



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**Integración de la minería genómica y la metabolómica para
descifrar el potencial de producción de metabolitos bioactivos en
cepas de *Streptomyces* de Uruguay**

Valentina María Croce Paullier

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

DOCTOR EN QUÍMICA

Programa de Posgrado de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA – Química)

Junio 2023

**Integración de la minería genómica y la metabolómica para
descifrar el potencial de producción de metabolitos bioactivos en
cepas de *Streptomyces* de Uruguay**

Tribunal

Dra. Carmen Rossini

Dr. Andrés Perez-Parada

Dra. Patricia Vaz

Directores

Dra. María Inés Siri

Dr. Guillermo Moyna

Dra. María Julia Pianzola

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecerle a María, gracias por escucharme siempre, por las discusiones, por bancarme todo, por dejarme meterme en lo que quise, por bancar mi ansiedad y por darme siempre para adelante. Me encantó que me hayas acompañado una vez más, saliéndonos un poco de los fitopatógenos y explorando cosas nuevas. Ojalá que la vida nos siga encontrando. Gracias también a Guille, que confió en nosotras y nos incentivó a meternos en la metabolómica. Nos metimos en algo distinto de lo cual aprendimos muchísimo. Eso sin duda fue gracias al trabajo en equipo, algo que fue fundamental en este camino. También gracias a María Julia, quien inició esta línea, por permitirme ser parte.

Al tribunal, por tomarse el tiempo para leer, comentar y discutir esta tesis.

A todos los integrantes del laboratorio del DQL, durante los años que fui a Paysandú, por haberme recibido siempre de la mejor manera y por la buena disposición. Especialmente a Andrés, que fue un compañero fundamental para poder hacer todos los análisis metabolómicos y por enseñarme todo lo referido al RMN.

A Gustavo, quien participó siempre con tremendas ganas para discutir resultados y disposición para resolver algún que otro problema y siempre con la mejor onda! También a Gastón, y los demás integrantes del laboratorio de biología de gusanos del IP, siempre fue una instancia muy amena ir allí.

A Ryan, quien me recibió en el laboratorio durante mi pasantía en Leeds, por enseñarme un montón de cosas referidas a estos bichos tan lindos y particulares y por dejarme meter mano en todo lo que le pedí. A Asif, Dan, Bohdan, Sakina que coincidieron conmigo en el lab en Leeds.

A Paco, César y Alan, por ayudarnos con los genomas y a usar los programas para su análisis. También a Agustina y a Cisco por darnos una mano en la puesta al punto del nano.

A todos los peones del 12, por todos los años que compartimos el lab que fueron sin duda excelentes. A MIL, quien me pasó la herencia de “esas cepas guardadas en el freezer que hay que hacer algo”, por pasarme todo su conocimiento de los streptos. A Martín, por empezar el camino juntos. A Roberto y Lucía, por ser mis manos en épocas de pandemia (y embarazo) y permitirme avanzar con los ensayos PCV. A Sofía por ayudarme con los análisis finales y por estar super dispuesta a aprender juntas, gracias Sofi por ser parte de este final y hacérmelo más ameno. A Felipe, mi hermano académico, por ser el mejor acompañante de estreno del nano, por estimularme a avanzar cuando dudábamos y aliviarnos cuando algo salía bien! A Niki, por siempre querer ayudarme con algo, y al resto del grupo MAI, Maru, Vicky, Stefi, y Flor. También al resto de los peones, Mari, Gabi, Lu, Ari, Gonza, Diego, César; y no peonas Sonia y Gianna, que siempre han estado presentes de alguna manera.

A todos los integrantes del área micro de Facultad, por todos los años compartidos. A los integrantes del laboratorio de biocatálisis (Choni, Agus, Diego, Paula) por recibirme cada

vez que fui a invadir las campanas y por todas las consultas que me respondieron con la mejor onda.

A Danilo, Luisina y los demás masistas que me dieron una mano para entender el GNPS, por todos sus aportes que fueron muy necesarios.

A mis compañeros del lab del Ministerio, por bancarme en esta última etapa de escritura.

A mi familia, mamá, papá, Luli, Ponchi, y Fran que de alguna manera entienden la importancia que tiene esta tesis para mí y siempre están para todo. También a Adriana, Jorge, Javi y Vicky por el apoyo del día a día que también me permitió terminar la escritura. A mis amigas también porque sin entender mucho de lo que hago, siempre están para dar para adelante y apoyarme en lo que sea.

A mis amores, Nacho y Clari, por todo el amor del día a día, fueron todo lo que necesité para terminar este lindo camino. Son todo lo que está bien en mi vida.

Fue un camino largo, con tropezones, pero con muchísimos aprendizajes. De esos aprendizajes para la vida que siempre voy a valorar. En lo referido al conocimiento, aprendí desde técnicas analíticas hasta scripts bioinformáticos que nunca me imaginé, y haber logrado eso tan bien acompañada es algo muy valioso. ¡Muchas gracias!

Integración de la minería genómica y la metabolómica para descifrar el potencial de producción de metabolitos bioactivos en cepas de *Streptomyces* de Uruguay

Valentina Croce, Mag.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química – PEDECIBA Química

Universidad de la República

2023

DIRECTORES: Dra. María Inés Siri, Dr. Guillermo Moyna y Dra. María Julia Pianzzola

(Facultad de Química y CENUR Litoral Norte, Universidad de la República)

El género *Streptomyces* es reconocido por su versatilidad metabólica y capacidad de producción de metabolitos bioactivos. A pesar de décadas de investigación, se siguen descubriendo nuevos productos naturales derivados de *Streptomyces*, lo que destaca la importancia de continuar explorando este género en busca de compuestos con potencial terapéutico y aplicaciones biotecnológicas. El presente trabajo de tesis permitió la caracterización de una colección de 235 cepas de *Streptomyces* aisladas en Uruguay en cuanto a su potencial de producción de metabolitos bioactivos. En primer lugar, se determinaron los compuestos fitotóxicos responsables de la patogenicidad en papa de diferentes especies de *Streptomyces* a partir de los perfiles metabolómicos por ^1H RMN de los sobrenadantes de cultivo de algunas cepas de *Streptomyces* de la colección. Se estableció un modelo metabolómico capaz de clasificar las cepas en función de su fitotoxicidad, estableciendo correlaciones entre los perfiles metabólicos y las relaciones filogenéticas de las especies de *Streptomyces* patógenas. Por otro lado, se evaluaron otras actividades de interés para lo cual se optimizaron nuevas metodologías de *screening* como la actividad nematocida y de promoción de crecimiento vegetal. Se identificaron 17 cepas de *Streptomyces* con actividad nematocida frente a *C. elegans*. Por otra parte, se

identificaron varias cepas con propiedades de actividad promotora de crecimiento vegetal, como la producción de compuestos que solubilizan el fósforo, de sideróforos y de hormonas vegetales. Posteriormente, se profundizó en la determinación de los metabolitos responsables de estas actividades en cinco de estas cepas abordando un enfoque genómico y metabolómico. En cuanto a los estudios de minería genómica, se encontraron varios grupos de genes biosintéticos (BGCs) de diversos tipos entre las cepas analizadas, donde la mayoría presentan nula o muy baja similitud con otros BGCs reportados, evidenciando la existencia de BGCs desconocidos. El estudio metabolómico se basó en el uso de cromatografía líquida acoplada a detector de masas en tándem y plataformas de análisis asociadas a bases de datos para determinar los compuestos presentes en las muestras. Los resultados obtenidos permitieron contar con posibles candidatos, y además revelaron una alta proporción de estructuras químicas desconocidas. Por último, se realizó un análisis genético funcional en una de las cepas con actividad nematocida para evaluar el rol de la antimicina como compuesto responsable de su actividad. Para ello, se construyó un mutante *knock out* del gen *antC* mediante la estrategia CRISPR-Cas9. No se detectaron diferencias claras entre el fenotipo nematocida de la cepa salvaje y mutante, por lo que se sugiere la presencia de otros compuestos responsables de la actividad. La ejecución de esta tesis fue clave para la implementación de nuevas herramientas de análisis metabolo-genómicos que serán de gran utilidad para futuros proyectos. Además, se cuenta con un repertorio de cepas bioactivas caracterizadas y con un gran volumen de datos sobre sus perfiles metabólicos y genómicos que sugieren la existencia de nuevas moléculas sobre las cuales continuar profundizando.

