. Isolates of Group 4, however, had phenotypic characteristic different from those of *S. ipomoeae* as well as each other. The largest number of isolates (25 isolates) belonged to *S. acidiscabies*, based on *rpoB* sequence data (Table 2.2). These isolates were from the main potato-growing areas of San José, Canelones and Rocha in 2010 and 2011. Nearly all (23 isolates) of these isolates were *txtAB* positive, and 22 had all three PAI marker genes. All 23 *txtAB* positive isolates tested were able to induce necrosis on tuber disks. The 12 isolates belonging to Group 2 (the *S. scabiei*/*S. stelliscabiei* group) were all from San José, and had all three PAI marker genes.

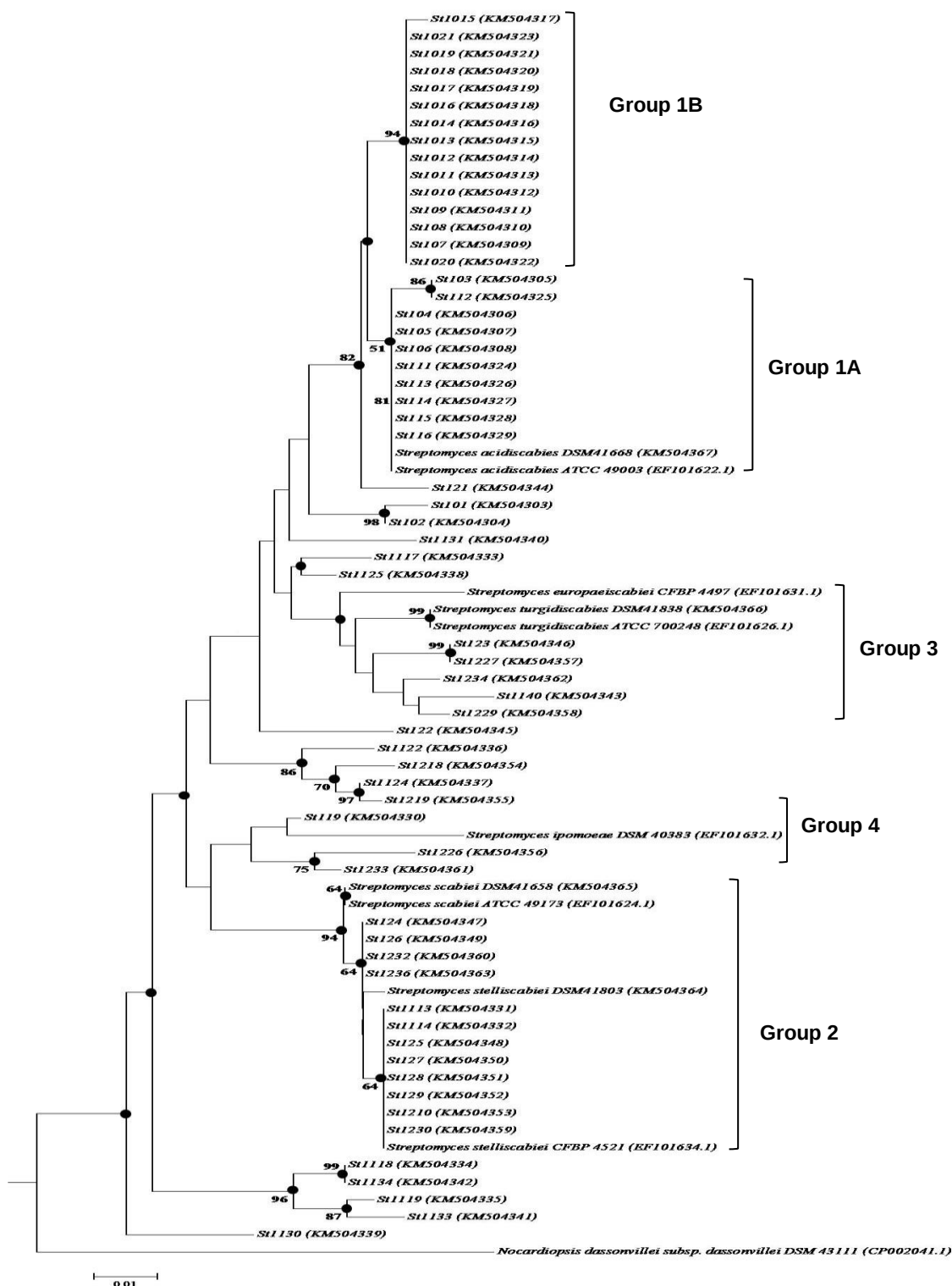


Figure 2.4. Phylogenetic relationships between 61 *Streptomyces* spp. Uruguayan isolates and reference strains (see Table 2.2 for details on isolates and strains) based on partial nucleotide sequences (306 bp) of the gene *rpoB*.

The tree was constructed using the neighbor-joining method. Percentages at nodes represent levels of bootstrap support from 1000 resampled datasets. Bootstrap values less than 50% are not shown. Solid circles indicate that the corresponding node (grouping) was also recovered in the maximum-parsimony tree. *Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111 was used as outgroup. The bar represents a phylogenetic distance of 0.01. GenBank accession numbers are given in parentheses.

DISCUSSION

This study summarizes is the first extensive characterization of CS-inciting *Streptomyces* species isolated from infected tubers and soils in Uruguay. The unusually significant economic losses due to the spread of CS in Uruguay in autumn 2010 prompted an urgent need to fully understand the CS pathogen complex in as much detail as possible (Grela, 2010). *Streptomyces* causing CS on potato in Uruguay were found to represent a range of different species by virtue of their diverse morphological and physiological properties as well as by 16S rDNA gene and in particular *rpoB* sequence analysis. Phylogenetic relationships derived from *rpoB* sequences as well as phenotypic characteristics provided the most useful information for species identification. Eighty-five putatively pathogenic *Streptomyces* spp. isolated were characterized in the present study: 25 could be assigned to *S. acidiscabies* and 12 to *S. scabiei*/*S. stelliscabiei*. Five isolates clustered with *S. europaescabies* and in addition three isolates clustered in proximity to *S. ipomoeae* (causal agent of soil rot of sweet potato). Nineteen of the 61 isolates analyzed using *rpoB* sequences for *Streptomyces* species identification could not be assigned to any of the five principal CS species investigated here. These 19 isolates may be related to others of the hundreds of described species within the genus *Streptomyces* and were not evaluated further in this survey.

Only two of the four species-specific 16S rRNA gene primer pairs sets could be used to distinguish between the 5 main CS-inciting *Streptomyces* species. A possible explanation is that the 16S rDNA gene can be multicopy gene, and more than one sequence may be in the genome of an isolate. It has been reported that, although rare, some *Streptomyces* strains possess multiple 16S rDNA gene copies with different sequences (Ueda *et al.*, 1999). Previous studies of *Streptomyces* also noted that *rpoB* gene sequences provide a greater discrimination at the species and strain levels, in comparison with 16S rRNA gene sequences (Kim *et al.*, 2004; St-Onge *et al.*, 2008). The Song group in Korea reported that the 16S rRNA sequences of *S. europaescabiei*, e.g., were differentiated from those of *S. scabiei* by one nucleotide substitution. Sequences of the 16S rRNA gene were therefore

considered highly similar for these two species, and thus not suitable for discriminating between these species (Song *et al.*, 2004). Our study shows that reference strains *S. scabiei* and *S. europaeiscabiei* formed two distinct clusters in the *rpoB* phylogenetic tree. The two species could thus be readily distinguished using the *rpoB* gene sequences. However, *S. scabiei* and *S. stelliscabiei* were in the same cluster in the *rpoB* sequence analysis, suggesting that the *rpoB* fragment used in this study was not generally suitable for distinguishing all *Streptomyces* species causing CS.

S. acidiscabies was isolated from samples from several different locations and was also found to be the species most frequently isolated from CS lesions in Uruguay during 2010. In addition, *S. acidiscabies* was determined to be the causal organism of CS disease that resulted in the greatest economic losses in 2010 (Lapaz *et al.*, 2012). *S. acidiscabies* was first isolated from low pH soils in the U.S. (Lambert & Loria, 1989a) and was later found in Canada, China, Japan, Korea, the UK and Uruguay (Song *et al.*, 2004; St-Onge *et al.*, 2008; Thwaites *et al.*, 2010; Tóth *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2010; Lapaz *et al.*, 2012).

S. acidiscabies and *S. scabiei*/*S. stelliscabiei* were detected and isolated in Uruguay in 2011, however during 2012 only isolates of *S. scabiei*/*S. stelliscabiei* were found. *S. scabiei* has also been described as the most abundant CS-causing *Streptomyces* species worldwide (Loria *et al.*, 1997). With the advent of molecular genetic methods for characterization of CS-causing species; it became apparent that the former species *S. scabies* is, despite its phenotypic uniformity, a genetically diverse taxon, comprising at least three different species: *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* and *S. stelliscabiei* (Bouchek-Mechiche *et al.*, 2000).

The unusual CS outbreak in potato during 2010 could be because; one third of the seed potato used in Uruguay was imported from different countries and the imported seed potato control allowed for 2% of severe attack, 5% of moderate attack and 10% mild attack (by total tuber analyzed) surface blemishes (INASE, 2010) which can suffice to spread strains around the country. The seed potato tubers may harbor a measurable population of pathogenic *Streptomyces* that are potential sources of inoculum of pathogenic *Streptomyces* into potato fields (Wang & Lazarovits, 2005). Another possible explanation is that *S. acidiscabies* may

be natural inhabitants of soil in Uruguay and in 2010 environmental conditions benefited these species as becoming a very significant CS causal agent. This species was found at reduced levels in 2011 and was not found in 2012. These observations support other reports that the ability of this species to persist in soil is relatively poor, and is usually transmitted by infected seed tubers (Lambert & Loria, 1989a).

The isolates investigated in this study were obtained from lesions with varied symptoms, ranging from superficial to raised or pitted lesions. There was no correlation, however with a particular assigned species and a given type of symptom. Both species *S. acidiscabies* and *S. scabiei*/*S. stelliscabiei* were identified in samples of tissue with superficial, raised or pitted scab symptoms, e.g. these results are in accordance with previous studies indicating that symptoms were not species-specific (Loria *et al.*, 1997; Dees *et al.*, 2013). Rather, severity of symptoms seems to be influenced by inoculum level in the soil, susceptibility of the potato cultivar as well as virulence of the pathogen strain (Loria *et al.*, 1997).

The presence of PAI marker genes in Uruguayan *Streptomyces* isolates was found to be highly variable. Seven of eight possible genotypes for the three PAI markers were found among the 86 isolates. Amplification of primer pair txtAB1/txtAB2 and dot blot analysis showed that 76 of the 86 tested isolates harbor *txtAB* genes. Pathogenicity tests using potato tuber disks confirmed predicted pathogenicity for 74 of these 76 isolates. Two isolates with *txtAB*⁺/*nec1*⁺/*tomA*⁺ genotype were not able to induce necrosis on tuber disks. Kers *et al.* (2005) reported that, *S. coelicolor* PAI transconjugants were unable to produce thaxtomin A suggesting that PAI functionality is dependent on the genetic background of the recipient strain or that the PAIs transferred were deletions, rearrangements or were incompletely transferred in some or all transconjugants. In these cases it is important test for thaxtomin A production to verify *txtAB* gene functionality.

Twenty-nine isolates have an atypical composition of PAI marker genes as determined by the PCR assay used here. Two isolates had *txtAB* and were pathogens, but lacked both *nec1* and *tomA*. Six had both *txtAB* and *nec1*, but lacked *tomA*. Seven had *txtAB* and *tomA* genes, but lacked *nec1*. Ten isolates were able to induce necrosis on potato disk didn't

possess any of the three pathogenicity marker genes. One non-pathogenic isolate had *nec1* but lacked both *txtAB* and *tomA*.

We found that *nec1* was lacking from more than one of the pathogenic isolates tested and one non-pathogenic isolate had *nec1*. The tomatinase homolog-encoding gene *tomA* was absent in some pathogenic isolates also consistent with previous studies showing that not all CS-inducing *Streptomyces* spp. are *tomA*⁺ (Wanner, 2006). Both virulence-related genes, *nec1* and *tomA*, have been reported to be present in many CS-inducing *Streptomyces* strains, but not in all, and they are not required for pathogenicity (Seipke & Loria, 2008; Wanner, 2009).

Genetic variation in the presence or absence of genes associated with the *Streptomyces* PAI element can be expected in that it is known to be horizontally transferred as a unit or in modules by site-specific recombination (Huguet-Tapia *et al.*, 2014). It is also known that pathogenicity and virulence-related gene clusters in *S. turgidiscabies* have multiple origins, and that a given PAI consists of a mosaic of regions that may undergo independent evolution (Aittamaa *et al.*, 2010).

The heterogeneous composition of PAI, and the fact that species are ever-evolving, may contribute to the emergence of new pathogenic species. This study shows that diversity of CS-inciting species in Uruguay is greater than previously thought and may include new *Streptomyces* species not previously associated with causing CS.

Streptomyces lacking *txtAB* genes in ten isolates were still able to cause CS on potato tuber disks. There have been only a few reports of pathogenic isolates that do not produce thaxtomins (Wanner, 2004; Park *et al.*, 2003a; Pánková *et al.*, 2012) and isolates seem to be rather exceptional or geographically restricted. Recently, a new CS strain of *Streptomyces* was isolated from a scab lesion on a potato grown in Iran (Cao *et al.*, 2012). The strain (GK18) was shown to induce deep pitted lesions on potato tubers but does not produce thaxtomin A. Instead, the strain was shown to produce the 18-membered polyketide macrolide borrelidin and it was demonstrated that purified borrelidin extracts exhibit phytotoxic activity. Unknown pathogenicity factors in addition to thaxtomins were recently

suggested by comparative genomic analyses of *S. scabiei* 87-22 genome sequence (Accession Number NC_013929) (Bignell *et al.*, 2010).

Our results showed that *txtAB* is not essential for pathogenicity. We therefore conclude that to distinguish between pathogenic and non-pathogenic isolates in practical situations, it is necessary to evaluate not only the presence of *txtAB* but also the presence of other pathogenicity factors and most importantly simply testing pathogenicity on plant material such as tuber discs.

In summary, a total of 85 putative pathogenic *Streptomyces* isolates were obtained from CS lesions on potato tubers and soil in Uruguay. On the basis of the phylogenetic relationships derived from *rpoB* sequences, we identified isolates primarily as *S. scabiei*/*S. stelliscabiei* and *S. acidiscabies* and some isolates could not be identified by this method. Discovery of several isolates with different subsets of the three PAI marker genes in this study suggests that variation in these markers may be relatively common.

CAPÍTULO 3

**Diversidad genética de cepas de *Streptomyces* spp.
causantes de sarna común de la papa en Uruguay**

RESUMEN

La sarna común es una importante enfermedad de la papa causada por *Streptomyces scabiei* y otras especies estrechamente relacionadas. En este trabajo se investigó la diversidad genética de una colección de cepas de *Streptomyces* spp. causantes de sarna común de la papa en Uruguay. Se analizaron 86 aislamientos pertenecientes al género *Streptomyces* obtenidos a partir de lesiones de sarna común y suelos de diferentes regiones paperas. Para ello, se utilizaron los métodos de *fingerprinting* rep-PCR (BOX y ERIC-PCR), *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) y *Multilocus Sequence Typing* (MLST). En el dendograma combinado de rep-PCR y en el MLSA se observó que los aislamientos se agruparon en 4 grupos consistentes. Los resultados obtenidos determinaron que el Grupo 2 (12 aislamientos) está estrechamente relacionados con la cepa de referencia de *S. scabiei* mientras que el Grupo 1A (10 aislamientos) se agrupa con la cepa de referencia de *S. acidiscabies*. El Grupo 1B (15 aislamientos) se agrupó en un *cluster* cercano a la cepa de referencia de *S. acidiscabies* en el MLSA pero más distante en el rep-PCR. Por otra parte, dos aislamientos que constituyen el Grupo 3 se identificaron como *Streptomyces europaeiscabiei*, siendo el primer reporte de esta especie en Uruguay. En resumen, se observó una gran diversidad genética en los aislamientos considerados y si bien no todos pudieron ser identificados, estos datos irían en consonancia con la reiterada preocupación sobre la aparición de *Streptomyces* spp. patógenos emergentes causantes de sarna común.

INTRODUCCIÓN

El género *Streptomyces*, está constituido por bacterias Gram-positivas, aerobias, filamentosas, abundantes en el suelo y bien conocidas por su capacidad de producir metabolitos secundarios biológicamente activos, en particular los antibióticos (Lin *et al.*, 1993). Curiosamente, sólo un pequeño número de especies de *Streptomyces* son conocidas por ser agentes patógenos de plantas, entre ellas las que causan sarna común en la papa (*Solanum tuberosum*) (Loria *et al.*, 1997). La sarna común (SC), es una importante enfermedad, que disminuye la calidad de los cultivos de papa en todo el mundo. La enfermedad afecta principalmente la calidad de la papa mediante la producción de lesiones necróticas superficiales, profundas y elevadas sobre la superficie del tubérculo, disminuyendo de este modo el valor del mercado (Loria *et al.*, 2006).