An integrative genomic mining and metabolomics approach to elucidate the potential of bioactive compounds in Streptomyces strains from Uruguay

Valentina Croce, Mag.

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2023

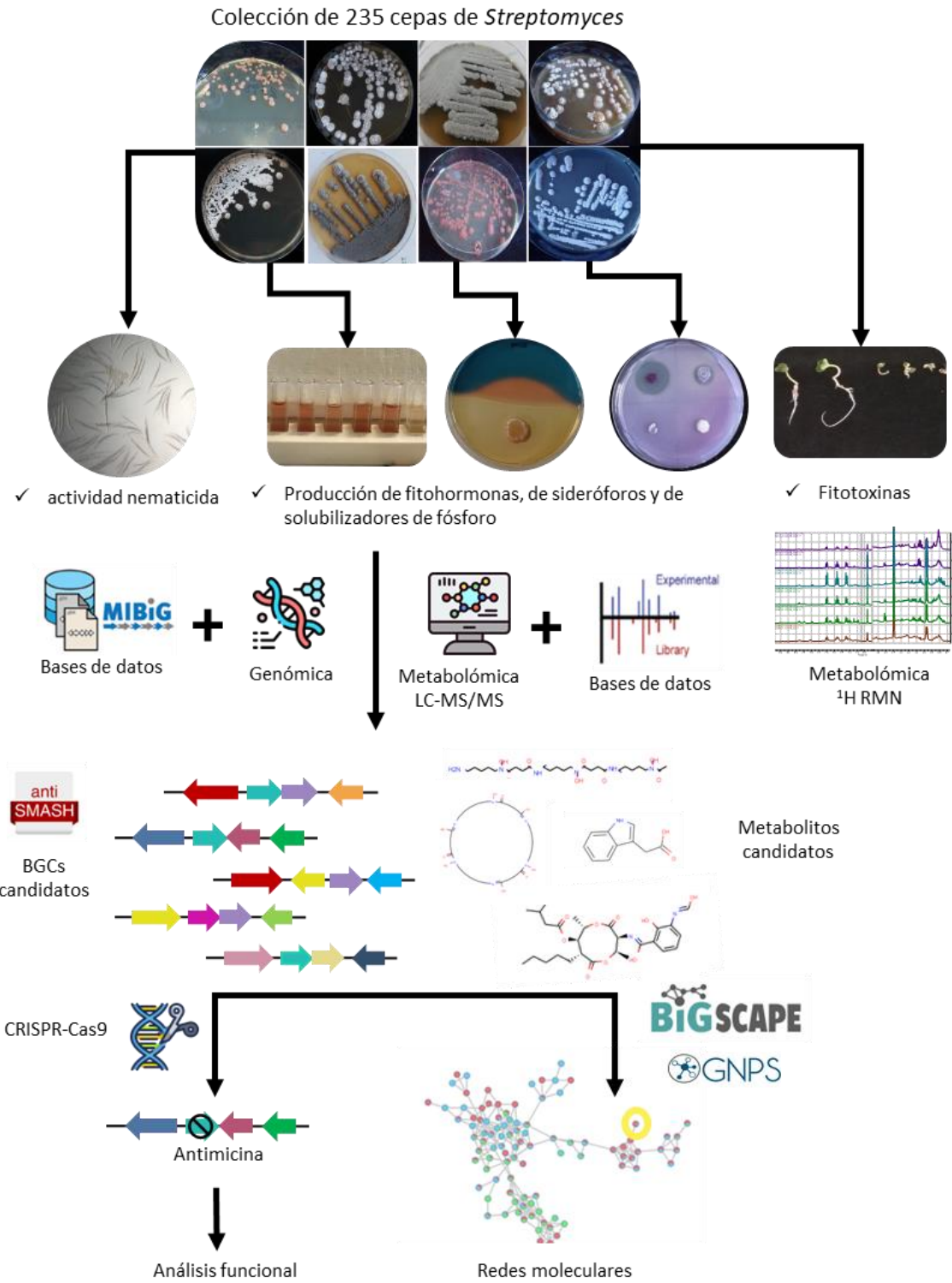
DIRECTOR: Dra. María Inés Siri, Dr. Guillermo Moyna y Dra. María Julia Pianzola

(Facultad de Química y CENUR Litoral Norte, Universidad de la República)

The *Streptomyces* genus is recognized for its metabolic versatility and capacity to produce bioactive metabolites. Despite decades of studies, new natural products derived from *Streptomyces* continue to be discovered, highlighting the importance of continuing to explore this genus for compounds with therapeutic potential and biotechnological applications. The present thesis allowed the characterization of a collection of 235 *Streptomyces* strains isolated in Uruguay in terms of their potential for the production of bioactive metabolites. First, the phytotoxic compounds responsible for the pathogenicity on potato of different *Streptomyces* species were determined from the ^1H NMR metabolomic profiles of the culture supernatants of some *Streptomyces* strains in the collection. A metabolomic model capable of classifying the strains based on their phytotoxicity was established, showing correlations between the metabolic profiles and the phylogenetic relationships of the pathogenic *Streptomyces* species. Furthermore, a *screening* of other activities of interest was carried out, for which new screening methodologies such as nematicide activity and plant growth promotion were optimized. Seventeen local strains with nematicidal activity against *C. elegans* were identified. On the other hand, several strains with plant growth promoting activity properties were identified, such as the production of phosphorus solubilizing compounds, siderophores and plant

hormones. Subsequently, the determination of the metabolites responsible for these activities in five of these strains was deepened, taking a genomic and metabolomic approach. As for the genomic mining studies, several groups of biosynthetic genes (BGCs) of various types were found among the analyzed strains, where most of them present no or very little similarity with other reported BGCs, evidencing the existence of unknown BGCs. The metabolomic study was based on the use of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and analysis platforms associated with databases to determine the compounds present in the samples. The results obtained allowed us to have possible candidates and revealed a high proportion of unknown chemical structures. Finally, a functional genetic analysis was performed on one of the strains with nematicidal activity to evaluate the role of antimycin as the compound responsible for its activity. For this, a knockout mutant of the *antC* gene was constructed using the CRISPR-Cas9 strategy. No clear differences were detected between the nematicidal phenotype of the wild type and the mutant strain, so the presence of other compounds responsible for the activity is suggested. The execution of this thesis was key to the implementation of new metabologenomic analysis tools that will be very useful for future projects. In addition, there is a repertoire of characterized bioactive strains and a large volume of data on their metabolic and genomic profiles that suggest the existence of new molecules for future studies.

RESUMEN GRÁFICO



Contenido

CAPÍTULO 1	INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1	Los actinomicetos y el género <i>Streptomyces</i>	2
1.2	Productos naturales del género <i>Streptomyces</i>	5
1.3	Principales clases de productos naturales producidos por <i>Streptomyces</i> y su biosíntesis	7
1.4	Un nuevo concepto: metabolismo especializado.....	11
1.5	El particular genoma de los actinomicetos.....	13
1.6	Estrategias para el descubrimiento de nuevos metabolitos especializados de <i>Streptomyces</i>	15
1.6.1	Minería genómica.....	17
1.6.2	Metabolómica.....	19
1.6.3	Integración metabologénica	22
1.7	Antecedentes de trabajo y justificación	23
1.8	Objetivos y descripción de la tesis.....	25
1.8.1	Objetivo general:	25
1.8.2	Objetivos específicos:	25
1.8.3	Descripción de la Tesis.....	25
CAPÍTULO 2	CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FITOTÓXICOS PRODUCIDOS POR CEPAS DE <i>STREPTOMYCES</i> PATÓGENAS MEDIANTE UN ABORDAJE METABOLÓMICO Y FILOGENÉTICO	27
2.1	Introducción.....	28
2.2	Materiales y métodos	31
2.2.1	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	31
2.2.2	Bioensayo de fitotoxicidad en rabanito	33
2.2.3	Análisis por HPLC-UV	33
2.2.4	Análisis filogenético de las cepas	34
2.2.5	Detección molecular de genes específicos de DMSN y TXT	35

2.2.6	Espectroscopía por RMN	35
2.2.7	Análisis estadístico multivariado	36
2.3	Resultados.....	38
2.3.1	La mayoría de los sobrenadantes de las cepas de <i>Streptomyces</i> patógenas presentaron actividad fitotóxica	38
2.3.2	Correlación de la fitotoxicidad con fitotoxinas ya conocidas producidas por <i>Streptomyces</i>	39
2.3.3	Conectando el perfil metabólico con el potencial patogénico y la filogenia de las cepas.	41
2.4	Discusión	46
CAPÍTULO 3 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD NEMATICIDA Y DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL EN CEPAS DE <i>STREPTOMYCES</i> AISLADAS EN URUGUAY		53
3.1	Introducción.....	54
3.1.1	Actividad antiparasitaria.....	54
3.1.2	Actividad de promoción de crecimiento vegetal	57
3.2	Materiales y métodos	61
3.2.1	Optimización de las condiciones del ensayo de actividad nematicida	61
3.2.2	Metodología optimizada para la evaluación de actividad nematicida en sobrenadantes de cultivo	62
3.2.3	<i>Pre-screening</i> de actividad nematicida	63
3.2.4	<i>Screening</i> de actividad nematicida.....	64
3.2.5	Identificación molecular de las cepas con actividad nematicida	65
3.2.6	Preparación de extractos orgánicos y acuosos a partir de sobrenadantes de cepas seleccionadas con actividad nematicida.....	65
3.2.7	<i>Screening</i> de propiedades de promoción de crecimiento vegetal <i>in vitro</i>	66
3.3	Resultados.....	70
3.3.1	Optimización de las condiciones del ensayo de actividad nematicida	70
3.3.2	Selección de cepas de <i>Streptomyces</i> productoras de compuestos con actividad nematicida.....	71

3.3.3	Actividad nematocida en extractos acuosos y orgánicos de las cepas seleccionadas	76
3.3.4	Identificación molecular de las cepas de <i>Streptomyces</i> seleccionadas con actividad nematocida	79
3.3.5	<i>Screening</i> de propiedades directas de PCV en cepas de <i>Streptomyces</i> seleccionadas	81
3.4	Discusión	87
CAPÍTULO 4 ESTUDIO METABOLOGENÓMICO DE UNA SELECCIÓN DE CEPAS DE <i>STREPTOMYCES</i> SPP. BIOACTIVAS		92
4.1	Introducción	93
4.1.1	Minería de genomas	93
4.1.2	Minería metabolómica	95
4.2	Materiales y métodos	99
4.2.1	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	99
4.2.2	Análisis genómico	100
4.2.3	Análisis metabolómico	106
4.3	Resultados	111
4.3.1	Secuenciación del genoma completo de cepas de <i>Streptomyces</i> seleccionadas 111	
4.3.2	Ensamblaje de los genomas	112
4.3.3	Anotación de los genomas ensamblados	114
4.3.4	Identificación y relaciones taxonómicas de las cepas	116
4.3.5	Minería genómica	120
4.3.6	Análisis de BGCs desde una perspectiva global: BiG-SCAPE	126
4.3.7	Análisis metabolómico: construcción de redes moleculares	132
4.3.8	Compuestos bioactivos candidatos en base a coincidencias obtenidas con bibliotecas de GNPS y su conexión con sus BGCs	136
4.3.9	Búsqueda de compuestos nematocidas en la base de datos del NPAtlas	143
4.4	Discusión	147

CAPÍTULO 5	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE ANTIMICINAS MEDIANTE LA CONSTRUCCIÓN DE UN MUTANTE <i>KNOCK-OUT</i>	156
5.1	Introducción	157
5.2	Materiales y métodos	162
5.2.1	Búsqueda de antimicinas en la cepa MAI 2237	162
5.2.2	Construcción del mutante de <i>Streptomyces</i> MAI 2237 Δ <i>antC</i> utilizando la metodología CRISPR-Cas9	162
5.2.3	Evaluación de la actividad nematicida frente a <i>C. elegans</i> en la cepa <i>Streptomyces</i> MAI 2237 y el mutante Δ <i>antC</i>	178
5.3	Resultados	179
5.3.1	Análisis del BGC de antimicina de la cepa MAI 2237 y verificación de su expresión	179
		181
5.3.2	Evaluación de la capacidad de conjugación y sensibilidad a antibióticos de la cepa a modificar	182
5.3.3	Construcción del plásmido pCRISPR con los elementos necesarios para realizar la edición genética	183
5.3.4	Conjugación y edición genómica de MAI 2237	186
5.3.5	Curado del plásmido	188
5.3.6	Evaluación de la actividad nematicida de la cepa MAI 2237 Δ <i>antC</i>	188
5.4	Discusión	190
CAPÍTULO 6	CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	195
	BIBLIOGRAFÍA	198
	ANEXOS	

Lista de Tablas

Tabla 2.1. Lista de 29 cepas patógenas de <i>Streptomyces</i> utilizadas en este estudio, su fitotoxicidad, identificación taxonómica y detección de compuestos fitotóxicos conocidos mediante HPLC-UV y de los genes involucrados mediante PCR.	32
Tabla 3.1. Resultados de actividad nematocida (observación a la lupa) en los extractos acuosos y orgánicos de las 17 cepas seleccionadas.	77
Tabla 3.2. Resultados de actividad nematocida (observación a la lupa) en los extractos orgánicos de las 5 cepas seleccionadas en 3 medios de cultivo.	78
Tabla 3.3. Resumen de resultados de actividad de promoción de crecimiento vegetal con las 25 cepas de <i>Streptomyces</i> seleccionadas en base a su actividad nematocida, antibacteriana y antifúngica.	81
Tabla 4.1. Actividades biológicas de las cepas de <i>Streptomyces</i> spp. seleccionadas para el estudio metabolo-genómico.	99
Tabla 4.2. Plataformas y tipos de ensamblaje utilizados para la obtención de la secuencia genómica de las 5 cepas de <i>Streptomyces</i> seleccionadas.	102
Tabla 4.3. Análisis de calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación	111
Tabla 4.4. Análisis del ensamblaje de los genomas.	112
Tabla 4.5. Análisis de calidad de los genomas en base a sus genes esenciales.	113
Tabla 4.6. Características de la anotación de los genomas usando RAST.	114
Tabla 4.7. Identificación obtenida por el cálculo del ANI.	116
Tabla 4.8. Resumen de las especies más relacionadas obtenidas a partir de los análisis filogenómicos.	119
Tabla 4.9. Resumen de los BGCs con similitud mayor al 80% con los reportados en MIBiG en las cepas secuenciadas.	123
Tabla 4.10. Coincidencias relevantes encontradas con IDs de las bibliotecas de GNPS.	139
Tabla 4.11. Coincidencias obtenidas en las muestras con actividad nematocida en el NP atlas.	144
Tabla 5.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este capítulo.	164
Tabla 5.2. Lista de <i>primers</i> diseñados utilizados en este capítulo	166