Streptomyces scabiei (sin. *S. scabies*) fue la primera especie descrita e históricamente ha sido considerada el principal agente causal de sarna común (Lambert & Loria, 1989a). Sin embargo, estudios taxonómicos moleculares han revelado que especies adicionales causantes de SC, como por ejemplo, *S. europaeiscabiei* y *S. turgidiscabies*, se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo (Dees *et al.*, 2013). Otras importantes especies de *Streptomyces* que causan SC han sido descritas con cierto detalle: *S. acidiscabies* causa sarna en suelos ácidos y ha sido reportado en Corea, China, Japón, América del Norte, Reino Unido, Alemania y Uruguay (Mun *et al.*, 2007; Lambert & Loria, 1989a; Song *et al.*, 2004; St-Onge *et al.*, 2008; Thwaites *et al.*, 2010; Tóth *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2010; Leiminger *et al.*, 2013; Lapaz *et al.*, 2012). *S. stelliscabiei* ha sido reportada en Francia, Estados Unidos y Alemania (Bouček-Méchiche *et al.*, 2000; Wanner, 2006; Leiminger *et al.*, 2013). *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei*, y *S. niveiscabiei* han sido aisladas en Corea (Park *et al.*, 2003a). *S. caviscabiei* fue reportada en Canadá (Faucher *et al.*, 1992, Faucher *et al.*, 1995). *S. reticuliscabiei* fue aislada en Francia y descrita por Bouček-Méchiche y colaboradores (2000).

La patogenicidad en plantas del género *Streptomyces* se basa en la producción de la toxina taxtomina, la cual induce los síntomas característicos de la SC (King *et al.*, 1989; Lawrence *et al.*, 1990; Healy *et al.*, 2000; Bignell *et al.*, 2010). La taxtomina tiene un impacto en la biosíntesis de celulosa durante la expansión de los tejidos (Scheible *et al.*, 2003). También se han reportado los genes relacionados con la virulencia *tomA* y *nec1*, los cuales están presentes en una amplio rango de cepas de *Streptomyces* que inducen SC, pero no en todas, y no son esenciales para la patogenicidad (Seipke & Loria, 2008; Wanner, 2009). El gen *nec1* codifica para una proteína que induce necrosis en el tejido vegetal, y el gen *tomA* codifica para un factor de virulencia homólogo a la tomatinasa (Bukhalid & Loria, 1997; Kers *et al.*, 2005).

En *S. turgidiscabies*, los genes de patogenicidad y virulencia se agrupan en una isla de patogenicidad (IPA), la cual puede ser transferida horizontalmente a cepas de *Streptomyces* saprofitas, resultando en la emergencia de nuevas especies patógenas (Healy *et al.*, 1999; Bukhalid *et al.*, 2002; Kers *et al.*, 2005). La IPA de *S. turgidiscabies* consiste en dos módulos que no se superponen, el primero similar a una isla genómica en *S. scabiei*, pero el otro módulo contiene sólo una pequeña región muy similar a la del genoma de *S. scabiei* (Huguet-Tapia *et al.*, 2011). Los genes asociados con la producción de taxtomina, como *txtA*, *txtB*, *txtC* y *txtR*, se encuentran en el primer segmento de la IPA, que se llama la "región toxicogénica", mientras que los genes relacionados con la virulencia, *tomA* y *nec1*, se encuentran en el segundo segmento, denominado "región de colonización" (Lerat *et al.*, 2009).

Los *Streptomyces* spp. causantes de sarna común son conocidos por ser fenotípicamente y genéticamente diversos. Los métodos convencionales empleados para estudiar la variabilidad de estas bacterias incluyen enfoques morfológicos y fisiológicos (St-Onge *et al.*, 2008). Alternativamente, los enfoques moleculares, tales como la secuenciación del ADN de los genes de interés taxonómico y funcional actualmente ofrecen una vía rápida y robusta para llevar a cabo la identificación de especies y para estudiar la variabilidad genética que puede repercutir en aspectos fisiológicos y ecológicos. De los muchos genes que son

usados para este fin, la secuencia del gen 16S ARNr, ha sido la más ampliamente utilizada (Kreuze *et al.*, 1999, Park *et al.*, 2003a; Song *et al.*, 2004). Sin embargo, debido a que este gen tiene una alta similitud de secuencia entre las especies del género *Streptomyces*, no permite una buena resolución taxonómica a nivel de especie (Labeda, 2011). Otros métodos alternativos descritos para la identificación de especies en este género son la comparación de secuencias de la región espaciadora intergénica 16S-23S, o el gen que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*) (Song *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). También se utilizan métodos de *fingerprinting* basados en la amplificación de ADN polimórfico al azar como BOX y ERIC (Clark *et al.*, 1998). En los últimos años, ha cobrado especial relevancia un nuevo método denominado *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) que consiste en la secuenciación y análisis filogenéticos de múltiples genes *housekeeping* (Guo *et al.*, 2008). Se ha demostrado que éste método ofrece una buena resolución para discriminar a nivel de especie en el género *Streptomyces* (Laskaris *et al.*, 2012; Labeda, 2011). Una ventaja del MLSA es que el uso de múltiples secuencias ayuda a amortiguar las distorsiones generadas por recombinación en la filogenia. Actualmente se cuenta con un método de MLSA para este género que utiliza cuatro genes *housekeeping* (*atpD*, *recA*, *rpoB* y *trpB*), pero aún no alcanza a diferenciar todas las especies de *Streptomyces* fitopatógenas (Labeda, 2011).

En Uruguay en el año 2010 hubo un episodio de sarna severa en el cultivo de papa con una sintomatología nunca antes registrada que causó importantes pérdidas a muchos productores (Grela, 2010). Este hecho resaltó la necesidad de conocer la identidad de las cepas causantes de sarna en nuestros suelos.

En el marco de esta tesis se generó una colección de 85 cepas de *Streptomyces* patógenas aisladas a partir de tubérculos con síntomas y suelos de varias regiones paperas de Uruguay. En el Capítulo 2 se muestran los resultados de caracterización de esta colección según la presencia o ausencia de genes marcadores de patogenicidad (*txtAB*, *nec1* y *tomA*) y ensayos de patogenicidad en discos de papa. También se realizó el análisis filogenético de secuencias parciales del gen *rpoB*, aunque mediante esta estrategia no todos los aislamientos pudieron ser identificados. El propósito del presente estudio fue avanzar en la

caracterización de la colección de aislamientos de *Streptomyces* spp. causantes de sarna común en la papa en Uruguay. En este capítulo se presenta la identificación de las especies de *Streptomyces* mediante el método de MLSA así como la evaluación de su diversidad genética mediante rep-PCR (BOX y ERIC-PCR) y MLST (*Multilocus Sequence Typing*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En la Tabla 2.2 se describen los aislamientos de *Streptomyces* spp. utilizados en este estudio obtenidos a partir de tubérculos con lesiones de sarna y suelos de diferentes regiones paperas de Uruguay (San José, Canelones y Rocha) (Capítulo 2). Entre ellos, se incluyen 85 aislamientos patógenos y 1 aislamiento no patógeno (ST1122). También se describen en esta tabla 5 cepas de referencia correspondientes a las especies *S. scabiei*; *S. stelliscabiei*; *S. europaeiscabiei*; *S. acidiscabies* y *S. turgidiscabies*. Las cepas fueron cultivadas de forma rutinaria utilizando el medio *yeast extract-malt extract* (YME) (Shirling & Gottlieb, 1966) a 28 °C durante 3 días y almacenadas a -70 °C como suspensiones de esporas e hifas en 20% (v/v) de glicerol.

Extracción de ADN genómico

Una colonia aislada y pura en medio YME agar, se inoculó en 5ml de caldo YME. El cultivo se incubó durante 2 días a 28°C y las células se centrifugaron y congelaron a -20 °C durante 20 min. El ADN genómico se aisló mediante el método descrito por Zhou y colaboradores (1996) con algunas modificaciones, las cuales se detallan en el capítulo 2. La cantidad y calidad de las preparaciones de ADN se midieron utilizando el NanoDrop, Genova Nano (Jenway) y se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C.

Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

Amplificación mediante PCR y secuenciado de los genes *housekeeping*

Para el análisis por MLSA se amplificaron y analizaron secuencias parciales de los siguientes genes: *atpD* (cadena β de la ATP sintasa), *recA* (recombinasa A), *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa) y *trpB* (subunidad B de la triptófano sintasa). La

amplificación se realizó utilizando los cebadores anteriormente descritos por Guo y colaboradores (2008) (Tabla 3.1). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 25µL conteniendo 1x *Buffer* (NH₄)₂ SO₄ (*Thermo scientific*), 3mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada cebador, 10% v/v dimetilsulfóxido (DMSO), 1,25 U de Taq polimerasa (recombinante) (*Thermo scientific*) y 25-50 ng de ADN genómico. Las condiciones del ciclo de reacción fueron llevadas a cabo según Correa (2011) (Tabla 3.1), y se utilizó un termociclador 2720 *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*, EEUU). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v) con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz UV. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones por el Servicio MacroGen (Kumchun ku, Seúl, Corea).

Análisis de filogenético

Se analizaron las secuencias de 32 aislamientos de *Streptomyces* causantes de sarna en Uruguay con diferentes características. También fueron incluidas en este análisis secuencias depositadas en la base de datos *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), de 10 especies de *Streptomyces* causantes de sarna: *S. scabiei* 87.22, *S. acidiscabies* 84-104, *S. europaeiscabiei* NRRL B-24443, *S. luridiscabiei* LMG 21390, *S. niveiscabiei* NRRL B-24457, *S. caviscabies* AS 4.1836 *S. puniscabiei* NRRL B-24456, *S. reticuliscabiei* NRRL B-24446, *S. stelliscabiei* NRRL B-24447, *S. turgidiscabies* NRRL B-24078 (causantes de sarna en la papa) y *S. ipomoeae* NRRL B-12321 (causante de sarna en el boniato). Como grupo externo para el análisis se utilizó la cepa *Streptomyces flavidofuscus* AS 4.1617 (sinónimo *Nocardiosis dassonvillei* subsp. *dassonvillei*).

Las secuencias fueron editadas y alineadas utilizando el programa BioEdit 7.0.4.1 (Hall, 1999). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando los métodos *neighbor-joining*, *maximum parsimony* y *maximum likelihood* en el programa MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011).

Los árboles resultantes y la topología fueron evaluados mediante el análisis de *bootstrap* (Hillis & Bull, 1993) basado en 1000 repeticiones. Las secuencias de los diferentes genes se analizaron individualmente y concatenadas. En todos los árboles filogenéticos y para cada método de análisis se consideraron *clusters* consistentes los que presentaban valores de *bootstrap* $\geq 70\%$ (Hillis & Bull, 1993).

Multilocus Sequence Typing (MLST)

Se realizó el análisis de MLST con las secuencias de los 4 genes utilizados en el análisis de MLSA de 16 cepas de *Streptomyces acidiscabies* aisladas en Uruguay y de la cepa de referencia *S. acidiscabies* 84-104 secuenciada y disponible en la base de datos *GenBank*. Para cada gen se verificó que las diferencias entre las secuencias de las cepas no se debiera a eventos de recombinación mediante 3 test estadísticos: *neighbour similarity score* (NSS) (Jakobsen & Easteal, 1996), *maximal chi-squared* (MaxChi) (Smith, 1992) y *pairwise homoplasy index* (PHI) (Bruen *et al.*, 2006). Posteriormente se identificaron los diferentes alelos para cada gen mediante el ingreso de las secuencias a la base de datos MLST (<http://pubmlst.org/analysis/>) utilizando la opción *non-redundant database* (NRDB). Luego se realizó un cuadro donde se encuentran los alelos de cada gen y el perfil genético o *sequence type* (ST) de cada cepa. A partir de los resultados presentados en la Tabla 3.2, se realizó un análisis con el programa *eBURST* (Feil *et al.*, 2004). Este programa permite predecir complejos clonales dentro de una población de bacterias y el genotipo fundador de estos grupos.

rep-PCR

La diversidad genética de las cepas de *Streptomyces* aisladas en Uruguay se evaluó mediante técnicas de *fingerprinting* rep-PCR (BOX y ERIC-PCR), utilizando los cebadores

BOXA1R y ERIC2/ERIC1R respectivamente (Louws *et al.*, 1995) (Tabla 3.1). Se realizó este análisis a los 86 aislamientos detallados en la Tabla 2.2. Se incluyeron en el análisis cinco cepas referencia causantes de sarna común: *S. acidiscabies* DSM41668, *S. scabiei* DSM41658, *S. turgidiscabies* DSM 41838, *S. europaeiscabiei* DSM 41802 y *S. stellescabiei* DSM 41803. Como grupo externo para la comparación de los perfiles genéticos se utilizó la cepa *Ralstonia solanacearum* UY031 (Siri *et al.*, 2011). Las amplificaciones mediante PCR se realizaron en un volumen de reacción de 25 µL, conteniendo 1x Buffer (NH₄)₂ SO₄ (*Thermo scientific*), 6mM de MgCl₂, 1,25 mM de cada dNTP, 25 pmoles de cada cebador, 10% (v/v) dimetilsulfóxido (DMSO), 2U de *Taq* polimerasa (recombinante) (*Thermo scientific*) y 25-140ng de ADN genómico. Las condiciones del ciclo de amplificación fueron basadas en Clark y colaboradores (1998) con algunas modificaciones: un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 5min; 40 ciclos repetidos de desnaturalización a 95°C durante 1min, hibridación a 50°C durante 1min y extensión a 65°C durante 4 min; y una etapa de extensión final a 65°C durante 10 minutos. Para confirmar la reproducibilidad de los resultados, las amplificaciones se realizaron por duplicado para cada cepa bacteriana utilizando extracciones de ADN diferentes. El equipo utilizado fue el termociclador 2720 *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems, EEUU*).

Los productos de PCR (12 µL) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) con 0.5 µg/mL bromuro de etidio, fotografiado bajo luz UV. Las imágenes de los geles fueron analizadas con el *Software Gel Compar 4.2* (Kortrijk, Bélgica). Las diferencias entre los patrones de bandas generados se estableció en base a la presencia (1) o ausencia (0) de cada producto de amplificación. Se construyó la matriz de similitud a partir de los datos binarios utilizando los coeficientes de Jaccard y se generaron los dendrogramas mediante el algoritmo de *clustering* UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Average*). Se realizaron árboles individuales y combinados con los datos de ERIC y BOX-PCR para una mayor discriminación de las cepas.

Tabla 3.1 Cebadores y condiciones utilizados para el análisis de cepas de *Streptomyces* mediante MLSA y rep-PCR

Gen/secuencias repetidas	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)	Programa de amplificación
secuencias BOX	BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	-	95 °C/5 min; 40X (95 °C/1 min, 50 °C/1 min, 65 °C/4 min); 65°C/10 min
secuencias ERIC	ERIC2 ERIC1R	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	-	95 °C/5 min; 40X (95 °C/1 min, 50 °C/1 min, 65 °C/4 min); 65°C/10 min
fragmento gen <i>atpD</i>	del atpDPF atpDPR	GTCGGCGACTTCACCAAGGGCAAGGTGTTCAACACC GTGAACTGCTTGGCGACGTGGGTGTTCTGGGACAGGAA	998	95 °C/5 min; 30X (95 °C/30 seg, 61 °C/30 seg, 72 °C/90 seg); 72 °C/10 min
fragmento gen <i>recA</i>	de recAPF recAPR	CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC* GCSAGGTCGGGGTTGTCCTTSAGGAAGTTGCG*	913	95 °C/5 min; 30X (95 °C/30 seg, 65 °C/30 seg, 72 °C/90 seg); 72 °C/10 min
fragmento gen <i>rpoB</i>	de rpoBPF rpoBPR	GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGC CCTCGTAGTTGTGACCCTCCACGGCATGA	994	95 °C/5 min; 30X (95 °C/30 seg, 65 °C/30 seg, 72 °C/90 seg); 72 °C/10 min
fragmento gen <i>trpB</i>	de trpBPF trpBPR	GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACAAGATCAACA TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCGCGACAGCAGGC	822	95 °C/5 min; 35X (95 °C/30 seg, 67 °C/30 seg, 72 °C/90 seg); 72 °C/10 min

(*) bases ambiguas, donde R = A/G, S = C/G; pb: pares de bases

RESULTADOS

Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

Se obtuvieron los fragmentos de los tamaños esperados para los cuatro genes *atpD*, *recA*, *rpoB* y *trpB* para 31 aislamientos de *Streptomyces*. Sin embargo, para el aislamiento ST1236 no se logró amplificar el fragmento correspondiente al gen *atpD* (Figura 3.1). Los productos de PCR fueron secuenciados directamente y se obtuvieron secuencias continuas: 496 pb de *atpD*, 504 pb de *recA*, 540 pb de *rpoB* y 571 pb de *trpB*. Las secuencias de 11 cepas de referencia causantes de sarna (AHBF01000081.1, HQ014979.1, HQ014968.1, HQ014975.1, HQ014977.1, FN554889.1, EF031272.1, EF031310.1, HQ014978.1, HQ014964.1, HQ014976.1) y el grupo externo (EF031292.1) fueron obtenidas de la base de datos *GenBank* para ser incluidas en este análisis. Durante el alineamiento múltiple de las secuencias parciales para cada gen analizado en este estudio no se encontraron gaps ni adiciones.