Lista de Figuras

Figura 1.1 A. Colonia madura de <i>Streptomyces coelicolor</i> . B. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> spp.	5
Figura 1.2. Esquema de los principales productos naturales bacterianos disponibles en la plataforma NP Atlas.....	6
Figura 1.3. Principales clases de productos naturales del género <i>Streptomyces</i> y ejemplos.	8
Figura 1.4. Distribución de los BGCs en <i>Streptomyces coelicolor</i>	14
Figura 1.5. Visión general de los enfoques de minería genómica y metabolómica para identificar BGCs y metabolitos especializados en <i>Streptomyces</i>	16
Figura 2.1. Resultados representativos del ensayo de fitotoxicidad en plántulas de rabanito 6 días después de la inoculación con los sobrenadantes de cepas de actinomicetos evaluadas en este trabajo.	38
Figura 2.2. Cromatogramas representativos y espectros UV de la detección de taxtomina A (TXT) y desmetilmensacarcina (DMSN) en sobrenadantes de cepas patógenas de <i>Streptomyces</i>	40
Figura 2.3. (A) Espectros apilados de ¹ H RMN de los sobrenadantes de las 58 cepas de actinomicetos analizadas en este estudio. (B) Gráfico de PCA obtenido de los datos espectrales de ¹ H RMN.....	42
Figura 2.4. Gráficos de OPLS-DA (A) y de carga (B) obtenidos del análisis entre 27 cepas de <i>Streptomyces</i> fitotóxicas (P) y 31 no fitotóxicas (NP).	43
Figura 2.5. Dendograma HCA de las 29 cepas patógenas realizado por el método de Ward utilizando los datos de ¹ H RMN centrados en la media y con escala de Pareto.....	44
Figura 3.1. Avermectinas (A) Cluster biosintético, (B) ruta biosintética y (C) estructura química de las avermectinas	56
Figura 3.2. Flujo de trabajo para la evaluación de actividad nematocida sobre una colección de 147 cepas de <i>Streptomyces</i>	64
Figura 3.3. Resultados de actividad nematocida registrada a 0, 24 y 48 hs (datos normalizados al 100% del valor inicial).	72

Figura 3.4. Fotos obtenidas de la visualización bajo lupa (75x) de los sobrenadantes de <i>Streptomyces</i> luego de 24 hs de incubación con <i>C. elegans</i> .	73
Figura 3.5. Gráficos de los resultados de motilidad (<i>Wmicrotracker</i>) de <i>C. elegans</i> obtenidos para el ensayo de evaluación de actividad nematocida de sobrenadantes de cultivo de cepas de <i>Streptomyces</i> .	75
Figura 3.6. Foto de los gusanos luego de 24 hs con el extracto de la cepa MAI 2213 en OBB (A) y MAI 2274 en SFM (B).	79
Figura 3.7. Árbol filogenético de una secuencia parcial del gen <i>rpoB</i> realizado mediante <i>Neighbour joining</i> utilizando 1000 <i>bootstraps</i> .	80
Figura 3.8. Curvas de calibración para la detección de auxinas y IAA. (A) Método colorimétrico a partir del reactivo de Salkowski. (B) Método por HPLC-UV.	83
Figura 3.9. Cromatograma de intensidad vs. tiempo obtenido a partir del método de detección de ácido indolacético por HPLC-UV (280nm) optimizado en este trabajo.	84
Figura 3.10. Ensayo de solubilización de fosfato inorgánico y orgánico.	85
Figura 3.11. Ensayo de producción de sideróforos utilizando el medio CAS en media placa y YME en la otra mitad sobre la cual se inoculó la cepa de <i>Streptomyces</i> a evaluar.	86
Figura 4.1. Enfoques computacionales para la minería de genomas.	95
Figura 4.2. Tecnologías de redes moleculares en metabolómica.	97
Figura 4.3. Diagrama de Venn para las 5 cepas de <i>Streptomyces</i> secuenciadas.	115
Figura 4.4. Árbol filogenómico obtenido con FastME 2.1.6.1 a partir de las distancias GBDP calculadas con los genomas de las cinco cepas de <i>Streptomyces</i> .	119
Figura 4.5. Categorías de clusters genéticos involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios (BGCs) presentes en los 5 genomas de <i>Streptomyces</i> secuenciados.	121
Figura 4.6. Porcentaje de similitud de los clusters de genes biosintéticos presentes en los 5 genomas de <i>Streptomyces</i> secuenciados respecto a los BGCs reportados en MIBiG.	122
Figura 4.7. Red molecular generada mediante BiGSCAPE referenciada según la cepa, incluyendo los BGCs de MIBiG como se indica a la derecha de la imagen.	127
Figura 4.8. Estructura de los <i>clusters</i> genéticos relacionados con la biosíntesis de sideróforos presentes en las familias (GCFs) 894, 1973, 2036. Imagen obtenida de BiG-SCAPE.	129

Figura 4.9. Estructura de los <i>clusters</i> genéticos relacionados a la biosíntesis de antimicina de la familia 1151. Imagen obtenida de BiG-SCAPE.	130
Figura 4.10. Estructura de los <i>clusters</i> genéticos relacionados a la biosíntesis de informatipeptina de la familia 1981. Imagen obtenida de BiG-SCAPE.	131
Figura 4.11. Familia 1976 formado por <i>clusters</i> genéticos asociados a la biosíntesis de RiPPs presentes en los genomas de las 5 cepas de <i>Streptomyces</i> seleccionadas.	131
Figura 4.12. Distribución de los BGCs solitarios (singletons) en las 5 cepas luego del reagrupamiento por BiGSCAPE incluyendo las cepas más similares filogenéticamente y la cepa de referencia de <i>S. avermitilis</i> (MA-4680).	132
Figura 4.13. Gráficos de los perfiles químicos obtenidos en GNPS a partir de los espectros de LC-MS/MS de los sobrenadantes de cultivo de 5 cepas de <i>Streptomyces</i> incubadas en tres medios (OBB, SFM y TSB) y sus respectivos controles sin inocular.	133
Figura 4.14. Red molecular generada en GNPS con los espectros de fragmentación resultante del análisis por LC-MS/MS obtenidos de los sobrenadantes de cultivo de 5 cepas de <i>Streptomyces</i> incubadas en 3 medios de cultivo.	135
Figura 4.15. Coincidencias con algunos IDs de las bibliotecas de GNPS.	141
Figura 4.16. Familias moleculares con algunas coincidencias de las librerías obtenidas mediante GNPS con los datos de MS/MS de las 5 cepas en los tres medios de cultivo ..	142
Figura 4.17. Red molecular obtenida con GNPS. Se destacan los nodos de los iones precursores que presentaron coincidencias en la comparación con los valores de M+H de la base de datos del NPAtlas.	146
Figura 5.1. Estructura de las antimicinas. Tomado de Liu et al., 2016.	158
Figura 5.2. BGC y vía biosintética de las antimicinas. Adaptado de Liu et al, 2016.	160
Figura 5.3. Plásmido pCRISPomyces-2 (Cobb et al., 2015) utilizado para la edición genómica en <i>Streptomyces</i> MAI 2237. Figura realizada en SnapGene v. 6.0.3.	164
Figura 5.4. Proto-espaciadores seleccionados (sgRNA_18 y sgRNA_22) dentro del gen <i>antC</i> de <i>Streptomyces</i> MAI 2237.	168
Figura 5.5. (A) Tipos de ensamblaje utilizados en este trabajo para la construcción del mutante por la metodología CRISPR-Cas. (B) Mapas de los plásmidos	170