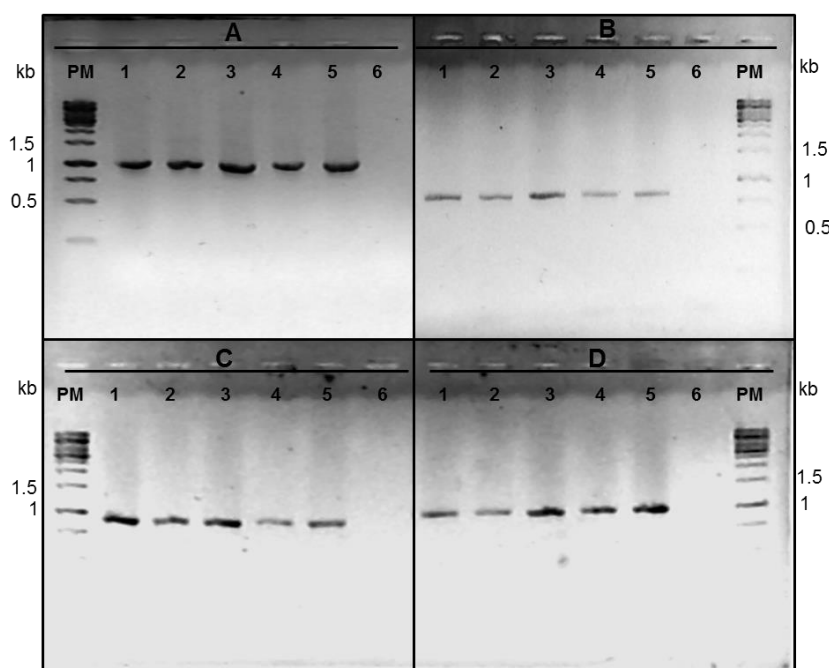


Figura 3.1. Amplificación por PCR de los genes: **A**, *atpD*; **B**, *trpB*; **C**, *recA*; **D**, *rpoB* utilizando los cebadores y condiciones detallados en la Tabla 3.1. Fotografía de un gel de agarosa al 1,5%. Carril PM: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific); Carriles 1-5: cepas de referencia de *S. acidiscabies*, *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. turgidiscabies* y *S. stelliscabiei*. Carril 6: control negativo.

Análisis filogenético de cada gen

En las Figuras 3.2 – 3.5 se muestran los árboles filogenéticos contruidos a partir del análisis de los genes *atpD*, *recA*, *rpoB* y *trpB*, los cuales revelaron una gran variabilidad genética entre los aislamientos de *Streptomyces* spp. causantes de sarna en Uruguay. En los cuatro árboles se informa para cada aislamiento la presencia (en letra mayúscula) o ausencia (en minúscula) para los siguientes genes marcadores de patogenicidad la primera **T** a la izquierda: genes involucrados en la biosíntesis de la taxtomina A, **N**: gen *nec1* y la última **T** a la derecha corresponde al gen de la tomatinasa *tomA*. La letra **p** indica que la cepa es positiva para el ensayo de patogenicidad en papa.

A partir de los análisis realizados se lograron distinguir cuatro grupos congruentes entre los árboles filogenéticos para cada gen, así como respecto al árbol construido a partir de las secuencias concatenadas. El Grupo 1A está constituido por 9 aislamientos de *Streptomyces* patógenos (ST103, ST105, ST106, ST111, ST112, ST113, ST114, ST115 y ST116) que se agrupan consistentemente (*bootstrap* entre 88-99) con la cepa de referencia de *S. acidiscabies*. Cabe destacar que estos aislamientos presentan características morfológicas y fisiológicas similares a esta especie. Por otro lado, se distingue el Grupo 1B constituido por 7 aislamientos de *Streptomyces* patógenos (ST107, ST108, ST109, ST1011, ST1013, ST1015 y ST1018) que forman un *cluster* separado, que parecería estar más relacionado con la cepa de referencia de *S. niveiscabiei* NRRL B-24457. Sin embargo, la especie *S. niveiscabiei* no tiene las características fenotípicas que poseen los aislamientos de este grupo los cuales se asemejan a las de *S. acidiscabies*.

Por otro lado, se distingue el Grupo 2 conformado por 6 aislamientos (ST1113, ST124, ST127, ST129, ST1232 y ST1236) que se agrupan consistentemente (*bootstrap* entre 82-100) junto a la cepa de referencia de *S. scabiei* y presentan características fenotípicas propias de esta especie.

El Grupo 3, constituido por los aislamientos ST1229 y ST1140 se comporta diferente. El aislamiento ST1229 en todos los árboles filogenéticos se agrupa con la cepa de referencia de

S. europaeiscabiei (*bootstrap* entre 71-99) con la que tiene características fenotípicas similares. El aislamiento ST1140 se agrupa en los árboles filogenéticos de los genes *trpB* y *recA* con la cepa de referencia de *S. europaeiscabiei* (*bootstrap* entre 80-88), en el árbol de *rpoB* muy cerca de la misma y en el árbol de *atpD* se agrupa con la cepa de *S. turgidiscabies*, igualmente siempre se encuentra muy cercano a *S. europaeiscabiei*. El aislamiento ST1140 tiene características similares a *S. europaeiscabiei* y no a *S. turgidiscabies*.

En los cuatro árboles filogenéticos generados las cepas de *S. scabiei* y *S. stelliscabiei* se pueden diferenciar. Sin embargo, las especies *S. luridiscabiei* y *S. caviscabies* se encuentran en el mismo *cluster*, no pudiéndose diferenciar en ninguno de los árboles. El aislamiento ST122 se encuentra cercano a las cepas de referencia *S. luridiscabiei* y *S. caviscabies* en los árboles de los genes *atpD*, *recA* y *rpoB*, pero no posee características fenotípicas similares a estas especies. El aislamiento ST1218 se agrupó con *S. puniscabiei* en los árboles de *recA*, *trpB* y *rpoB*, pero tampoco posee características fenotípicas de esta especie. Las cepas de referencia de *S. reticuliscabiei* y *S. turgidiscabies* se encuentran en el mismo *cluster* en los árboles filogenéticos de los genes *recA* y *rpoB*. Por último, ocho aislamientos de los 32 aislamientos totales analizados no se agruparon con ninguna cepa de referencia. Estos aislamientos presentan características fenotípicas diferentes entre sí.

Análisis filogenético con la secuencia concatenada de los cuatro genes

El árbol construido mediante el alineamiento de las secuencias parciales de los cuatro genes *housekeeping*: *atpD*, *recA*, *rpoB* y *trpB* (2111 pb) (Figura 3.6), revela la variabilidad genética entre los aislamientos de *Streptomyces* spp. patógenos analizados. En este árbol también se hace referencia a los genotipos de patogenicidad para cada aislamiento siguiendo el mismo formato que para los árboles anteriores. En el árbol se observa el Grupo 1A asociado a la cepa de referencia de *S. acidiscabies* sustentado con un *bootstrap* de 100. El Grupo 1B se asocia con la cepa de referencia de *S. niveiscabiei* con un *bootstrap* de 80, conformando un cluster muy cercano al del Grupo 1A representado por *S. acidiscabies*. El grupo 2 se asocia con la

cepa de referencia de *S. scabiei* con un *bootstrap* de 100 y los dos aislamientos del grupo 3 se agrupan con la cepa de referencia de *S. europaeiscabiei* con un *bootstrap* de 97.

Las cepas de referencia de *S. reticuliscabiei* y *S. turgidiscabies* no se logran diferenciar entre sí, al igual que *S. luridiscabiei* y *S. caviscabies*. El árbol construido con las secuencias concatenadas de los cuatro genes no puede diferenciar a todas las cepas patógenas utilizadas en este estudio.

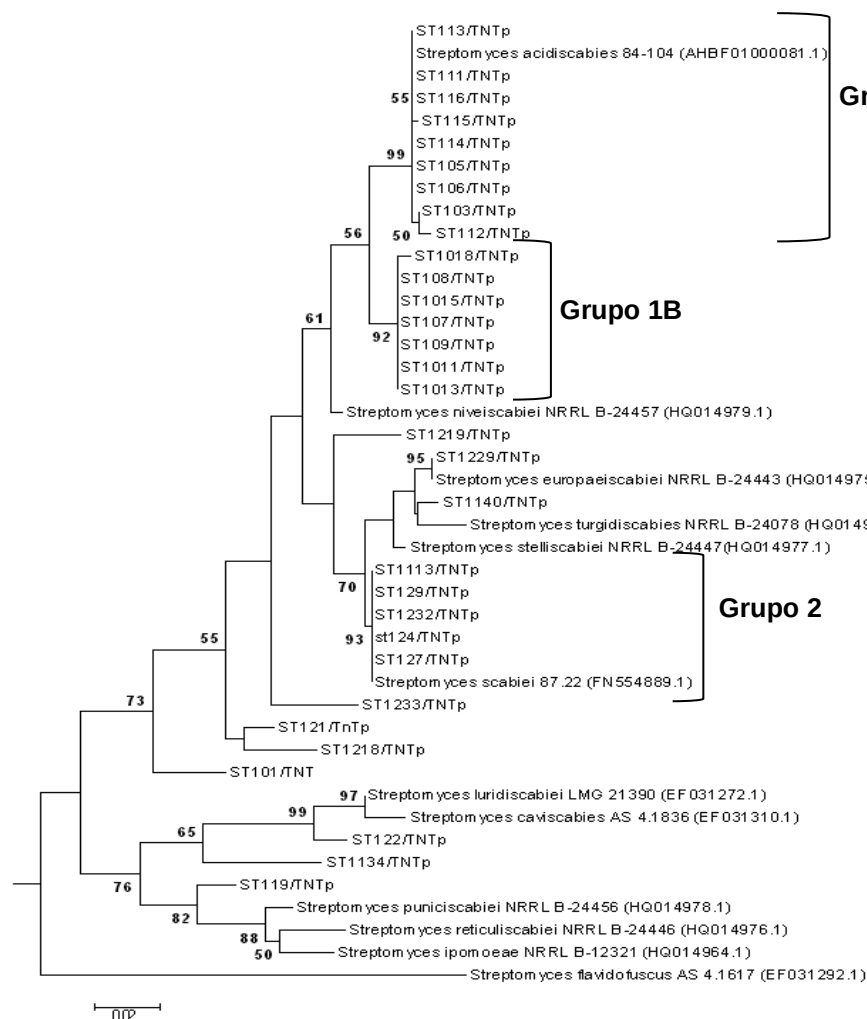


Figura 3.2. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen *atpD* (496 pb) usando el método *neighbor-joining*. Valores de *bootstrap* >50% (basados en 1000 repeticiones) se encuentran en los nodos. La barra indica 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

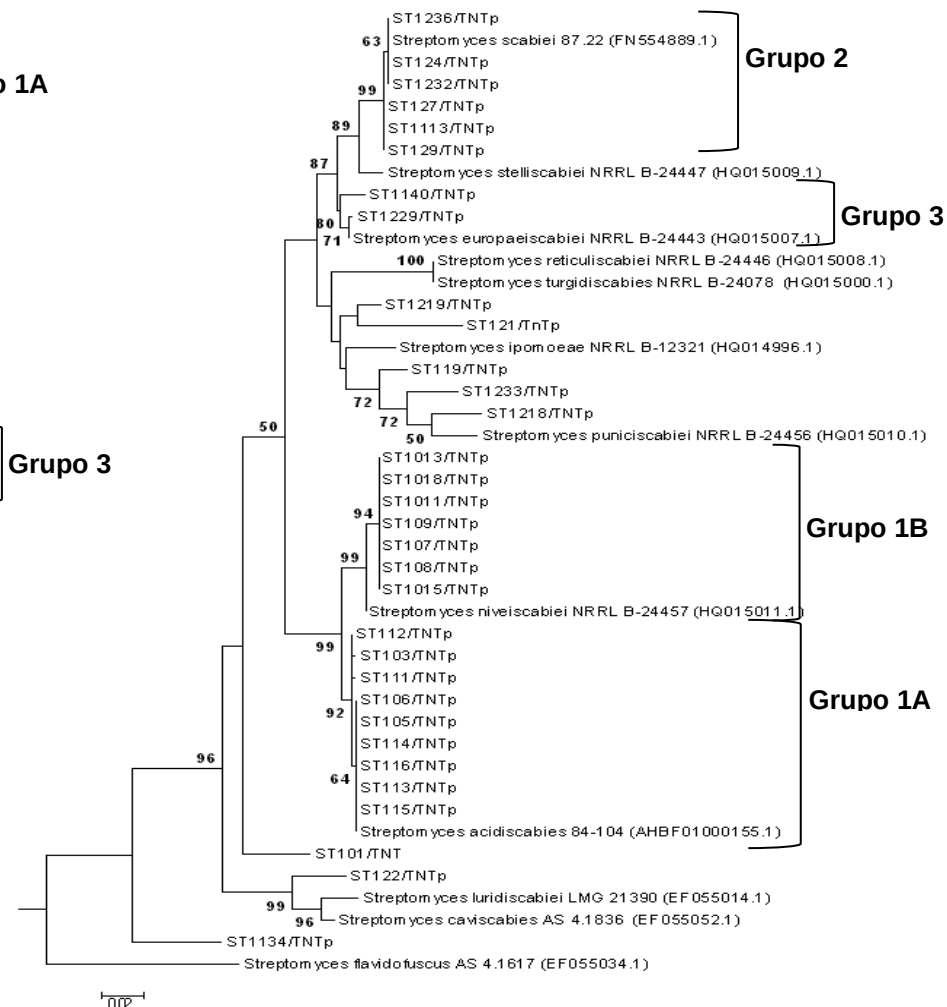


Figura 3.3. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen *recA* (504 pb) usando el método *neighbor-joining*. Valores de *bootstrap* >50% (basados en 1000 repeticiones) se encuentran en los nodos. La barra indica 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

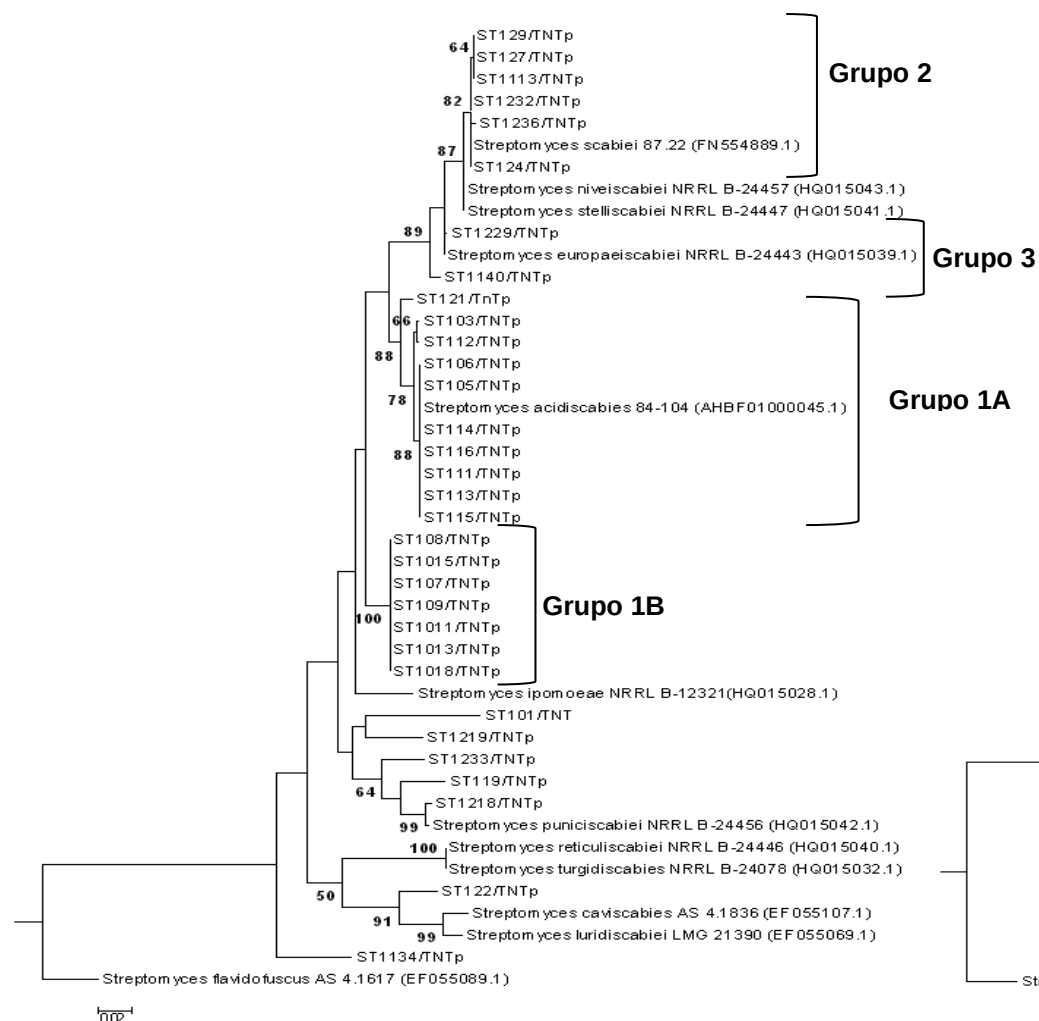


Figura 3.4. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen *rpoB* (540 pb) usando el método *neighbor-joining*. Valores de *bootstrap* >50% (basados en 1000 repeticiones) se encuentran en los nodos. La barra indica 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

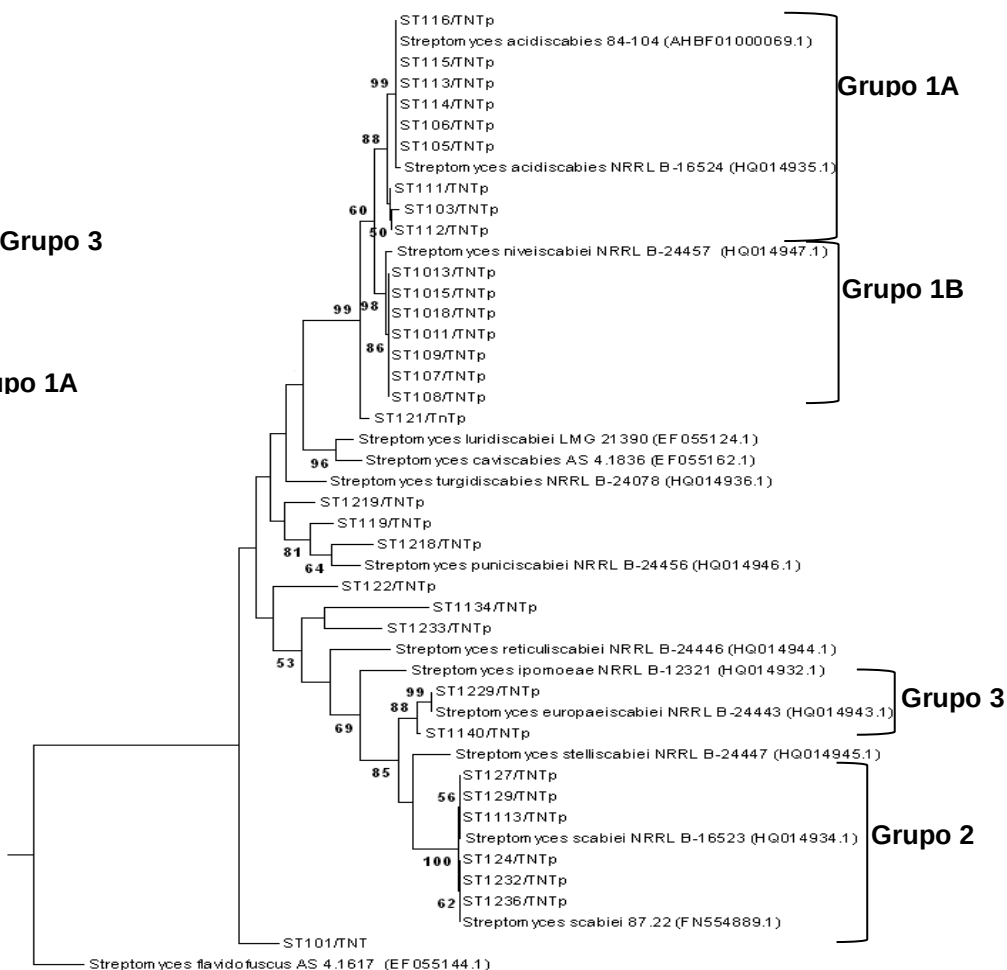


Figura 3.5. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen *trpB* (571 pb) usando el método *neighbor-joining*. Valores de *bootstrap* >50% (basados en 1000 repeticiones) se encuentran en los nodos. La barra indica 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

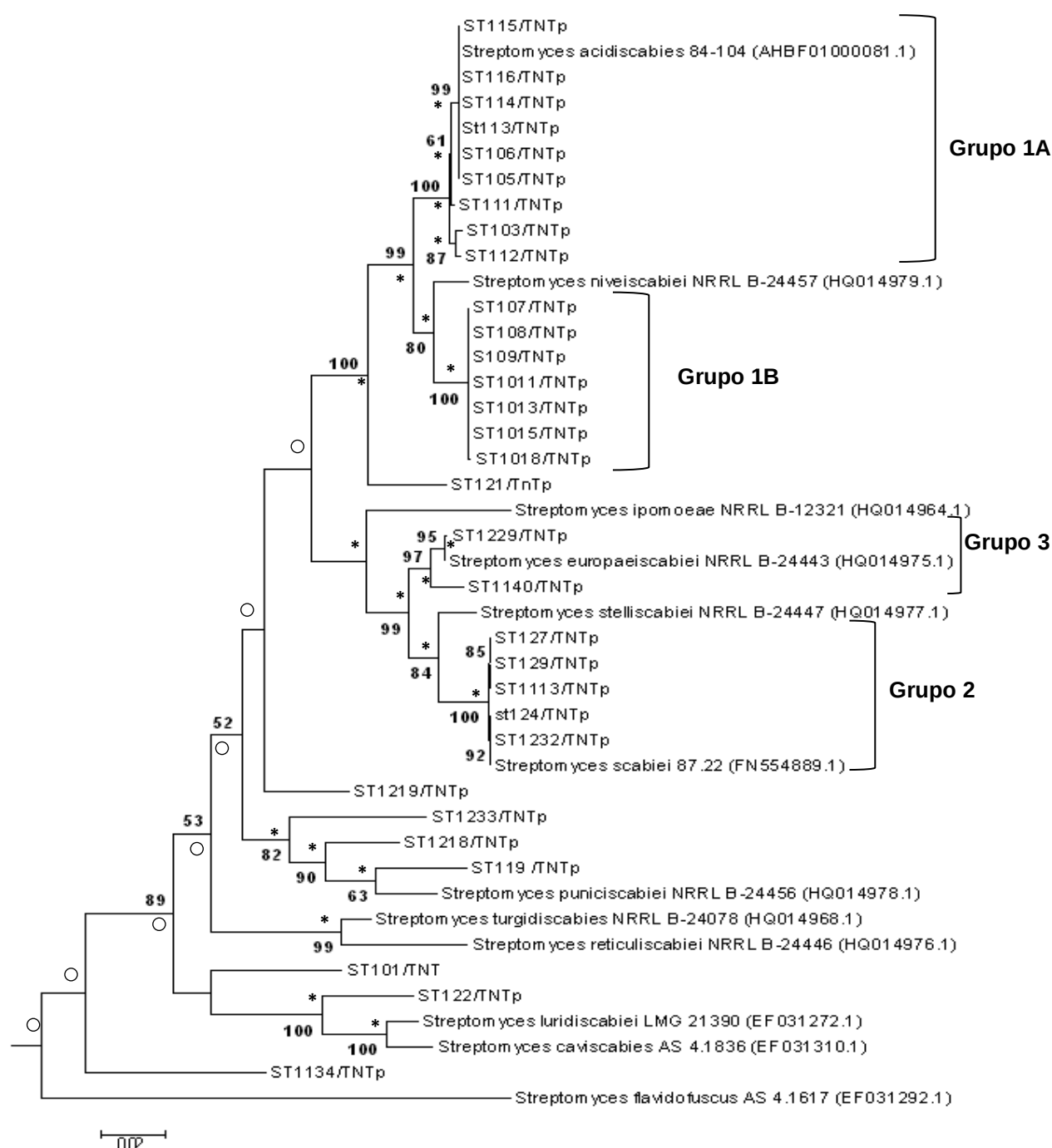


Figura 3.6. Árbol filogenético construido a partir del alineamiento de las secuencias parciales concatenadas de los cuatro genes *housekeeping atpD*, *recA*, *rpoB* y *trpB* (2111 pb en total) usando el método *neighbor-joining*. Valores de *bootstrap* >50% (basados en 1000 repeticiones) se encuentran en los nodos. Los asteriscos indican que esos nodos se reproducen en los árboles con *maximum parsimony* y *maximum likelihood*. Los círculos indican que esos nodos solo se reprodujeron en el árbol de *maximum likelihood*. La barra indica 0.02 sustituciones por posición de nucleótido. Se informa para cada aislamiento la presencia (en letra mayúscula) o ausencia (en minúscula) para los siguientes genes marcadores de patogenicidad la primera **T** a la izquierda: genes involucrados en la biosíntesis de la taxotomina A, **N**: gen *nec1* y la última **T** a la derecha corresponde al gen de la tomatinasa *tomA*. La letra **p** indica que la cepa es positiva para el ensayo de patogenicidad en papa.

Multilocus Sequence Typing (MLST)

Las secuencias de los 16 aislamientos que constituyen el Grupo 1A y el Grupo 1B junto con la cepa de referencia de *S. acidiscabies* 84-104, fueron sometidas al análisis de MLST. Al alineamiento múltiple de las secuencias de cada gen se le realizaron los test estadísticos NSS, MaxChi y PHI, para verificar si las secuencias de estos cuatro genes habían sufrido eventos de recombinación. Si el p-valor para cada test es < 0.05 es probable que haya eventos de recombinación en el conjunto de secuencias. Para el conjunto de secuencias de los genes *rpoB* y *recA* el resultado obtenido en todos los test de p-valor fue mayor a 0.05 por lo que no sufrieron recombinación. Sin embargo para el conjunto de secuencias de los genes *atpD* y *trpB* para los test NSS y PHI el p-valor fue mayor a 0.05, mientras que para el test MaxChi fue menor a 0.05 (Tabla 3.2). Por lo tanto asumimos que los conjuntos de secuencias para los cuatro genes *housekeeping* no sufrieron eventos de recombinación.

Tabla 3.2. Resultados de los test estadísticos para verificar si existe eventos de recombinación entre las secuencias de cada gen.

Alineamiento del gen	Test estadísticos		
	NSS (<i>p-valor</i>)	MaxChi (<i>p-valor</i>)	PHI (<i>p-valor</i>)
<i>atpD</i>	1.65e-01	0.00e+00*	8.49e-01
<i>trpB</i>	8.63e-01	1.00e-03*	2.80e-01
<i>rpoB</i>	7.26e-01	5.04e-01	8.64e-01
<i>recA</i>	1.47e-01	3.43e-01	3.70e-01

*p-valor<0.05

Mediante el ingreso de las secuencias alineadas para cada gen a la base de datos MLST (<http://pubmlst.org/analysis/>) y utilizando la opción *non- redundant database* se obtuvieron los distintos alelos (diferentes secuencias) para cada gen. Para el gen *atpD* se detectaron 7 alelos, los cuales se numeraron del 1-7. Para el gen *recA* se detectaron 5 alelos enumerados del 1-5. Para los genes *rpoB* y *trpB* se detectaron 5 alelos para cada uno, los cuales se enumeran del 1-5. El conjunto de alelos de cada aislamiento forma el perfil alélico

designado como *sequence type* (ST). Se identificaron 8 perfiles alélicos dentro de los 16 aislamientos (Tabla 3.3). Las aislamientos ST106, ST105, ST113, ST114 y ST116 tuvieron el mismo perfil alélico (ST1) que la cepa de referencia de *S. acidiscabies* 84-104, por lo que podrían constituir la misma cepa. La cual fue aislada de las tres lesiones observadas (superficial, profunda y elevada) en los departamentos de San José en el 2010 y en el departamento de Rocha en el 2010 y 2011.

Los aislamientos ST107, ST109, ST1011, ST013 y ST1015 tienen el mismo perfil alélico (ST3) por lo que podrían constituir la misma cepa. Ésta fue aislada en los departamentos de San José y Canelones durante el 2010 a partir de lesiones profundas. Los aislamientos ST103, ST108, ST111 y ST112 provenientes de Rocha, el aislamiento ST115 proveniente de Rocha y el aislamiento ST1018 proveniente de Canelones, tienen perfiles alélicos diferentes por lo que son diferentes cepas de *Streptomyces acidiscabies*.

Tabla 3.3. Número de alelo de cada gen y número de perfil alélico para cada aislamiento.

Aislamiento/ Cepa	<i>atpD</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>trpB</i>	Perfil alélico/ ST
<i>S. acidiscabies</i> 84-104	1	1	1	1	1
ST106	1	1	1	1	1
ST113	1	1	1	1	1
ST114	1	1	1	1	1
ST116	1	1	1	1	1
ST105	1	1	1	1	1
ST115	7	1	1	1	2
ST107	2	2	2	2	3
ST109	2	2	2	2	3
ST1011	2	2	2	2	3
ST1013	2	2	2	2	3
ST1015	2	2	2	2	3
ST108	2	2	4	2	4
ST1018	4	2	2	2	5
ST103	3	3	3	3	6
ST111	5	4	1	4	7
ST112	6	5	5	5	8

La tabla 3.3 fue analizada mediante el programa eBURST (Figura 3.7). Este programa agrupó los perfiles alélicos de los aislamientos de *S. acidiscabies* en dos complejos clonales (CC) (Grupo 1 o CC1 y Grupo 2 o CC2) y tres individuales (*Singletons*). En el complejo clonal 1 (CC1) se agruparon los perfiles alélicos ST3, ST4 y ST5. Los aislamientos con estos perfiles son los pertenecientes al Grupo 1B en los análisis filogenéticos anteriores. En éste complejo se predijo como perfil alélico fundador al ST3.

En el complejo clonal 2 (CC2) se agruparon los perfiles genéticos ST1 y ST2. Para este complejo clonal no se predijo ningún perfil alélico fundador.

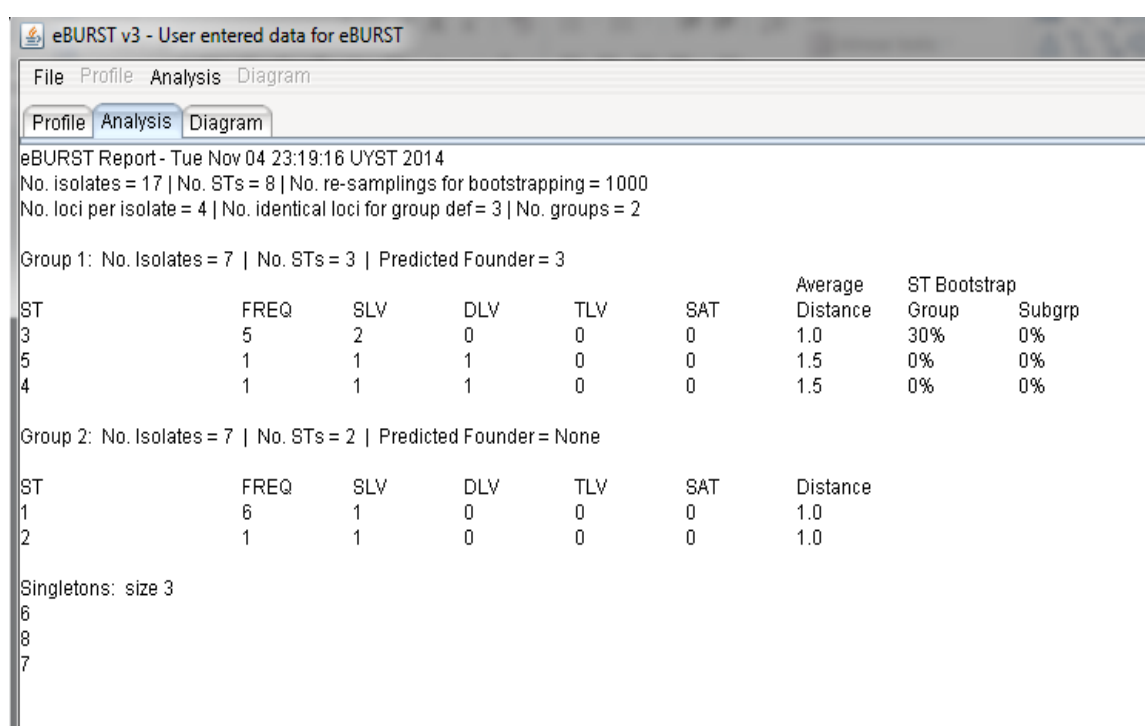


Figura 3.7. Resultados obtenidos mediante el programa *eBurst* para los aislamientos de *S. acidiscabies* y la cepa de referencia *S. acidiscabies* 84-104.

Genotipado utilizando rep-PCR

Las técnicas de BOX y ERIC-PCR fueron utilizadas para analizar la variabilidad genética entre las 85 aislamientos de *Streptomyces* spp. causantes de sarna común en la papa en Uruguay, un aislamiento no patógeno (ST1122) que poseía el gen *nec1* y 5 cepas de referencia. Los árboles realizados por duplicado de cada aislamiento presentaron topologías similares en las dos técnicas de rep-PCR. En el dendograma combinado (Figura 3.8) se observa una gran diversidad entre los aislamientos de *Streptomyces* spp. patógenos. Este método permitió discriminar muy bien las 5 cepas de referencia utilizadas: *S. acidiscabies*, *S. scabiei*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei* y *S. stelliscabiei*. El análisis de agrupamiento de los patrones de bandas, reveló cuatro grupos importantes. El Grupo 1A está constituido por aislamientos que se habían identificado previamente como *S. acidiscabies* y se agrupan con la cepa de referencia de la misma especie. Por otro lado el Grupo 1B está constituido por aislamientos que se habían identificado previamente como *S. acidiscabies* mediante el método de secuenciado del *rpoB*, pero que en base al análisis por MLSA conformaron un cluster diferenciado cercano a esta especie. Del análisis por rep-PCR también se desprende que estos aislamientos forman un cluster diferente, confirmando entonces que no pertenecen a la especie *S. acidiscabies*. Por otro lado el Grupo 2 está constituido por aislamientos que se habían identificado como *S. scabiei* por el método de MLSA y como *S. scabiei* / *S. stelliscabiei* por el método del secuenciado del *rpoB*. En este grupo se encuentra la cepa de referencia de *S. scabiei*, lo que se confirma que estos aislamientos pertenecen a esta especie. El Grupo 3 está constituido por el aislamiento ST1219 el cual se agrupa con la cepa de referencia de *S. europaeiscabiei*, lo cual confirma su identidad.