Figura 5.6. Esquema de la estrategia de generación del mutante <i>knock out</i> de <i>Streptomyces</i> MAI 2237 $\Delta antC$	175
Figura 5.7. <i>Screening</i> de colonias sensibles a apramicina mediante <i>replica plating</i> para la curación del plásmido pCRISPR.	177
Figura 5.8. BGC de antimicina de la cepa de <i>Streptomyces</i> MAI 2237.....	180
Figura 5.9. (A) Cromatograma obtenido mediante LC-MS/MS para la muestra correspondiente al extracto de la cepa MAI 2237 en medio SFM. (B, C, D y E) Cromatogramas extraídos del ión precursor M+H (EIC) para las estructuras de las antimicinas.....	181
Figura 5.10. Evaluación de la capacidad de conjugación (A) y de la sensibilidad a antibióticos (B) de la cepa a modificar <i>Streptomyces</i> MAI 2237.....	182
Figura 5.11. Resultados del ensamblaje <i>Golden Gate</i> y transformación en <i>E. coli</i> XL-gold en placas de LB conteniendo apramicina, X-Gal e IPTG.....	183
Figura 5.12. Geles de agarosa 1%. (A) Optimización de la temperatura de hibridación para la amplificación de los brazos homólogos. (B) Chequeo de la integridad de los plásmidos pCRISPR-sg18 (1) y pCRISPR-sg22 (2).	184
Figura 5.13. Resultados de la transformación posterior al ensamblaje tipo Gibson en placas de LB con apramicina.....	185
Figura 5.14. Gel de agarosa 1% para la confirmación de la construcción de los dos plásmidos pCRISPR completos mediante PCR.	186
Figura 5.15. Placa de SFM con ácido nalidíxico y apramicina resultante de la conjugación ET/pCRISPR-sg22-Arms: MAI 2237.	186
Figura 5.16. Gel de agarosa 1% de los productos de PCR para el chequeo del mutante MAI 2237 $\Delta antC$	188

Lista de abreviaturas

°C	grados Celsius
μL	microlitros
¹ H RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANI	Identidad Nucleotídica Media
ARN	Ácido ribo nucleico
BGCs	Biosynthetic Gene Clusters (grupos de genes biosintéticos)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPCV	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal
BSA	Seroalbúmina bovina
CDS	Secuencias codificantes
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DDH	Hibridación ADN-ADN
DMSN	Desmetilmensacarcina
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleotidos trifosfato
EM	Espectrometría de masas
FMs	Familias moleculares
GC	Guanina-Citosina
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HCA	Análisis jerárquico de conglomerados
HGT	<i>horizontal gene transfer</i> (transferencia genética horizontal)
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
IAA	Ácido indolacético
ISP	<i>International Streptomyces Project</i>
Kan	kanamicina

Kb Kilobases

KHz Kilo Hertz

LC-MS/MS Cromatografía líquida acoplada a detector de masas en tándem

M molar

m/z Masa/carga

MHz Mega Hertz

min minutos

MLSA Multilocus Sequence Analysis

MLST Multilocus Sequence Typing

NRP Péptido no ribosomal

NRPS Sintetasas de péptidos no ribosomales

ONT Oxford Nanopore Technologies

OPLS-DA Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales

P Fósforo

PCA Análisis de componentes principales

PCR Reaccion en cadena de la polimerasa

PCV Promoción de crecimiento vegetal

Ppm Partes por millón

RiPPs Péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente

RMN Resonancia magnética nuclear

rpm revoluciones por minuto

s Segundos

SC Sarna comun

TSP Ácido trimetilsililpropanoico

TXT Taxtomina

UV Ultravioleta

WT Wild type (cepa silvestre)

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Los actinomicetos y el género *Streptomyces*

El término “actinomiceto” se utiliza convencionalmente para describir cualquier actinobacteria filamentosa Gram positiva del suelo, incluidas las del género más prolífico, *Streptomyces* (Traxler y Kolter, 2015). Los actinomicetos se encontraron por primera vez en crecimientos óseos provocados por la “mandíbula grumosa”, una enfermedad que afectaba al ganado vacuno en la década de 1870 (Waksman y Curtis, 1916). La palabra “actinomiceto” deriva del latín *aktino* que significa “sol” o “rayo”, y que hace referencia a estructuras con filamentos en disposición radiada; y *mycete*, que significa “hongo”. Es decir, fueron descritos inicialmente como hongos radiales que formaban finos filamentos. Esta descripción deriva de su morfología de crecimiento macroscópico, que es muy similar a la de los hongos filamentosos. A través de los años los actinomicetos han sido clasificados de diversas maneras. En un principio formaron parte de los hongos verdaderos, y posteriormente fueron considerados un posible intermediario entre los hongos y las bacterias. Esto se debía a que las colonias de actinomicetos presentaban características tanto de los hongos como de las bacterias. Al igual que algunos hongos, las superficies de sus colonias son difusas debido a su crecimiento hifal, pero sus filamentos son mucho más delgados, similar a la de las células bacterianas. De hecho, este dilema no se resolvió hasta finales de la década de 1950, cuando la microscopía electrónica demostró de forma concluyente que la estructura celular de los actinomicetos era de naturaleza bacteriana Gram-positiva (Hopwood, 2006; Traxler y Kolter, 2015).

En definitiva, “actinomiceto” no es una designación filogenética formal, sino que es una denominación para nombrar a las actinobacterias filamentosas, designación que se considera más aceptada científicamente por tener un significado taxonómico. Las actinobacterias constituyen un filo extenso y complejo, y se definen como bacterias Gram positivas con alto contenido en GC en sus genomas (Swanson M. et al., 2022). Es uno de los grupos bacterianos con mayor diversidad en la naturaleza, existen morfologías desde cocos o bastones (*Micrococcus*, *Mycobacterium*) hasta hifas fragmentadas (*Nocardia*) o micelio altamente ramificado (*Streptomyces*). Incluye especies de gran importancia ecológica,

industrial, médica y científica, y su hábitat principal son los suelos, material vegetal y ambientes acuáticos (van Bergeijk et al., 2020). Se estima que un gramo de suelo contiene aproximadamente 10^9 unidades formadoras de colonia (ufc) de bacterias totales, de las cuales 10^7 corresponden a actinobacterias (Alam et al., 2022).

Los miembros del género *Streptomyces* (también llamados estreptomicetos) son los más populares dentro de este grupo y se caracterizan por su habilidad de producir un gran repertorio de metabolitos secundarios. De hecho, el sufijo –micina indica una droga originariamente producida por un estreptomiceto (Traxler y Kolter, 2015). El género *Streptomyces* está constituido por bacterias filamentosas, formadoras de esporas, grampositivas, aerobias, y capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Residen en una amplia variedad de ambientes, incluyendo ambientes extremos, terrestres, marinos, simbiontes, endófitos, etc. Es uno de los taxones más diversos entre las bacterias, ya que hasta el momento se han descrito más de 850 especies (Alam et al., 2022). Su taxonomía ha sufrido una sobre-especiación debido a que las cepas productoras de compuestos bioactivos novedosos se describen como nuevas especies y son patentadas como parte del proceso de descubrimiento (Nouioui et al., 2018). La introducción del enfoque taxonómico polifásico combinó análisis moleculares y bioquímicos que mejoraron la sistemática de los estreptomicetos. Además, la mayor disponibilidad de datos de secuencias ha permitido realizar estudios precisos de las afiliaciones taxonómicas y las relaciones filogenéticas (Sousa y Olivares, 2016). De todas las especies identificadas, solo una baja proporción (una docena de especies) son consideradas patógenas de plantas, siendo la papa el cultivo más afectado y relevante desde el punto de vista económico (Loria et al., 2006).

Los miembros del género *Streptomyces* son típicos habitantes de suelo, donde encuentran las condiciones necesarias para su crecimiento y proliferación. Estas bacterias se caracterizan por producir una gran variedad de enzimas extracelulares que les permite nutrirse de compuestos que no pueden ser degradados por los otros microorganismos del ecosistema, entre ellos las paredes de hongos y plantas, polisacáridos y exoesqueletos de

insectos. Además, la habilidad de producir esporas (Figura 1.1A) contribuye a su supervivencia por largos períodos de tiempo, de sequía, heladas, presión hidrostática y condiciones anaeróbicas producidas por la saturación por agua (Viaene et al., 2016).

Los estreptomicetos tienen un ciclo de vida muy particular, ya que durante parte del mismo crecen como un micelio vegetativo compuesto por muchas células ramificadas y filamentosas, por eso se dice que tienen una naturaleza multicelular (Figura 1.1B). Sin embargo, este micelio vegetativo no crece indefinidamente. Cuando los nutrientes se vuelven limitantes, o en respuesta a otras señales ambientales, se inicia un proceso de desarrollo morfológico particular (Claessen et al., 2004). El crecimiento del micelio vegetativo se reduce, o incluso sufre lo que parece ser un mecanismo similar a la muerte celular programada (Tenconi et al., 2018). En esta situación muchas vías biosintéticas se inducen y, por lo tanto, los procesos de desarrollo morfológico y metabolismo especializado están vinculados. También comienzan a crecer las hifas aéreas en la superficie de la colonia, lo cual permite su expansión radial y facilita su migración a otros microambientes. Este proceso es particularmente relevante para bacterias que crecen como saprófitos en el suelo (con abundantes nutrientes pero distribuidos heterogéneamente), ya que la alta relación área/volumen de las hifas podría facilitar el intercambio de nutrientes. Un importante punto de control en este proceso es la producción de varias proteínas (como las rodlinas y chaplinas) y péptidos que recubren la superficie de la hifa aérea dando como resultado una capa hidrofóbica que es clave para romper la tensión superficial en la interfaz colonia/aire (Elliot et al., 2003; Claessen et al., 2004). El extremo distal de la hifa aérea luego desarrolla tabiques (o septos) que resultan en la formación de muchas esporas unigenómicas. Las esporas son resistentes a muchos cambios ambientales, incluyendo la desecación y las temperaturas extremas (Traxler y Kolter, 2015). La forma de las cadenas de esporas, que pueden ser rectas, ramificadas, espirales u onduladas, es una característica taxonómica importante de estos microorganismos (Loria et al., 2006).

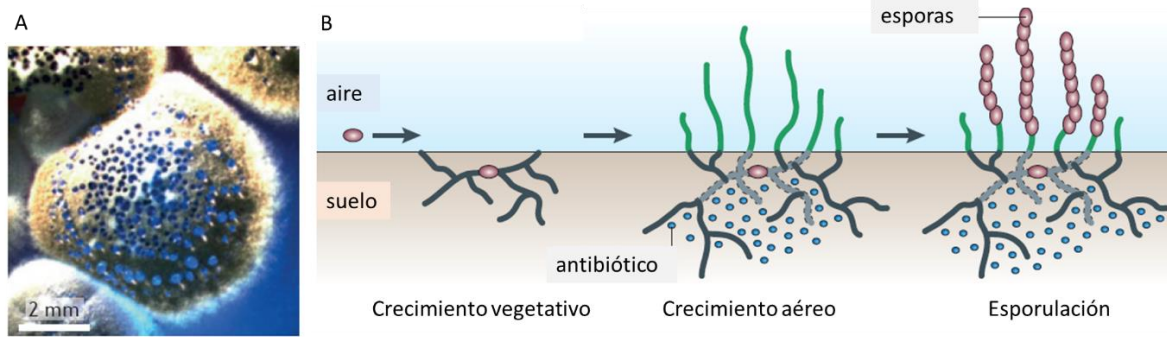


Figura 1.1 A. Colonia madura de *Streptomyces coelicolor*. Puede verse la capa gris esponjosa de micelio aéreo en esporulación en la superficie de la colonia, que produce vesículas con un pigmento azul que corresponde al antibiótico actinorrodina. B. Ciclo de vida de *Streptomyces* spp. La germinación de esporas lleva al crecimiento del micelio vegetativo. En respuesta a señales de estrés, se desarrolla un micelio aéreo para separar físicamente las células del ambiente estresante. El crecimiento aéreo coincide con la producción de antibióticos que sirven para proteger la reserva de nutrientes que se libera durante el desmantelamiento del micelio vegetativo. Las hifas aéreas se desarrollan en cadenas de exoesporas, que, después de la dispersión, pueden iniciar el crecimiento en otros sitios. Figuras adaptadas de Claessen et al. (2014).

1.2 Productos naturales del género *Streptomyces*

Se han descrito numerosos productos naturales bioactivos derivados de *Streptomyces* con muy diversas actividades y aplicaciones incluyendo agentes antimicrobianos, antivirales, citotóxicos, antitumorales, antioxidantes, promotores de crecimiento vegetal y herbicidas. Así, los metabolitos se pueden clasificar en cuatro clases: (i) compuestos con actividades reguladoras donde se incluyen agentes morfogénicos, sideróforos y factores de crecimiento, (ii) agentes antagonistas como antiprotozoarios, antibacterianos, antifúngicos y antivirales, (iii) agentes agrobiológicos, como insecticidas, pesticidas y herbicidas, y (iv) drogas farmacológicas incluyendo agentes neurológicos, inmunomoduladores, antitumorales e inhibidores de enzimas (Rashad et al., 2015; Tamreihao et al., 2016; Silva et al., 2020; Alam et al., 2022).

La versión de setiembre 2022 del Atlas de Productos Naturales disponible online en <https://www.npatlas.org/discover/overview> contiene 33372 productos naturales aislados a partir de bacterias (13068) y hongos (20304) (van Santen et al., 2022). Dentro de los compuestos de origen bacteriano la gran mayoría son aislados de especies de *Streptomyces sp.* (55.5%), seguidos de especies de *Bacillus sp.* (4.5%) y *Microcystis sp.* (3.6%) (Figura 1.2).

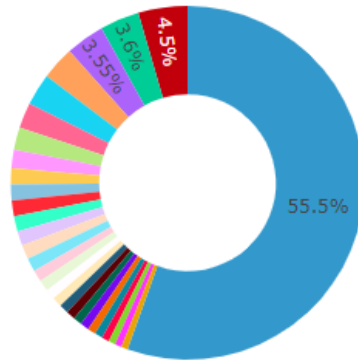


Figura 1.2. Esquema de los principales productos naturales bacterianos disponibles en la plataforma NP Atlas. El color celeste corresponde a el género *Streptomyces* (55.5%), el rojo a *Bacillus* (4.5%), el verde a *Microcystis* (3.6%), el lila a *Pseudomonas* (3,55%), los restantes colores corresponden a otros generos bacterianos.

Los antibióticos son quizás los productos más desarrollados a partir de metabolitos de *Streptomyces*. Los actinomicetos producen dos tercios de todos los antibióticos microbianos, con aproximadamente el 80% derivados del género *Streptomyces*, que son bien conocidos por sus usos terapéuticos y agrícolas (Alam et al., 2022). Desde el descubrimiento de la estreptomicina, se han reportado muchos antibióticos obtenidos a partir de cultivos de cepas de *Streptomyces* con un importante rol en salud humana y en la industria. Los productos naturales microbianos, particularmente aquellos producidos por actinobacterias filamentosas sustentan la mayoría de los antibióticos utilizados clínicamente. Desafortunadamente, solo se han descubierto unas pocas clases nuevas de antibióticos desde la década de 1970, ya que, en cierto momento, los programas industriales de descubrimiento de antibióticos dejaron de ser económicamente viables y las

grandes farmacéuticas se desprendieron de ellos. Esta reducción de la capacidad de descubrimiento de antibióticos se ha producido en un contexto de aumento de las infecciones resistentes a los antimicrobianos, hasta el punto de que ahora hay una necesidad urgente de descubrir y desarrollar nuevos antimicrobianos (Hoskisson y Seipke, 2020).