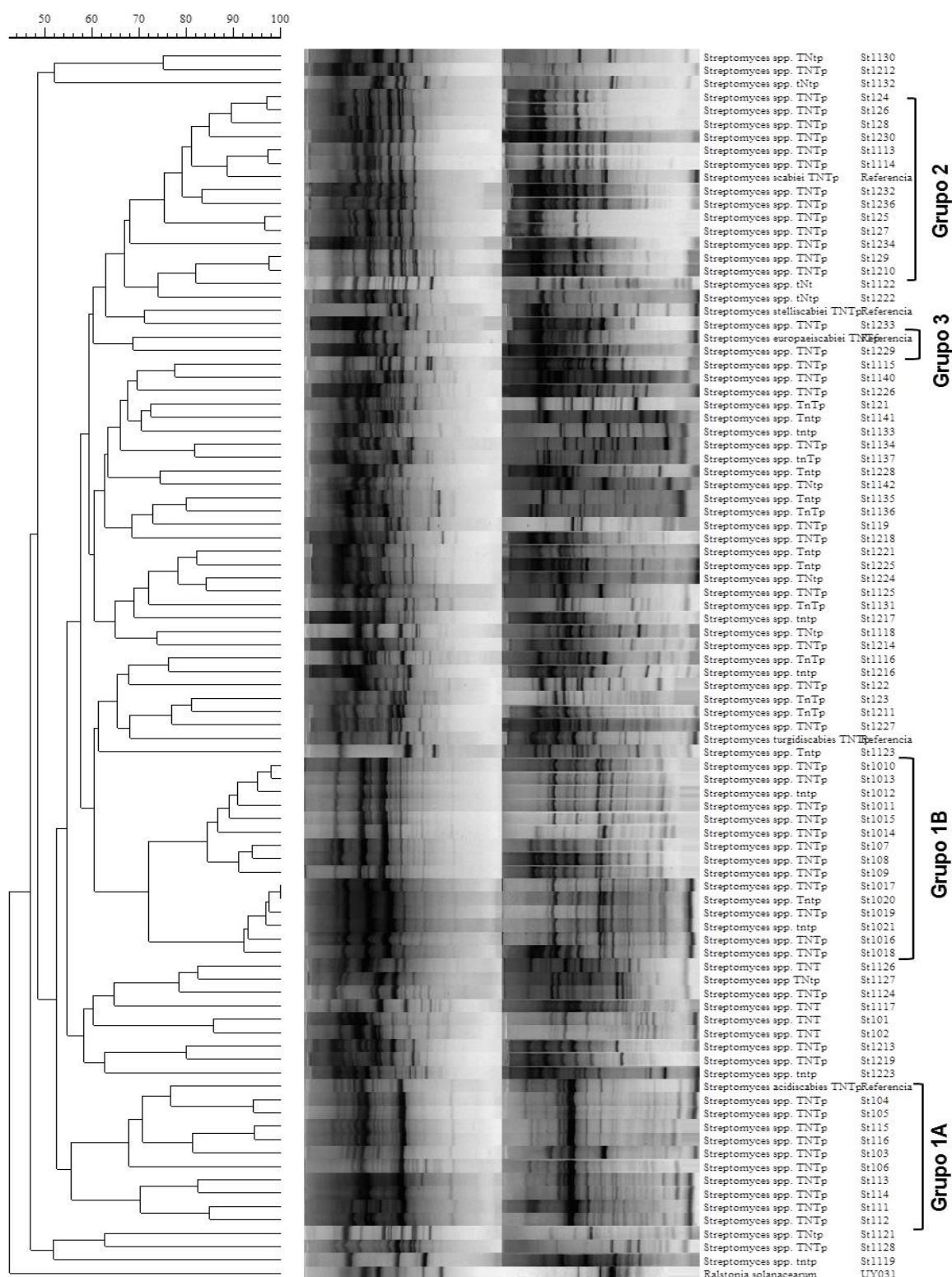


Figura 3.8. Dendrograma combinado basado en BOX y ERIC-PCR de 86 aislamientos de *Streptomyces* spp. aisladas en Uruguay creado usando UPGMA clustering con los valores de los coeficientes Jaccard. Se incluyeron 5 cepas de referencia. En el dendrograma se informa para cada aislamientos la presencia (en letra mayúscula) o ausencia (en minúscula) para los siguientes genes marcadores de patogenicidad **T**: genes involucrados en la biosíntesis de la taxtomina A, **N**: gen *nec1* y la última **T** corresponde al gen *tomA*. La letra **p** indica que el aislamiento es positivo para el ensayo de patogenicidad en papa.

DISCUSIÓN

La sarna en la papa es una enfermedad distribuida mundialmente. Esta enfermedad es causada por diferentes especies del género *Streptomyces*, las cuales son ubicuas en el suelo y son conocidas como importantes patógenos de plantas. *S. scabiei* ha sido reconocido como el agente principal causante de sarna, debido a su amplia distribución (Hosaka *et al.*, 2000). Sin embargo, otras especies causantes de SC han sido identificadas a partir de una o más ubicaciones geográficas en el mundo (Bouчек-Méchiche *et al.*, 2000; Lehtonen *et al.*, 2004; Wanner, 2009). Los primeros informes de SC como una enfermedad de importancia económica en Uruguay se hicieron por Grela (2010). En el marco de esta tesis, se generó una colección de aislamientos de *Streptomyces* spp. causantes de sarna común en diferentes regiones paperas de Uruguay, los cuales fueron identificados como *S. scabiei* / *S. stelliscabiei* y *S. acidiscabies* utilizando el método de secuenciado del gen *rpoB* (Capítulo 2).

En este capítulo, se profundizó en la identificación de estos aislamientos y en la evaluación de su diversidad genética mediante los métodos de MLSA/MLST y rep-PCR (BOX y ERIC-PCR).

Los resultados obtenidos sugieren que los aislamientos de *Streptomyces* causantes de SC de la papa en Uruguay estudiados son genéticamente diversos. La prevalencia de especies de *Streptomyces* filogenéticamente distintas, capaces de causar síntomas de sarna fue descrita por Loria y colaboradores (2006). Se han reportado en varios sistemas agrícolas el surgimiento de nuevas especies patógenas, diferentes a la especie ampliamente distribuida *S. scabiei*. Los resultados del presente estudio confirman que diferentes especies dentro del género *Streptomyces* pueden causar SC de la papa.

El análisis de MLSA permitió discriminar las especies *S. scabiei* y *S. stelliscabiei* e identificar aislamientos como *S. scabiei*, los cuales habían sido previamente identificados como *S. scabiei*/ *S. stelliscabiei*. Esta especie está distribuida mundialmente y es dominante en

EEUU (Dees & Wanner, 2012). Todos los aislamientos de *S. scabiei* analizados poseían los tres genes marcadores de patogenicidad.

Los aislamientos previamente identificados como *S. acidiscabies* mediante el secuenciado del gen *rpoB*, se dividieron por el MLSA, en 2 grupos. Mientras que el Grupo 1A se asocia con la cepa de referencia de *S. acidiscabies*, el Grupo 1B se asocia con la cepa de referencia de *S. niveiscabiei*.

Estos grupos también pudieron ser diferenciados en base al análisis por MLST, estrategia que permite tipificar los aislamientos pertenecientes a una misma especie. Cuando múltiples aislamientos tienen perfiles alélicos idénticos son clones y pertenecen a la misma cepa. Se denomina complejo clonal a un grupo de aislamientos que tienen perfiles alélicos similares (Feil & Spratt, 2001). El Grupo 1B formó el complejo clonal 1 que incluyó los perfiles alélicos ST3, ST4 y ST5 mientras que el Grupo 1A formó el complejo clonal 2 constituido por la cepa de referencia de *S. acidiscabies* y los perfiles alélicos ST1, ST2. Algunos aislamientos con perfiles genéticos ST6, ST7 y ST8 no formaron ningún complejo clonal.

Mediante el MLST se pudo observar que hay 3 cepas diferentes dentro de los aislamientos analizados para el Grupo 1B y 5 cepas diferentes para los aislamientos analizados del Grupo 1A.

El perfil alélico ST1 está formado por los aislamientos ST105, ST106, ST113, ST114, ST116 y la cepa de referencia de *S. acidiscabies* 84-104. Esta cepa de referencia fue aislada desde tubérculos con sarna común en *New York* en el año 1984 y actualmente se encuentra disponible el borrador de su genoma en la base de datos *GenBank* (Huguet-Tapia & Loria, 2012). A partir de este resultado se podría decir que estos aislamientos pertenecen a la misma cepa. Esta cepa fue aislada durante los años 2010 y 2011 en los departamentos de San José y Rocha, por lo cual se encuentra distribuida en dos de las principales regiones paperas del país. El ingreso al país podría haber sido mediante la importación de papa semilla considerada la principal fuente de inóculo debido a que esta especie no es capaz de sobrevivir en el campo durante largos periodos de tiempo (Lambert & Loria, 1989a). Por otro lado, esta cepa fue capaz de provocar los tres síntomas observados (superficiales,

profundos y elevados), lo que confirma que los síntomas no están asociados a una especie en particular (Loria *et al.*, 1997; Dees *et al.*, 2013).

Aislamientos de *S. europaeiscabiei* fueron identificados mediante el método de MLSA lo que constituye el primer reporte de esta especie patógena en Uruguay. *S. europaeiscabiei* es dominante en Europa (Bouchek-Mechiche *et al.*, 2000; Flores-Gonzalez *et al.*, 2008; Leiminger *et al.*, 2013; Dees *et al.*, 2013), pero también se ha reportado en Canadá, Corea y Estados Unidos (Song *et al.*, 2004; Wanner, 2006).

Mediante el análisis de rep-PCR se lograron diferenciar las cinco especies utilizadas como referencia: *S. acidiscabies*, *S. scabiei*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei* y *S. stelliscabiei*, por lo cual este método permite discriminar muy bien entre estas especies. Se observaron cuatro grupos importantes: el Grupo 2 que ésta constituido por aislamientos de *S. scabiei* los cuales se agrupan con su respectiva cepa de referencia, el Grupo 3 constituido por un aislamiento y la cepa de referencia *S. europaeiscabiei*. Por otro lado se volvieron a diferenciar los Grupos 1A y 1B. Los aislamientos del Grupo 1A se agruparon con la cepa de referencia de *S. acidiscabies*, mientras que el Grupo 1B se alejó bastante de ésta. Este resultado junto con los resultados observados para el Grupo 1B en el MLSA sugieren que este grupo de aislamientos pertenecen a una especie causante de sarna común no reportada hasta el momento.

Por otro lado, mediante los análisis realizados por los métodos de MLSA y el rep-PCR se constata la gran diversidad de aislamientos patógenos que aún no se han podido identificar. Esto sugeriría que habría posibles patógenos emergentes que causan sarna común quizás a causa de la transferencia horizontal de islas de patogenicidad (IPA) desde *Streptomyces* patógenos a *Streptomyces* saprofitos (Healy *et al.*, 1999; Bukhalid *et al.*, 2002; Kers *et al.*, 2005).

Por otro lado, queda en evidencia que, para la identificación de especies causantes de sarna común, es necesario utilizar diferentes métodos. En base a los resultados obtenidos en esta tesis, el mejor método sería el *Multilocus Sequence Analysis* (Labeda, 2011), debido a que permite discriminar entre la mayoría de las especies de *Streptomyces* causantes de

sarna común. Sin embargo, este método aún tiene algunas desventajas, ya que algunas especies no han podido ser discriminadas entre sí en este estudio, como por ejemplo, el par *S. luridiscabiei* y *S. caviscabies*. Por otra parte, el par *S. reticuliscabiei* y *S. turgidiscabies* no pudo ser diferenciado en el árbol concatenado pero sí se diferencia con los árboles individuales *trpB* y *atpD*. Esto indicaría que para identificar estas especies es necesario realizar los árboles filogenéticos para éstos genes.

En conclusión, este estudio demuestra que continúa siendo muy difícil identificar especies causantes de sarna común en la papa, ya que no se cuenta con un método rápido que sea capaz de diferenciar todas las especies.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

La sarna común de la papa es una enfermedad bacteriana compleja, con diversidad de síntomas, de agentes causales y de difícil control.

El propósito de esta tesis consistió en generar conocimiento sobre el tipo de cepas de *Streptomyces* spp. que afectan los cultivos de papa en Uruguay como prerrequisito para desarrollar e implementar estrategias de control eficientes. A continuación se resumen e integran los principales resultados obtenidos.

Este trabajo representa el estudio más extenso en *Streptomyces* spp. causantes de sarna común aislados de las principales regiones paperas de Uruguay. El estudio comenzó buscando dilucidar el origen de las grandes pérdidas ocasionadas por la enfermedad en los cultivos de papa durante la zafra de otoño de 2010. Las muestras de tubérculos con sarna y de suelos de regiones paperas fueron obtenidas a partir del año 2010 y hasta el año 2012.

Según el relevamiento realizado, los *Streptomyces* causantes de sarna en Uruguay son muy diversos con respecto a sus características fenotípicas, genéticas y a su patogenicidad. La identificación se realizó mediante el secuenciado del gen *rpoB* y el método de *Multilocus Sequence Analysis* y se identificaron las especies patógenas *S. scabiei*, *S. acidiscabies* y *S. europaeiscabiei*. Según este estudio, el método de MLSA fue el mejor para identificar las especies de *Streptomyces* patógenas, ya que puede discriminar a la mayoría de las especies. Por lo tanto, hasta el momento, éste sería la mejor opción para identificar los agentes causales de sarna común.

Por otra parte, el método de MLST aplicado a los aislamientos de *S. acidiscabies* demostró diversidad entre los aislamientos analizados. Se determinó que algunos aislamientos poseían el mismo perfil genético de la cepa de referencia de *S. acidiscabies* 84-104 aislada en Estados Unidos en 1984. Una razón que explicaría esto, podría ser el control sanitario de papa semilla que se realiza para esta enfermedad, que, en nuestro país, como en otros, se trata de un control visual, que además, autoriza el ingreso de papa-semilla con algunos síntomas, por lo que podría estar posibilitando la entrada de patógenos.

Lo más preocupante es la gran diversidad genética constatada entre los aislamientos patógenos, muchos de los cuáles no pudieron ser identificados. En el estudio por el método de MLSA se utilizaron secuencias del banco de datos *GenBank* que cubrían la mayoría de las especies causantes de sarna reportadas hasta el momento. Por tanto, los aislamientos no identificados podrían tratarse de especies causantes de sarna común no reportadas. La gran diversidad de cepas que poseen los genes involucrados en la patogenicidad analizados y son patógenas en papa, indicaría la presencia de patógenos emergentes del género *Streptomyces* en nuestros suelos. Además, dado que algunos aislamientos no pudieron ser identificados podría tratarse de potenciales patógenos emergentes aún no reportados.

El hecho de que los cultivos estén afectados por diversas especies patógenas con una gran variabilidad, no es alentador en lo que se refiere a las posibilidades de lograr un control efectivo de la enfermedad a través del uso de variedades de papa resistentes.

Actualmente, algunos grupos utilizan la toxina taxtomina A para seleccionar variedades resistentes en programas de mejoramiento (Wilson *et al.*, 2010). Este mecanismo sería eficaz si la patogenicidad estuviera asociada siempre a la presencia de esta toxina. Sin embargo y tal como ha sido descrito en la literatura, hemos demostrado dentro de nuestra colección, la presencia de algunos aislamientos patógenos que no poseen los genes involucrados en la biosíntesis de la taxtomina. Bignell y colaboradores (2014) sugieren que existen múltiples metabolitos secundarios fitotóxicos que estarían jugando un rol en el fenotipo patogénico de *Streptomyces* spp. en el medio ambiente y que no siempre las taxtominas estarían participando en el desarrollo de la enfermedad de la SC. Esto hace de vital importancia la búsqueda de nuevos determinantes de patogenicidad en especies de *Streptomyces* causantes de sarna común.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Esta tesis permitió generar información sobre el tipo de cepas de *Streptomyces* spp. que afectan los cultivos de papa en Uruguay. Sin embargo, como sucede en la mayoría de las investigaciones, los avances alcanzados generan nuevas preguntas que quedan por responder. A continuación se describen las perspectivas que surgen a partir de la información y experiencia generadas en estos años de trabajo, las cuales espero continuar desarrollando en el futuro en el marco de nuevas investigaciones.