Como se mencionó anteriormente, además de antibióticos, los estreptomicetos tienen un amplio rango de actividades biológicas. En el Capítulo 3 se realiza una descripción de las actividades biológicas que serán abordadas en esta tesis.

1.3 Principales clases de productos naturales producidos por *Streptomyces* y su biosíntesis

La biosíntesis de productos naturales generalmente abarca un ensamblaje en tres fases: en la fase I se incorporan los bloques de construcción (precursores), acil-CoAs, aminoácidos, nucleótidos; en la fase II se sintetiza la molécula central (cadena de ensamblaje) y en la fase III se dan reacciones de modificación posteriores al ensamblaje (química redox, metilación, glicosilación, halogenación). Los genes que codifican para las diversas enzimas involucradas en una ruta biosintética específica se encuentran localizados en una misma región del genoma y son co-regulados de forma conjunta, conformando lo que se conoce como grupos de genes biosintéticos (BGCs, *Biosynthetic Gene Clusters*) (Terlouw et al., 2022).

En términos químicos, estos metabolitos pertenecen a un rango muy diverso de clases (Figura 1.3). Dentro de las familias más comunes, se encuentran: los péptidos; los cuales pueden ser péptidos no ribosomales (NRPs, *Nonribosomal Peptides*) o, péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs, *Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides*), los policétidos, los terpenos, los alcaloides, los carbohidratos, los nucleósidos y mezclas de estas clases (híbridos).

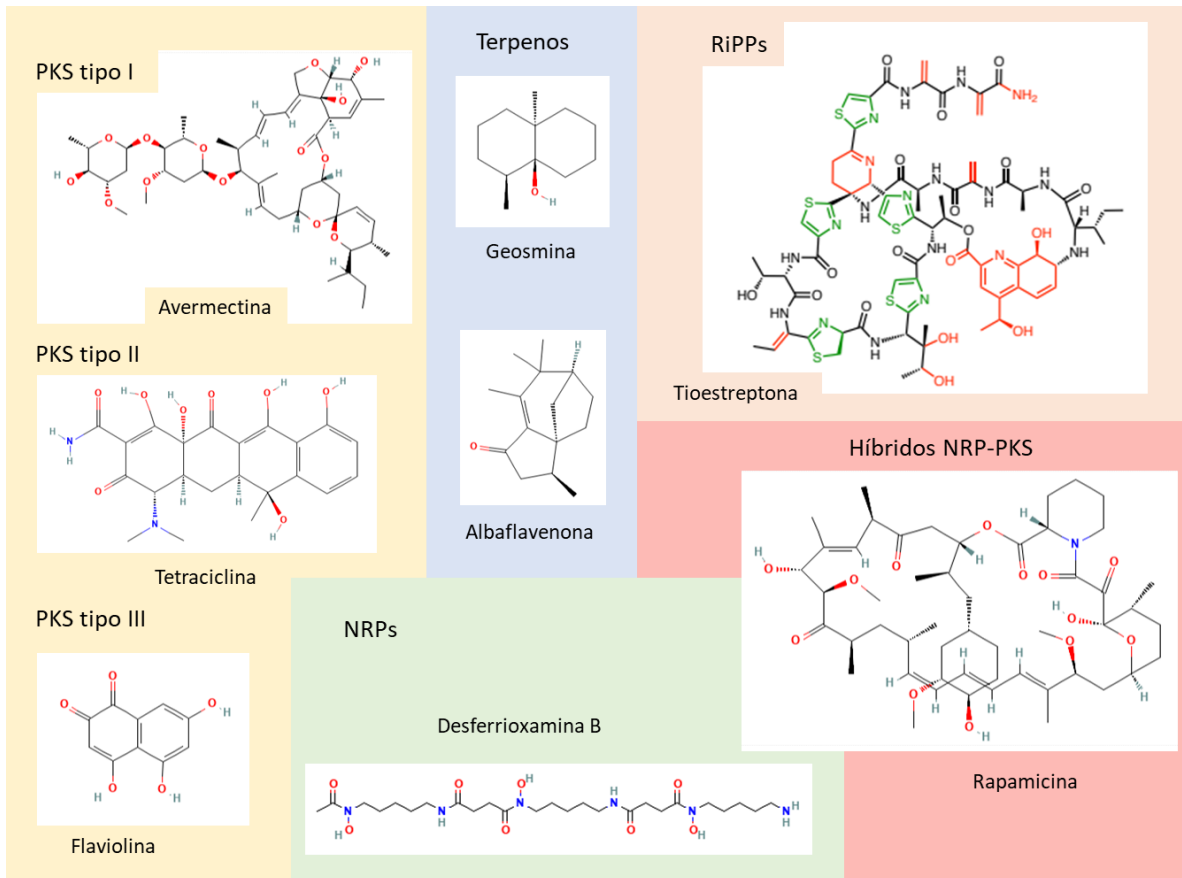


Figura 1.3. Principales clases de productos naturales del género *Streptomyces* y ejemplos. Se muestran ejemplos de: policétidos sintetizados por PKS tipo I, II y III (amarillo), péptidos no ribosomales (NRPs, verde), péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs, anaranjado), terpenos (azul) e híbridos NRPS-PKS (rojo).

Los péptidos no ribosomales son sintetizados por sintetazas de péptidos no ribosomales (NRPS, *nonribosomal peptide synthetases*) que tienen una organización modular. La biosíntesis procede a través de un proceso en el que el péptido en crecimiento está unido a una proteína portadora de péptidos (PCP, *peptidyl carrier protein*) durante el ensamblaje de la cadena. Cada extensión de cadena requiere la actividad de un dominio de adenilación (A) para la selección, activación y carga de un aminoácido, y de un dominio de condensación (C) para la formación del enlace peptídico. Los dominios opcionales pueden catalizar, entre otras cosas, modificaciones oxidativas o epimerizaciones, y la liberación del producto se realiza mediante un dominio de tioesterasa terminal (TE) para producir un ácido libre o un

producto ciclado (Tyc et al., 2017). La biosíntesis de estos péptidos no ribosómicos se encuentra resumida en esquema animado del siguiente enlace: (http://www.michaelmullowney.com/images/NRPS-animation-Mullowney_16-9_0.08.gif).

Un ejemplo importante de NRPs son los sideróforos que son compuestos quelantes de hierro de bajo peso molecular y alta afinidad por el hierro. Son producidos por microorganismos en condiciones limitadas de hierro, y cumplen su rol en la solubilización, transporte y almacenamiento del mismo (Chu et al., 2010). Por ejemplo, las desferrioxaminas son sideróforos del tipo hidroxamatos producidas por especies de *Streptomyces* (Figura 1.3).

Los RiPPs presentan un grado similar de diversidad química que los NRPs, pero lo logran a través de diversas modificaciones postraduccionales de un péptido precursor ribosomal. Esto permite que los RiPPs posean una amplia variedad estructural que dan lugar a una amplia gama de actividades biológicas (Arnison et al., 2013). La biosíntesis de RiPPs comienza con la producción ribosomal de un precursor peptídico que generalmente contiene un péptido líder N-terminal y una región central C-terminal que alberga los diferentes sitios de las modificaciones post-traduccionales. La maquinaria biosintética reconoce el péptido líder e inicia las diferentes modificaciones post-traduccionales en la región central. Finalmente, el péptido líder es eliminado por una o más peptidasas, a veces concomitantes con la ciclación de N-terminal a C-terminal, para producir el compuesto final. Los RiPPs se agrupan en diferentes subfamilias, entre las que se incluyen; los lassopéptidos, los lantipéptidos, y los tiopéptidos (por ejemplo la tioestreptona, Figura 1.3) (Ortega y Van Der Donk, 2016).