La sarna común es una importante enfermedad en los cultivos de papa en todo el mundo. La aparición en los últimos años de patógenos emergentes hace necesario conocer el potencial patogénico de cepas con diferente localización geográfica. Poseemos una colección de 85 cepas patógenas de *Streptomyces* aisladas de papa y suelo que posee gran diversidad genética y gran diversidad con respecto a la patogenicidad dado los estudios realizados a partir de los genes de patogenicidad detectados y el test de patogenicidad en discos de papa. Debido a la diversidad en nuestras cepas y a la preocupación por la aparición reciente de patógenos emergentes del género *Streptomyces*, deseamos conocer el potencial patogénico de las cepas aisladas en nuestro país, los factores de virulencia que presentan, sean éstos los ya descritos o nuevos factores y la capacidad de estas cepas para realizar transferencia horizontal. En particular, nos interesa conocer si está presente en nuestras cepas la isla de patogenicidad que ha sido descrita en *S. turgidiscabies* o remanentes de ésta que se han encontrado en otras especies y su genotipo, debido a que este elemento puede llegar a transferirse horizontalmente e integrarse en genomas de cepas saprofitas dando lugar a patógenos emergentes. Por tanto, resulta de gran interés para nosotros, como para el grupo de la Dra. Loria en la Universidad de Florida (EEUU), estudiar cuales serían los posibles factores de virulencia en estas cepas y conocer la diversidad de la isla de patogenicidad asociada al fenotipo y su distribución geográfica.

Por otra parte, estamos interesados en mejorar el sistema MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) para la identificación de especies patógenas del género *Streptomyces*. Mediante éste método se identificaron aislamientos como *S. acidiscabies*, *S. scabiei* y *S. europaeiscabiei*. Este es el primer reporte de *S. europaeiscabiei* como especie patógena de papa en Uruguay.

Los resultados en ésta tesis permitieron concluir que el método MLSA es el más efectivo para identificar especies de este género ya que posee la ventaja de amortiguar las distorsiones generadas por recombinación en la filogenia. Sin embargo, el método existente de MLSA, basado en el secuenciado de cuatro genes *housekeeping* (*atpD*, *recA*, *rpoB* y *trpB*) no alcanza a discriminar entre algunas de las especies patógenas. Estudios genómico comparativos proyectados a realizar próximamente, permitirán proponer nuevos genes pertenecientes al Genoma Core para incorporar al MLSA existente e identificar mejor las distintas especies de *Streptomyces* patógenos. Esperamos evaluar la solidez de los nuevos genes que sean propuestos utilizando cepas de referencia de las distintas especies patógenas ya descritas así como las cepas patógenas de nuestra colección. De esta forma pensamos aportar a mejorar la dificultosa identificación de este complejo de especies.

CAPÍTULO 6

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ANEXOS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams MJ, Lapwood DH, 1978. Studies on the lenticel development, surface microflora and infection by common scab (*Streptomyces scabies*) of potato tubers growing in wet and dry soils. *Annals of Applied Biology* **90**, 335-43.
- Agrios GN, 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press. Cap. 12: 675-674.
- Aittamaa M, Somervuo P, Laakso I, Auvinen P, Valkonen JPT, 2010. Microarray-based comparison of genetic differences between strains of *Streptomyces turgidiscabies* with focus on the pathogenicity island. *Molecular Plant Pathology* **11**, 733-46.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-402.
- Babcock MJ, Eckwall EC, Schottel JL, 1993. Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *Journal of General Microbiology* **139**, 1579-86.
- Beauséjour J, Clermont N, Beaulieu C, 2003. Effect of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76 and of chitosan on common scab of potato. *Plant and soil* **256**, 463-8.
- Berdy J, 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics* **58**, 1-26.
- Bignell DR, Huguet-Tapia JC, Joshi MV, Pettis GS, Loria R, 2010. What does it take to be a plant pathogen: genomic insights from *Streptomyces* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **98**, 179-94.
- Bignell DR, Fyans JK, Cheng Z, 2014. Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *Journal of Applied Microbiology* **116**, 223-35.
- Bukhalid RA, Loria R, 1997. Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative pathogenicity factor. *Journal of bacteriology* **179**, 7776-83.
- Bukhalid RA, Chung SY, Loria R, 1998. *nec1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 960-7.
- Bukhalid RA, Takeuchi T, Labeda D, Loria R, 2002. Horizontal transfer of the plant virulence gene, *nec1*, and flanking sequences among genetically distinct *Streptomyces* strains in the Diastatochromogenes cluster. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 738-44.
- Bouchek-Mechiche K, Gardan L, Normand P, Jouan B, 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 91–9.
- Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn A, 2002. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**, 889-92.
- Bowyer P, Clarke BR, Lunness P, Daniels MJ, Osbourn AE, 1995. Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science* **267**, 371-4.
- Bruen TC, Philippe H, Bryant D, 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* **172**, 2665-81.
- Cancino LS, 2003. *Evaluación del daño causado por Streptomyces scabies (Thaxter) sobre tubérculos de papa (Solanum tuberosum ssp. tuberosum Hawkes.) durante el almacenaje*. Chile: Universidad Austral de Chile. Tesis de grado.
- Cao Z, Khodakaramian G, Arakawa K, Kinashi H, 2012. Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **76**, 353–7.
- Cipar MS, Lawrence CH, 1972. Scab resistance of haploids from two *Solanum tuberosum* cultivars. *American Potato Journal* **49**, 117-9.
- Clark CA, Chen C, Ward-Rainey N, Pettis GS, 1998. Diversity within *Streptomyces ipomoeae* based on inhibitory interactions, rep-PCR, and plasmid profiles. *Phytopathology* **88**, 1179-86.
- Cullen DW, Lees AK, 2007. 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. *Journal of applied microbiology* **102**, 1082-94.
- Correa D, 2011. *Caracterização morfológica, patogênica e molecular de linhagens de Streptomyces associadas à sarna da batata de diferentes regiões produtoras do Brasil*. Campinas, Brasil: Universidade Estadual de Campinas.
- Davis JR, Garner JG, Callihan RH, 1974. Effects of gypsum, sulfur, terraclor and terraclor super-x for potato scab control. *American Potato Journal* **51**, 35-43.
- Davis JR, McMaster GM, Callihan RH, Nissley FH, Pavek JJ, 1976. Influence of soil moisture and fungicide treatments on common scab and mineral content of potatoes. *Phytopathology* **66**, 228-33.
- Dees MW, Wanner LA, 2012. In search of better management of potato common scab. *Potato Research* **55**, 249-68.

- Dees MW, Sletten A, Hermansen A, 2013. Isolation and characterization of *Streptomyces* species from potato common scab lesions in Norway. *Plant Pathology* **62**, 217-25.
- 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;,"](http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,111,O,S,0,MNU;E:42;7;MNU;,)]. Accedido el 20 de Junio de 2011.
- DIEA, DIGEGRA, 2013. Encuesta de papa "Otoño 2013". [[file:///C:/Users/jhon/Downloads/COMPLETA%20\(5\).pdf](file:///C:/Users/jhon/Downloads/COMPLETA%20(5).pdf)]. Accedido el 30 de Octubre de 2014.
- DIEA, MGAP, 2013. Anuario Estadístico Agropecuario. [<http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2013,O,es,0,>]. Accedido el 30 de Octubre de 2014.
- Douches DS, Jastrzebski K, Coombs J, Chase RW, Hammerschmidt R, Kirk WW, 2001. Liberator: A round white chip-processing variety with resistance to scab. *American journal of potato research* **78**, 425-31.
- Driscoll J, Coombs J, Hammerschmidt R, Kirk W, Wanner L, Douches D, 2009. Greenhouse and field nursery evaluation for potato common scab tolerance in a tetraploid population. *American journal of potato research* **86**, 96-101.
- Duval I, Brochu V, Simard M, Beaulieu C, Beaudoin N, 2005. Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Planta* **222**, 820-31.
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J, 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 414-24.
- Doumbou CL, Salove MH, Crawford DL, Beaulieu C, 2001. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* **82**, 85-102.
- Egan S, Wiener P, Kallifidas D, Wellington EMH, 2001. Phylogeny of *Streptomyces* species and evidence for horizontal transfer of entire and partial antibiotic gene clusters. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**, 127-33.
- Euzeby JP, 2014. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature -Genus *Streptomyces*. [<http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesb.html>]. Accedido el 20 Octubre de 2014.
- Faucher E, Savard T, Beaulieu C, 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 197-202.

- Faucher E, Paradis E, Goyer C, Hodge NC, Hogue R, Stall RE, Beaulieu C, 1995. Characterization of streptomycetes causing deep-pitted scab of potato in Quebec, Canada. *International journal of systematic bacteriology* **45**, 222-5.
- Feil EJ, Spratt BG, 2001. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annual Reviews in Microbiology*, **55**, 561-90.
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG, 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of bacteriology* **186**, 1518-30.
- Fitch WM, 1972. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* **20**, 406-16.
- Flårdh K, Buttner MJ, 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 36-49.
- Flores-Gonzalez R, Velasco I, Montes F, 2008. Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. *Plant Pathology* **57**, 162-9.
- Grohmann E, 2010. Autonomous plasmid-like replication of *Bacillus* ICEBs1: a general feature of integrative conjugative elements?. *Molecular microbiology* **75**, 261-263.
- Grela A, Caubet E, Proto JA, 2010. Informe de situación calidad de la semilla importada. [http://www.ansepa.com.uy/userfiles/informacion/items/126_pdf.pdf] Accedido el 6 de diciembre de 2010.
- Goth RW, Haynes KG, Wilson DR, 1993. Evaluation and characterization of advanced potato breeding clones for resistance to scab by cluster analysis. *Plant Disease* **77**, 911-4.
- Gouws R, 2006. *Etiology and integrated control of common scab on seed potatoes in South Africa*. South Africa: University of Pretoria, Master's Thesis.
- Goyer C, Faucher E, Beaulieu C, 1996. *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Québec, Canada. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 635-9.
- Goyer C, 2005. Isolation and characterization of phages Stsc1 and Stsc3 infecting *Streptomyces scabiei* and their potential as biocontrol agents. *Canadian journal of plant pathology* **27**, 210-6.
- Guo Y, Zheng W, Rong X, Huang Y, 2008. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 149-59.

- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *In Nucleic acids symposium series* **41**, 95-8.
- Han JS, Cheng JH, Yoon TM, Song J, Rajkarnikar A, Kim WG, Suh JW, 2005. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus sp. sunhua*. *Journal of applied microbiology* **99**, 213-21.
- Hao JJ, Meng QX, Yin JF, Kirk WW, 2009. Characterization of a new *Streptomyces* strain, DS3024 that causes potato common scab. *Plant Disease* **93**, 1329-34.
- Hatano K, Nishii T, Kasai H, 2003. Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly Streptovercillium) species by using phenotypes, DNA–DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Katoh and Arai 1957) corrig., sp. nov., nom. rev. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **53**, 1519-29.
- Haynes KG, Wanner LA, Thill CA, Bradeen JM, Miller J, Novy RG, Vinyard BT, 2010. Common scab trials of potato varieties and advanced selections at three US locations. *American journal of potato research* **87**, 261-76.
- Healy FG, Bukhalid RA, Loria R, 1999. Characterization of an Insertion Sequence Element Associated with Genetically Diverse Plant Pathogenic *Streptomyces* spp. *Journal of bacteriology* **181**, 1562-8.
- Healy FG, Wach M, Krasnoff SB, Gibson DM, Loria R, 2000. The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Molecular Microbiology* **38**, 794-804.
- Hillis DM, Bull JJ, 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology* **42**, 182-92.
- Hiltunen LH, Laakso I, Chobot V, Hakala KS, Weckman A, Valkonen JP, 2006. Influence of thaxtomins in different combinations and concentrations on growth of micropropagated potato shoot cultures. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**, 3372-9.
- Hiltunen LH, Ojanperä T, Kortemaa H, Richter E, Lehtonen MJ, Valkonen JPT, 2009. Interactions and biocontrol of pathogenic *Streptomyces* strains co-occurring in potato scab lesions. *Journal of applied microbiology* **106**, 199-212.
- Hiltunen LH, Alanen M, Laakso I, Kangas A, Virtanen E, Valkonen JPT, 2011. Elimination of common scab sensitive progeny from a potato breeding population using thaxtomin A as a selective agent. *Plant Pathology* **60**, 426-35.

- Huguet-Tapia JC, Badger JH, Loria R, Pettis GS, 2011. *Streptomyces turgidiscabies* Car8 contains a modular pathogenicity island that shares virulence genes with other actinobacterial plant pathogens. *Plasmid* **65**, 118-24.
- Huguet-Tapia JC, Loria R, 2012. Draft genome sequence of *Streptomyces acidiscabies* 84-104, an emergent plant pathogen. *Journal of bacteriology* **194**, 1847.
- Huguet-Tapia JC, Bignell DR, Loria R, 2014. Characterization of the Integration and Modular Excision of the Integrative Conjugative Element PAISt in *Streptomyces turgidiscabies* Car8. *PloS one* **9**, e99345.
- Hutchinson CM, 2005. Evaluation of chloropicrin soil fumigation programs for potato (*Solanum tuberosum* L.) production. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* **118**, 129-31.
- Horinouchi S, 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **7**, 2045-57.
- Hosaka K, Matsunaga H, Senda K, 2000. Evaluation of several wild tuber-bearing *Solanum* species for scab resistance. *American journal of potato research* **77**, 41-5.
- INASE, 2010. Producción y comercialización de materiales de propagación papa (*Solanum tuberosum*) [file:///C:/Users/jhon/Downloads/Papa%20(1).pdf]. Accedido el 1 de noviembre de 2014.
- Jakobsen IB, Easteal S, 1996. A program for calculating and displaying compatibility matrices as an aid in determining reticulate evolution in molecular sequences. *Computer applications in the biosciences: CABIOS* **12**, 291-5.
- Janssen PH, 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology* **72**, 1719-28.
- Joshi M, Rong X, Moll S, Kers J, Franco C, Loria R, 2007a. *Streptomyces turgidiscabies* secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. *Molecular plant-microbe interactions* **20**, 599-608.
- Joshi MV, Bignell DR, Johnson EG, Sparks JP, Gibson DM, Loria R, 2007b. The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*. *Molecular microbiology* **66**, 633-642.
- Joshi MV, Loria R, 2007. *Streptomyces turgidiscabies* possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *Molecular plant-microbe interactions* **20**, 751-8.

- Kaup O, Gräfen I, Zellermann EM, Eichenlaub R, Gartemann KH, 2005. Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Molecular plant-microbe interactions* **18**, 1090-8.
- Kers J, Cameron K, Joshi M, Bukhalid R, Morello J, Wach M, Gibson D, Loria R, 2005. A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Molecular Microbiology* **55**, 1025–33.
- Kim B-J, Kim C-J, Chun J, Koh Y-H, Lee S-H, Hyun J-W, Cha C-Y, Kook Y-H, 2004. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 593-8.
- King RR, Lawrence CH, Clark MC, Calhoun LA, 1989. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **13**, 849-50.
- King RR, Calhoun LA, 2009. The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry* **70**, 833-41.
- Kreuze JF, Suomalainen S, Paulin L, Valkonen JP, 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**, 462-9.
- Labeda DP, 2011. Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *Streptomyces*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **61**, 2525-31.
- Lacey MJ, Wilson CR, 2001. Relationship of common scab incidence of potatoes grown in Tasmanian ferrosol soils with pH, exchangeable cations and other chemical properties of those soils. *Journal of Phytopathology* **149**, 679-83.
- Lambert DH, Loria R, 1989a. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**, 387-92.
- Lambert DH, Loria R, 1989b. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**, 393–6.
- Lapaz MI, Verdier E, Pianzzola MJ, 2012. First Report Regarding Potato Scab Caused by *Streptomyces acidiscabies* in Uruguay. *Plant Disease* **96**, 1064.
- Lapwood DH, Wellings LW, Hawkins JH, 1973. Irrigation as a practical means to control potato common scab (*Streptomyces scabies*): Final experiment and conclusions. *Plant Pathology* **22**, 35-41.

- Larkin RP, Griffin TS, Honeycutt CW, 2010. Rotation and cover crop effects on soilborne potato diseases, tuber yield, and soil microbial communities. *Plant Disease* **94**, 1491-502.
- Larkin RP, Honeycutt CW, Griffin TS, Olanya OM, Halloran JM, He Z, 2011. Effects of different potato cropping system approaches and water management on soilborne diseases and soil microbial communities. *Phytopathology* **101**, 58-67.
- Laskaris P, Sekine T, Wellington EM 2012. Diversity analysis of Streptomycetes and associated phosphotransferase genes in soil. *PloS one* **7**, e35756.
- Lawrence CH; Clark M C; King, RR, 1990. Introduction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* **80**, 606-8.
- Lehtonen MJ, Rantala H, Kreuze JF, Bang H, Kuisma L, Koski P, Virtanen E, Vihlman K, Valkonen JPT, 2004. Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant Pathology* **53**, 280–7.
- Leiminger J, Frank M, Wenk C, Poschenrieder G, Kellermann A, Schwarzfischer A, 2013. Distribution and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Germany. *Plant Pathology* **62**, 611-23.
- Lindholm P, Kortemaa H, Kokkola M, Haahtela K, Salkinoja-Salonen M, Valkonen JP, 1997. *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. *Plant Disease* **81**, 1317-22.
- Liu D, Anderson NA, Kinkel LL, 1995. Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* **85**, 827-31.
- Lin YS, Kieser HM, Hopwood DA, Chen CW, 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Molecular microbiology* **10**, 923-33.
- Lorang JM, Liu D, Anderson NA, Schottel JL, 1995. Identification of potato scab inducing and suppressive species of *Streptomyces*. *Phytopathology* **85**, 261-8.
- Lerat S, Babana AH, El Oirdi M, El Hadrami A, Daayf F, Beaudoin N, Beaulieu C, 2009. *Streptomyces scabiei* and its toxin thaxtomin A induce scopoletin biosynthesis in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports* **28**, 1895-903.
- Loria R, Bukhalid RA, Creath RA, Leiner RH, Olivier LM, Steffens JC, 1995. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species in vitro. *Phytopathology* **85**, 537-41.
- Loria R, Bukhalid RA, Fry BA, King RR, 1997. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease* **81**, 836–46.

- Loria R, Kers J, Joshi M, 2006. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 469–87.
- Loria R, Bignell DR, Moll S, Huguet-Tapia JC, Joshi MV, Johnson EG, Gibson DM, 2008. Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**, 3-10.
- Loria R, Clark CA, Bukhalrd RA, Fry BA, 2010. *Gram positive bacteria*. Schaad NW, Jones JB, Chun W, eds. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press. NW, 236-49.
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, De Bruijn FJ, 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* **85**, 528-36.
- Powelson ML, Johnson KB, Rowe RC, 1993. Management of diseases caused by soilborne pathogens. *Potato health management* 149-58.
- Maiden MC, Bygraves JA., Feil Morelli G, Russell JE, Urwin R, Spratt BG, 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 3140-5.
- Maiden MC, 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology* **60**, 561-88.
- McKenna F, El-Tarabily KA, Hardy GS, Dell B, 2001. Novel in vivo use of a polyvalent *Streptomyces* phage to disinfest *Streptomyces scabies*-infected seed potatoes. *Plant pathology* **50**, 666-75.
- McQueen DR., Anderson NA, Schottel JL, 1985. Inhibitory reactions between natural isolates of *Streptomyces*. *Journal of general microbiology* **131**, 1149-55.
- Miyajima K, Tanaka F, Takeuchi T, Kuninaga S, 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 495–502.
- MGAP, Mercado Modelo, 2011. Observatorio Granjero Situación del cultivo de la papa. [<http://www4.mercadomodelo.net/observatorio/papa2011.pdf>]. Accedido el 30 de Octubre de 2014.
- Mun HS, Oh EJ, Kim HJ, Lee KH, Koh YH, Kim CJ, Kim BJ, 2007. Differentiation of *Streptomyces* spp. which causes potato scab disease on the basis of partial *rpoB* gene sequences. *Systematic and applied microbiology* **30**, 401-7.
- Murphy AM, De Jong H, Tai GC, 1995. Transmission of resistance to common scab from the diploid to the tetraploid level via 4x-2x crosses in potatoes. *Euphytica* **82**, 227-233.
- Ndowora TCR, Kinkel LL, Jones RK, Anderson NA, 1996. Fatty acid analysis of pathogenic and suppressive strains of *Streptomyces* species isolated in Minnesota. *Phytopathology* **86**, 138-43.

- Pavlista AD, 2005. Early-season applications of sulfur fertilizers increase potato yield and reduce tuber defects. *Agronomy journal* **97**, 599-603.
- Pánková I, Sedláková V, Sedlák P, Krejzar V, 2012. The Occurrence of Plant Pathogenic *Streptomyces* spp. in Potato-growing Regions in Central Europe. *American journal of potato research* **89**, 207-15.
- Park DH, Yu YM, Kim JS, Cho JM, Hur JH, Lim CK, 2003a. Characterization of streptomycetes causing potato common scab in Korea. *Plant Disease* **87**, 1290-6.
- Park DH, Kim JS, Kwon SW, Wilson C, Yu YM, Hur JH, Lim CK, 2003b. *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **53**, 2049-54.
- Person L, Martin W, 1940. Soil rot of Sweet Potatoes in Louisiana. *Phytopathology* **30**, 913-26.
- Sabaratnam S, Traquair JA, 2002. Formulation of a *Streptomyces* Biocontrol Agent for the Suppression of Rhizoctonia Damping-off in Tomato Transplants. *Biological Control* **23**, 245-253.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-25.
- Sanz A, 2005. Aislamiento y caracterización de genes de la ruta biosintética de un antifúngico oxopentaeno producido por *Streptomyces* spp. Madrid, España: Universidad de Alcalá, Tesis doctoral.
- Scheible WR, Fry B, Kochevenko A, Schindelasch D, Zimmerli L, Somerville S, Somerville CR, 2003. An *Arabidopsis* mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. *The Plant Cell Online* **15**, 1781-94.
- Seipke RF, Loria R, 2008. *Streptomyces scabies* 87–22 possesses a functional tomatinase. *Journal of Bacteriology* **190**, 7684–92.
- Seipke RF, Kaltenpoth M, Hutchings MI, 2012. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme?. *FEMS microbiology reviews* **36**, 862-76.
- Shirling EB, Gottlieb D, 1966. Methods of characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **16**, 313–40.
- Siri MI, Sanabria A, Pianzola MJ, 2011. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Disease* **95**, 1292-301.
- Smith JM, 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of molecular evolution* **34**, 126-9.

- Song J, Lee S-C, Kang J-W, Baek H-J, Suh J-W, 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 203–9.
- Spratt BG, 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Current opinion in microbiology* **2**, 312-6.
- St-Onge R, Goyer C, Coffin R, Filion M, 2008. Genetic diversity of *Streptomyces* spp. causing common scab of potato in eastern Canada. *Systematic and Applied Microbiology* **31**, 474–84.
- St-Onge R, Gadkar VJ, Arseneault T, Goyer C, Filion M, 2011. The ability of *Pseudomonas* sp. LBUM 223 to produce phenazine-1-carboxylic acid affects the growth of *Streptomyces scabies*, the expression of thaxtomin biosynthesis genes and the biological control potential against common scab of potato. *FEMS microbiology ecology* **75**, 173-83.
- Tagawa M, Tamaki H, Manome A, Koyama O, Kamagata Y, 2010. Isolation and characterization of antagonistic fungi against potato scab pathogens from potato field soils. *FEMS microbiology letters* **305**, 136-42.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731–9.
- Thwaites R, Wale SJ, Nelson D, Munday D, Elphinstone JG, 2010. *Streptomyces turgidiscabies* and *S. acidiscabies*: two new causal agents of common scab of potato (*Solanum tuberosum*) in the UK. *Plant Pathology* **59**, 804.
- Tóth L, Maeda M, Tanaka F, 2001. Isolation and identification of pathogenic strains of *Streptomyces acidiscabies* from netted scab lesions of potato tubers in Hokkaido (Japan). *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* **48**, 575–85.
- Ueda K, Seki T, Kudo T, Yoshida T, Kataoka M, 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S RNA. *Journal of Bacteriology* **181**, 78–82.
- VanEtten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE, 1994. Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant Cell* **6**, 1191.
- Wang A, Lazarovits G, 2005. Role of seed tubers in the spread of plant pathogenic *Streptomyces* and initiating potato common scab disease. *American Journal of Potato Research* **82**, 221-30.

- Wanner LA, 2004. Field isolates of *Streptomyces* differ in pathogenicity and virulence on radish. *Plant Disease* **88**, 785–96.
- Wanner LA, 2006. A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. *Phytopathology* **96**, 1363-71.
- Wanner LA, 2007a. High proportions of nonpathogenic *Streptomyces* are associated with common scab-resistant potato lines and less severe disease. *Canadian journal of microbiology* **53**, 1062-75.
- Wanner LA, 2007b. A new strain of *Streptomyces* causing common scab in potato. *Plant Disease* **91**, 352-9.
- Wanner LA, 2009. A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. *American Journal of Potato Research* **86**, 247–64.
- Waterer D, 2002. Impact of high soil pH on potato yields and grade losses to common scab. *Canadian journal of plant science* **82**, 583-6.
- Williams ST, Davies FL, 1965. Use of Antibiotics for Selective Isolation and Enumeration of Actinomycetes in Soil. *Journal of general microbiology* **38**, 251-61.
- Wilson CR, Ransom LM, Pemberton BM, 1999. The Relative Importance of Seed-borne Inoculum to Common Scab Disease of Potato and the Efficacy of Seed Tuber and Soil Treatments for Disease Control. *Journal of Phytopathology* **147**, 13-8.
- Wilson CR, Tegg RS, Wilson AJ, Luckman GA, Eyles A, Yuan ZQ, Conner AJ, 2010. Stable and extreme resistance to common scab of potato obtained through somatic cell selection. *Phytopathology* **100**, 460-7.
- Wiggins BE, Kinkel LL, 2005. Green manures and crop sequences influence potato diseases and pathogen inhibitory activity of indigenous streptomycetes. *Phytopathology* **95**, 178-85.
- Xiao K, Kinkel LL, Samac DA, 2002. Biological Control of *Phytophthora* Root Rots on Alfalfa and Soybean with *Streptomyces*. *Biological Control* **23**, 285-95.
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM, 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 316–22.
- Zhou Z, Gu J, Du YL, Li YQ, Wang, Y, 2011. The-omics era-toward a systems-level understanding of streptomycetes. *Current genomics* **12**, 404-16.
- Zhao WQ, Yu XM, Liu DQ, 2010. First report of *Streptomyces acidiscabies* causing potato scab in China. *Plant Pathology* **59**, 405.

ANEXO I**MEDIOS DE CULTIVO****Agar Yeast malt extract (YME) (ISP2)** (Shirling & Gottlieb, 1966)

Extracto de Levadura.....	4g
Extracto de Malta.....	10g
Dextrosa.....	4g
Agar.....	20g
Agua destilada.....	1000mL

Se realizaron la tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajustó el pH del medio a 7.0. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C y se repartió en placas de Petri de a 20 mL aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secaron a temperatura ambiente durante 16-24 horas y se conservaron en bolsas de nylon a 4°C hasta su uso.

Caldo Yeast malt extract (YME) (Shirling & Gottlieb, 1966)

Extracto de Levadura.....	4g
Extracto de Malta.....	10g
Dextrosa.....	4g
Agua destilada.....	1000mL

Se realizaron la tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajustó el pH del medio a 7.0. Se repartió en tubos de ensayo de a 5 mL. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C y conservaron a 4°C hasta su uso.

Solución Stock de Antibióticos (Williams & Davies, 1965)

Nistatina.....	500mg
Sulfato de β -polimixina.....	50mg
Penicilina-G sódica.....	10mg
Cicloheximida.....	500mg
Agua destilada.....	100mL

Se realizaron la tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Esta solución se esteriliza por filtración y se conserva a 4°C hasta su uso.

Nistatina, polimixina, penicilina, cicloheximida (NPPC) agar agua (Williams & Davies, 1965)

Solución stock de antibióticos.....	10mL
Agar.....	20g
Agua destilada.....	1000mL

Se realizó la toma en peso del agar y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C. Se dejó enfriar a 45-50°C y se agregaron 10mL de la solución stock de antibióticos previamente esterilizada por filtración. Inmediatamente el medio se homogenizó y se repartió en placas de Petri de a 20 mL aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secaron a temperatura ambiente durante 16-24 horas y se conservaron en bolsas de nylon a 4°C hasta su uso.

Agar Tirosina (ISP7) (Shirling & Gottlieb, 1966)

Glicerol.....	15g
L-tirosina.....	0.5g
L-asparagina.....	1g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.5g
NaCl.....	0.5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.01g
Agar.....	20g
Agua destilada.....	1000mL

Se realizaron la tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajustó el pH del medio a 7.2. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C y se repartió en placas de Petri de a 20 mL aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secaron a temperatura ambiente durante 16-24 horas y se conservaron en bolsas de nylon a 4°C hasta su uso.

Medio para utilización de Carbono (ISP9) (Shirling & Gottlieb, 1966)**A. Fuentes de Carbono****Glucosa al 10%**

D-Glucosa.....10g

Agua destilada.....100mL

Rafinosa al 10%

Rafinosa.....10g

Agua destilada.....100mL

Se realizó la toma en peso de cada carbohidrato y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Estas soluciones se esterilizan por filtración y se conservan a 4°C hasta su uso. La glucosa es el control positivo, mientras que el no agregar ninguna fuente de carbono se considera control negativo.

B. Solución Pridham y Gottlieb de sales trazaCuSO₄ · 5H₂O.....0.64gFeSO₄ · 7H₂O.....0.11gMnCl₂ · 4H₂O.....0.79gZnSO₄ · 7H₂O.....0.15g

Agua destilada.....100mL

Se realizaron la tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C y se conservó a 4°C hasta su uso.

C. Medio mineral basal

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.64g
KH_2PO_4 anhidro.....	2.38g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5.65g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1g
Solución B.....	1mL
Agar.....	15.0g
Agua destilada.....	1000mL

Se realizaron la tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajustó el pH del medio a 6.8. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C y se conservó a 4°C hasta su uso.

D. Medio completo

Un litro del medio mineral basal estéril (C), se dejó enfriar a 60°C y se le agregó 10 ml de la solución con la fuente de carbono (A) previamente esterilizada por filtración. Inmediatamente el medio se homogenizó y se repartió en placas de Petri de a 20 mL aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secaron a temperatura ambiente durante 16-24 horas y se conservaron en bolsas de nylon a 4°C hasta su uso.

Para realizar la prueba de utilización de fuentes de carbono se inoculó cada aislamiento en 3 placas de Petri con: medio D con glucosa, medio D con rafinosa y medio D sin ningún carbohidrato.

ANEXO II

SECUENCIAS

En este Anexo se muestran a modo de ejemplo el alineamiento de las secuencias del gen *rpoB* (Capítulo 2) y las secuencias correspondientes a los alelos del gen *atpD* de las cepas de *S. acidiscabies* utilizadas en el MLST.

A) Alineamiento de secuencias nucleotídicas del fragmento del gen *rpoB* de los 61 aislamientos de *Streptomyces* spp. y cinco cepas de referencia analizados mediante el Clustal X en el programa MEGA 5.0.

>Seq1 organism *Streptomyces* sp. 1 isolate **St101** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAACGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGCACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGTGTCTGCG
TGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGACACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCTGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTCTCGGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCTGGCGCTCGGCCCGGGTGGTCTCTCGCGTGAGCGGGCCGGGTTCTGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq2 organism *Streptomyces* sp. 1 isolate **St102** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAACGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGTGTCTGCG
TGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGACACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCTGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTCTCGGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCTGGCGCTCGGCCCGGGTGGTCTCTCGCGTGAGCGGGCCGGGTTCTGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq3 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St103** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGGTTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCTGTC
GTGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGACACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCTGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTCG
GTCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCTGGCGCTCTGGCCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGGTTCTGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq4 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St104** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGGTTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCTGTC
GTGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGACACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCTGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTCG
GTCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCTGGCGCTCTGGCCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGGTTCTGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq5 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St105** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGGTTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCTGTC
GTGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGACACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCTGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTCG

GTCTCACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGGCGCTCGGCCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq6 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St106** RNA polymerase (*rpoB*) gene partial CDS
TGCGGTTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCGTGC
GTGAGCGCATGACCACCCAGGACGTGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
CGCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTGCGG
GTCTCACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGGCGCTCGGCCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq7 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St107** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS
TGCGGTTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTGCGG
TCTCACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq8 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St108** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS
TGCGGTTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTGCGG
TCTCACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq9 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St109** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS
TGCGGTTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTGCGG
TCTCACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq10 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1010** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS
TGCGGTTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTGCGG
TCTCACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq11 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1011** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS
TGCGGTTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTGCGG
TCTCACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq12 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1012** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS
TGCGGTTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTGCGG
TCTCACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq13 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1013** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAAACAACCCGCTGTGCGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq14 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1014** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAAACAACCCGCTGTGCGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq15 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1015** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAAACAACCCGCTGTGCGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq16 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1016** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAAACAACCCGCTGTGCGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq17 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1017** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAAACAACCCGCTGTGCGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq18 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1018** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAAACAACCCGCTGTGCGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq19 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1019** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAAACAACCCGCTGTGCGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq20 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1020** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCGGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCGGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq21 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St1021** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCGGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCGGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq22 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St111** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCGTGC
GTGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCGG
GTCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCGGCGCTCGGCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq23 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St112** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCGTGC
GTGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCGG
GTCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCGGCGCTCGGCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq24 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St113** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCGTGC
GTGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCGG
GTCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCGGCGCTCGGCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq25 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St114** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCGTGC
GTGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCGG
GTCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCGGCGCTCGGCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq26 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St115** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)
gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCGTGC
GTGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCGG
GTCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCGGCGCTCGGCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq27 organism *Streptomyces acidiscabies* isolate **St116** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGGTCGGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCGTGC
GTGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGACAGCCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
GTCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCCGCGCTCGGCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq28 organism *Streptomyces* sp. 2 isolate **St119** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGCGTCGTGC
GCGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGACAGCCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
GGGTGACGCACAAGCGTCGTCTGTCCGCGCTCGGCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCG
AGGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq29 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St1113** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCCGACAGCCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
TCTGACGCACAAGCGTCGTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGCGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq30 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St1114** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCCGACAGCCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
TCTGACGCACAAGCGTCGTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGCGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq31 organism *Streptomyces* sp. 3 isolate **St1117** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGTGTCTGTCCG
CGAGCGCATGACCACTCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCCGACAGCCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCCGCTCTTGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq32 organism *Streptomyces* sp. 4 isolate **St1118** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TCCGTAACGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGCACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGCGTCGTCCG
CGAGCGCATGACCACTCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCCGACAGCCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGACGAACCCGCTGTCCG
GTCTGACCCACAAGCGCCGTCTGAACGCGCTCGGCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq33 organism *Streptomyces* sp. 5 isolate **St1119** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TCCGTAACGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGCACGGGTCTGGCCCGTATGGAGCGCGTCGTCCG
CGAGCGCATGACCACTCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCCGACAGCCCTGATCAACATCCGGCCGGTTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGACGAACCCGCTGTCCG
GTCTGACCCACAAGCGCCGTCTGAACGCGCTGGGCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCG
AGGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq34 organism *Streptomyces* sp. 6 isolate **St1122** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TCCGCAACGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCCCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTGCGG
TCTGACGCACAAGCGTCGTCTCAACGCGCTCGGCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTTACCCGTCGCACT

>Seq35 organism *Streptomyces* sp. 7 isolate **St1124** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TCCGCAACGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCCCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTGCGG
GCTGACGCACAAGCGTCGTCTGAACGCCCTCGGCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq36 organism *Streptomyces* sp. 8 isolate **St1125** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTGCGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTGCGCTCTTGCCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCGTCGCACT

>Seq37 organism *Streptomyces* sp. 9 isolate **St1130** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAACGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGCATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGACGAACCCGCTGTGCGG
GCCTGACCCACAAGCGTCGTCTGTCCGCGCTGGGCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCG
AGGTCCGTGACCGGCACCCCTCGCACT

>Seq38 organism *Streptomyces* sp. 10 isolate **St1131** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCCTGTCTGG
TCTACGCACAAGCGCCGTCTGTGCGCGCTCGGCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq39 organism *Streptomyces* sp. 5 isolate **St1133** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TCCGTAACGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCCCGTATGGAGCGCGTCGTCCG
CGAGCGCATGACGACTCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGACGAACCCGCTGTGCGG
GTCTGACCCACAAGCGTCGTCTGAACGCGCTGGGCCCGGTGGTCTGTCCCGAGAGCGGGCGGGCTTCG
AGGTCCGAGACGTGCACCCGTCGCACT

>Seq40 organism *Streptomyces* sp. 4 isolate **St1134** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TCCGTAACGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGCACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGCGTCGTCCG
CGAGCGCATGACCACTCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGACGAACCCGCTGTGCGG
GTCTGACCCACAAGCGCCGTCTGAACGCGCTCGGCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCGGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq41 organism *Streptomyces* sp. 11 isolate **St1140** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGTGTGCGGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCTGGCTCTTGCCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTTCTGTACGTGCACCCGTCCCACT

>Seq42 organism *Streptomyces* sp. 12 isolate **St121** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCTCGGTGCGTGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCTGTGCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTACCCACAAGCGCCGTCTGTCTGGCTCTTGCCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq43 organism *Streptomyces* sp. 13 isolate **St122** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGTAACGTGCGGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGTGTCTGTGCG
TGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTGACCCACAAGCGCCGTCTGTCTGGCGCTGGCCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGCGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCGTCCCACT

>Seq44 organism *Streptomyces* sp. 14 isolate **St123** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCTGGGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGCACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGAGTCTGCC
GCGAGCGGATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
GTCTACCCACAAGCGCCGCTGTCTGGCGCTCGGTCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq45 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St124** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCTGGGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGTCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTGACGCACAAGCGTCTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq46 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St125** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCTGGGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGTCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTGACGCACAAGCGTCTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq47 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St126** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCTGGGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGTCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTGACGCACAAGCGTCTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq48 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St127** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCCCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTTCGACGTTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTGACGCACAAGCGTCGTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGCGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq49 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St128** RNA polymerase beta subunit beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCCCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTTCGACGTTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTGACGCACAAGCGTCGTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGCGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq50 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St129** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCCCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTTCGACGTTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTGACGCACAAGCGTCGTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGCGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq51 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St1210** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCCCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTTCGACGTTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTGACGCACAAGCGTCGTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGCGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq52 organism *Streptomyces* sp. 15 isolate **St1218** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TCCGCAGCGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCTGTGCG
CGAGCGCATGACACGCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCCAGTTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
GCTGACGCACAAGCGTCGTCTGAACGCCCTGGGCCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq53 organism *Streptomyces* sp. 7 isolate **St1219** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TCCGCAACGTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGCGTCTGTGCG
CGAGCGCATGACACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCCAGTTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
GCTGACGCACAAGCGTCGTCTGAACGCCCTCGGCCCGGGTGGCCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq54 organism *Streptomyces* sp. 16 isolate **St1226** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGCACGGGTCTGGCCCGTATGGAGCGCGTCTGTCC
GCGAGCGGATGACACGCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCCAGTTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTCTCCG
GGCTGACGCACAAGCGGCGTCTGTCCGCGCTGGGCCCTGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCG
AGGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq55 organism *Streptomyces* sp. 14 isolate **St1227** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGCACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGAGTCGTCC
GCGAGCGGATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
GTCTACCCACAAGCGCCGCTGTGCGCGCTCGGTCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq56 organism *Streptomyces* sp. 17 isolate **St1229** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGAGTCGTCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
TCTACCCACAAGCGCCGCTGTGCGCACTTGGCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCGTCCCACT

>Seq57 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St1230** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
TCTGACGCACAAGCGTCGTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq58 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St1232** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
TCTGACGCACAAGCGTCGTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq59 organism *Streptomyces* sp. 18 isolate **St1233** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGCACGGGTCTGGCCCGTATGGAGCGCGTCGTGC
GCGAGCGCATGACCACGCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
CGCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
GGCTGACGCACAAGCGTCGTCTGTCCGCGCTCGGCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCG
AGGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq60 organism *Streptomyces* sp. 19 isolate **St1234** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGAGTCGTCCG
CGAGCGGATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
TCTACCCACAAGCGCCGCTGTGCGCGCTCGGCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCGTCCCACT

>Seq61 organism *Streptomyces scabiei* isolate **St1236** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGCCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCGT
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTGCGAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCCG
TCTGACGCACAAGCGTCGTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq62 organism *Streptomyces stelliscabiei* strain **DSM41803** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAACTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGTCGCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCCCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCTGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTGACGCACAAGCGTCTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq63 organism *Streptomyces scabiei* strain **DSM41658** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAGCGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGTCGCG
CGAGCGCATGACGACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCCCAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCTGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTGACCCACAAGCGTCTCTCTCGGCGCTGGGTCCCGGTGGTCTGTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq64 organism *Streptomyces turgidiscabies* strain **DSM41838** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAACGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTGGCGCGTATGGAGCGTGTCTGTCGCG
CGAGCGCATGACGACTCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
GCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCTGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGGG
TCTACCCACAAGCGCGCTCTGTCTGGCTCTTGCCCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGAG
GTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq65 organism *Streptomyces acidiscabies* strain **DSM41668** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGGTCCGTTCGGCGAGCTGATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGTCTCGCCCGTATGGAGCGGGTCTGTCG
GTGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
CGCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCTGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGG
GTCTCACCCACAAGCGCCGTCTGTCTGGCGCTCGGCCCGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGTGACGTGCACCCCTCGCACT

>Seq66 organism *Streptomyces europaeiscabiei* strain **CFBP4497** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene partial CDS

TGCGCAACGTCGGCGAGCTCATCCAGAACCAGGTCCGTACGGGCCTGGCGCGGATGGAGCGCGTCTGTCG
GCGAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGCGATCACGCCGAGACCCTGATCAACATCCGGCCGGTCTGTC
CGCCTCCATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGTCTGCAGTTCATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGG
GTCTCACCCACAAGCGCCGTCTGTCTGGCTCTTGCCCCGGGTGGTCTCTCCCGTGAGCGGGCCGGCTTCGA
GGTCCGAGACGTGCACCCGTCCCACT

B) Diferentes alelos obtenidos mediante el ingreso del alineamiento del fragmento del gen *atpD* a la base de datos MLST (<http://pubmlst.org/analysis/>) utilizando la opción *non-redundant database* (NRDB). El alineamiento contenía las secuencias de 16 aislamientos de *S. acidiscabies* y la cepa de referencia *Streptomyces acidiscabies* 84-104. A continuación se muestran los datos obtenidos:

Alelo 1

```
>ST105
=ST106
=ST113
=ST114
=ST116
=gi|372137541|gb|AHBF01000081.1|:16252-16747_Streptomyces_acidiscabies_84-104
CGCGCTTCGACGAGCTCGAGTCGAAGACCGAGATGTTTCGAGACCGGCGTCAAGGTCATCGACCTGCTGAC
CCCGTACGTCAAGGGCGGCAAGATCGGCCTGTTTCGCGGGTGCCGGCGTCGGCAAGACGGTGCTCATCCA
GGAGATGATCTACCGCGTCGCCAACAACCACGACGGGTGTCTCCGTGTTTCGCCGGTGTCGGCGAGCGCACC
CGTGAGGGCAACGACCTCATCGAGGAGATGGCCGACTCGGGCGTCATCGACAAGACGGCCCTCGTCTTCG
GCCAGATGGACGAGCCCCCGGGCACCCGTCTGCGCGTGCCCTCGCGGGTCTGACCATGGCGGAGTACT
TCCGCGATGTGCAGAAGCAGGACGTGCTGTTCTTCATCGACAACATCTTCCGCTTCACGCAGGCCGGTTCC
GAGGTGTCGACCCCTTCTCGGTCTGATGCCCTCGGCCGTGGGTTACCAGCCGAACCTCGCCGACGAGATGG
GTCTCCT
```

Alelo 2

```
>ST107
=ST108
=ST109
=ST1011
=ST1013
=ST1015
CGCGCTTCGACGAGCTCGAGTCGAAGACCGAGATGTTTCGAGACCGGCGTCAAGGTCATCGACCTGCTGAC
CCCGTACGTCAAGGGCGGCAAGATCGGTCTGTTTCGCGGGTGCCGGCGTCGGCAAGACGGTGCTCATCCAG
GAGATGATCTACCGCGTCGCCAACAACCACGACGGGTGTCTCCGTGTTTCGCCGGTGTCGGCGAGCGCACCC
GTGAGGGCAACGACCTCATCGAGGAGATGGCCGACTCGGGCGTCATCGACAAGACGGCCCTCGTCTTCGG
TCAGATGGACGAGCCCCCGGGCACCCGTCTGCGCGTGCCCTCGCGGGTCTGACCATGGCGGAGTACTTC
CGCGATGTGCAGAAGCAGGACGTGCTGTTCTTCATCGACAACATCTTCCGCTTCACGCAGGCCGGTTCCGA
GGTCTCCACGCTGCTCGGCCGTATGCCGTCCGCGGTGGGTTACCAGCCGAACCTGGCCGACGAGATGGGT
CTCCT
```

Alelo 3

```
>ST103
CGCGCTTCGACGAGCTCGAGTCGAAGACCGAGATGTTTCGAGACCGGCGTCAAGGTCATCGACCTGCTGAC
CCCGTACGTCAAGGGCGGCAAGATCGGCCTGTTTCGCGGGTGCCGGCGTCGGCAAGACGGTGCTCATCCA
GGAGATGATCTACCGCGTCGCCAACAACCACGACGGGTGTCTCCGTGTTTCGCCGGTGTCGGCGAGCGCACC
CGTGAGGGCAACGACCTCATCGAGGAGATGGCCGACTCGGGCGTCATCGACAAGACGGCCCTCGTCTTCG
GCCAGATGGACGAGCCCCCGGGCACCCGTCTGCGCGTGCCCTCGCGGGTCTGACCATGGCGGAGTACT
TCCGCGATGTGCAGAAGCAGGACGTGCTGTTCTTCATCGACAACATCTTCCGCTTCACGCAGGCCGGTTCC
GAGGTGTCGACCCCTTCTCGGTCTGGATGCCCTCGGCCGTGGGTTACCAGCCGAACCTCGCCGACGAGATGG
GCCTCCT
```

Alelo 4

>ST1018

CGCGCTTCGACGAGCTCGAGTCGAAGACCGAGATGTTTCGAGACCGGCGTCAAGGTCATCGACCTGCTGAC
CCCGTACGTCAAGGGCGGCAAGATCGGTCTGTTTCGCGCGGTGCCGGCGTCGGCAAGACGGTGCTCATCCAG
GAGATGATCTACCGCGTCGCCAACAACCACGACGGTGTCTCCGTGTTTCGCGGTGTTCGGCGAGCGCACCC
GTGAGGGCAACGACCTCATCGAGGAGATGGCCGACTCGGGCGTCATCGACAAGACGGCCCTCGTCTTCGG
TCAGATGGACGAGCCCCCGGGCAGCCGTCTGCGCGTGGCCCTCGCGGGTCTGACCATGGCGGAGTACTTC
CGCGATGTGCAGAAGCAGGACGTGCTGTTCTTCATCGACAACATCTTCGCTTCACGCAGGCCGGTTCCGA
GGTCTCCACGCTGCTCGGCCGTATGCCGTCCGCGGTGGGTACCAGTCCAACCTGGCTGTCGAGATGGGT
CTCCT

Alelo 5

>ST111

CGCGCTTCGACGAGCTCGAGTCGAAGACCGAGATGTTTCGAGACCGGCGTCAAGGTCATCGACCTGCTGAC
CCCGTACGTCAAGGGCGGCAAGATCGGCCTGTTTCGCGCGGTGCCGGCGTCGGCAAGACGGTGCTCATCCA
GGAGATGATCTACCGCGTCGCCAACAACCACGACGGTGTCTCCGTGTTTCGCGGTGTTCGGCGAGCGCACC
CGTGAGGGCAACGACCTCATCGAGGAGATGGCCGACTCGGGCGTCATCGACAAGACGGCCCTCGTCTTCG
GCCAGATGGACGAGCCCCCGGGCAGCCGTCTGCGCGTGGCCCTCGCGGGTCTGACCATGGCGGAGTACT
TCCGCGATGTGCAGAAGCAGGACGTGCTGTTCTTCATCGACAACATCTTCGCTTCACGCAGGCCGGTTCC
GAGGTGTCGACCCCTTCTCGGTCTGATGCCCTCGGCCGTGGGTACCAGCCGAACCTCGCCGACGAGATGG
GCCTCCT

Alelo 6

>ST112

CGCGCTTCGACGAGCTCGAGTCGAAGACCGAGATGTTTCGAGACCGGCGTCAAGGTCATCGACCTGCTGAC
CCCGTACGTCAAGGGCGGCAAGATCGGCCTGTTTCGCGCGGTGCCGGCGTCGGCAAGACGGTGCTCATCCA
GGAGATGATCTACCGCGTCGCCAACAACCACGACGGTGTCTCCGTGTTTCGCGGTGTTCGGCGAGCGCACC
CGTGAGGGCAACGACCTCATCGAGGAGATGGCCGACTCGGGCGTCATCGACAAGACGGCCCTCGTCTTCG
GCCAGATGGACGAGCCCCCGGGCAGCCGTCTGCGCGTGGCCCTCGCGGGTCTGACCATGGCGGAGTACT
TCCGCGATGTGCAGAAGCAGGACGTGCTGTTCTTCATCGACAACATCTTCGCTTCACACAGGCCGGTTCC
GAGGTGTCGACCCCTTCTCGGCCGGATGCCCTCGGCCGTGGGTACCAGCCGAACCTCGCCGACGAGATGG
GTCTCCT

Alelo 7

>ST115

CGCGCTTCGACGAGCTCGAGTCGAAGACCGAGATGTTTCGAGACCGGCGTCAAGGTCATCGACCTGCTGAC
CCCGTACGTCAAGGGCGGCAAGATCGGCCTGTTTCGCGCGGTGCCGGCGTCGGCAAGACGGTGCTCATCCA
GGAGATGATCTACCGCGTCGCCAACAACCACGACGGTGTCTCCGTGTTTCGCGGTGTTCGGCGAGCGCACC
CGTGAGGGCAACGACCTCATCGAGGAGATGGCCGACTCGGGCGTCATCGACAAGACGGCCCTCGTCTTCG
GCCAGATGGACGAGCCCCCGGGCAGCCGTCTGCGCGTGGCCCTCGCGGGTCTGACCATGGCGGAGTACT
TCCGCGATGTGCAGAAGCAGGACGTGCTGTTCTTCATCGACAACATCTTCGCTTCGCGCAGGCCGGTTCC
GAGGTGTCGACCCCTTCTCGGTCTGATGCCCTCGGCCGTGGGTACCAGCCGAACCTCGCCGACGAGATGG
GTCTCCT