Los policétidos son una gran clase de metabolitos secundarios sintetizados por policétido sintasas (PKS, *Polyketide synthases*), que son una familia de enzimas multidominio o complejos enzimáticos. El mecanismo general de biosíntesis de policétidos comparte grandes similitudes con la de la biosíntesis de ácidos grasos, pero permite una variabilidad mucho mayor, así como modificaciones durante las extensiones de la cadena. La biosíntesis de policétidos es un proceso en el que la cadena de acilo en crecimiento se une a una

proteína transportadora de acilo (ACP). Los dominios de acil transferasa (AT) seleccionan el iniciador y unidades de elongación y los cargan a las ACPs. En cada extensión de cadena, la cetosintasa (KS) cataliza la condensación de la siguiente unidad de extensión con la cadena de acilo ensamblada hasta el momento, mientras que se requiere un dominio de cetorreductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoil reductasa (ER) para modificaciones reductoras opcionales. El dominio terminal TE es responsable de la liberación del producto, generalmente bajo la formación de un ácido libre o lactona (Tyc et al., 2017). Los policétidos se clasifican en tres tipos principales según las sintasas que participan en su biosíntesis (Shen, 2003). Las PKS de tipo I consisten en proteínas grandes con múltiples dominios que producen policétidos con un módulo por reacción de condensación sucesiva (PKS modulares) o por uso iterativo del mismo conjunto de dominios (PKS iterativas) en el ensamblaje de la cadena del policétido (Fischbach y Walsh, 2006). Un ejemplo de este tipo de policétidos son las avermectinas, las cuales se detallan en el capítulo 3. Las PKS de tipo II están compuestas por proteínas individuales que se utilizan en la formación de policétidos aromáticos, como las tetraciclinas (Hertweck et al., 2007). Las PKS de tipo III participan en la síntesis de polihidroxifenoles en bacterias, como la flaviolina (Figura 1.3). Las similitudes estructurales y funcionales entre las PKS y las NRPS permiten la formación de grupos que contienen elementos de ambas clases, conocidos como híbridos NRPS-PKS, los cuales pueden proporcionar aún más diversidad (Du et al., 2001). Un ejemplo de esto es la rapamicina (Figura 1.3), un antibiótico y antifúngico obtenido de una cepa de *Streptomyces* aislada de una muestra de suelo de la Isla de Pascua (Sehgal et al., 1975).

Los terpenos son compuestos volátiles que derivan de las unidades de construcción de terpenos (pirofosfato de dimetilalilo e isopentenilo pirofosfato), y pueden surgir de la vía del mevalonato o de la vía de la desoxixilulosa fosfato (Dickschat, 2011). Aunque los terpenos de origen bacteriano se conocen desde hace más de un siglo, sus funciones biológicas y ecológicas aún se desconocen. Incluso para la geosmina, el terpeno responsable del olor a tierra emitido por las bacterias del suelo, no se ha demostrado ninguna función

biológica hasta ahora (Tyc et al., 2017). Otro ejemplo de terpeno producido por cepas de *Streptomyces* es el antibiótico albaflavenona (Figura 1.3).

Los compuestos nitrogenados producidos por *Streptomyces* incluyen las pirazinas, pirroles, tiazoles, piridinas, y el indol. Este último, es sintetizado a partir del triptófano por la triptofanasa, y es reconocido como una molécula señal, modulando la formación de esporas, y controlando los sistemas de defensa, el crecimiento y el desarrollo de raíces de las plantas (Pandey et al., 2013; Lee et al., 2015). El indol y sus derivados pueden suprimir la patogenicidad bacteriana de varios patógenos resistentes a antibióticos debido a su capacidad de inhibir el *quórum sensing* y la producción de factores de virulencia. Los derivados del indol son abundantes en muchas comunidades microbianas, pero se sabe muy poco sobre sus roles biológicos y mecanismos de acción (Tyc et al., 2017).

Todas estas clases de productos naturales presentan una gran diversidad química y juegan un rol clave en la mediación de interacciones ecológicas entre organismos. Dicha diversidad surge porque cada metabolito es producido por una vía biosintética particular, influenciada por un conjunto de procesos complejos. Estos procesos incluyen la regulación transcripcional muy dinámica de los genes que codifican enzimas, así como la promiscuidad enzimática en cuanto a su unión al sustrato o regioselectividad y disponibilidad del sustrato dentro de la célula. Este gran espacio químico disponible y la increíble variedad y naturaleza dinámica de estas interacciones y presiones selectivas han llevado a los organismos a producir los cientos de miles de metabolitos existentes (van der Hooft et al., 2020). Esta característica se ha aprovechado ampliamente como un recurso valioso para el descubrimiento de fármacos.

1.4 Un nuevo concepto: metabolismo especializado

El término metabolismo abarca todas las reacciones químicas que tienen lugar en los sistemas vivos. En 1910, el químico alemán Albrecht Kossel propuso que el metabolismo “primario” se refiere a la química que es común a la mayoría de las especies y es responsable

de sintetizar los componentes básicos de la vida; mientras que el metabolismo “secundario” se refiere a la química que es única a una especie en particular o de ocurrencia general limitada (Firn y Jones, 2009). Así, los metabolitos primarios están directamente involucrados en el crecimiento, desarrollo y reproducción de un organismo y se producen utilizando los mismos compuestos químicos (o muy parecidos) en todas estas especies (por ejemplo: aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, nucleótidos y sus precursores). Por su parte, los metabolitos secundarios son moléculas producidas por bacterias, hongos y plantas para obtener una ventaja sobre sus competidores en condiciones extremas (por ejemplo, defensa contra depredadores). El metabolismo primario influye significativamente en el metabolismo secundario proporcionando los precursores y equivalentes de reducción (Hwang et al., 2014).

Uno de los conflictos con esta definición es que muchas moléculas en la naturaleza, entran en ambas definiciones, por ejemplo lípidos, carotenoides, entre otros. Esta discusión llevó a la definición del metabolismo especializado, como un caso de metabolismo secundario con productos validados experimentalmente con roles específicos adaptados al nicho donde viven (Davies, 2013). En condiciones de laboratorio, se considera que los metabolitos secundarios se producen durante las últimas fases de crecimiento exponencial y fase estacionaria, y fueron descritos como metabolitos secundarios para distinguirlos del metabolismo primario relacionado con el crecimiento. Pero estas identificaciones se llevaron a cabo en condiciones de laboratorio, las cuales están muy lejos de representar lo que ocurre en la naturaleza. Los microorganismos en ambientes naturales tienen tasas de crecimiento lentas y existen principalmente en fase estacionaria, y además no crecen de forma aislada. Estudios metagenómicos de suelos y sedimentos han demostrado que consisten en comunidades complejas y mixtas (microbiomas) que incluyen cientos de géneros creciendo en estrecho contacto (Davies, 2013). Por todo esto, se considera apropiado referirse a estas moléculas como metabolitos especializados para enfatizar su importancia en la ecología microbiana (Tobias y Bode, 2019). Las funciones específicas de

la mayoría de estos metabolitos en su ambiente natural no se conocen, pero son un tema en el que se está profundizando en los últimos años (Pishchany y Kolter, 2020).

1.5 El particular genoma de los actinomicetos

Las especies del género *Streptomyces* contienen un cromosoma lineal de gran tamaño, entre 6,7 y 11,9 Mb, y con un contenido medio de GC que oscila entre el 67 y el 78% del genoma (Law et al., 2018). El cromosoma se encuentra organizado genéticamente, con una región central de aproximadamente 6 Mb y dos brazos terminales de 2-3 Mb, aproximadamente (Figura 1.4). En el núcleo central se localizan mayoritariamente genes esenciales conservados, involucrados en la biosíntesis de macromoléculas, el metabolismo primario y la división celular, mientras que en los brazos se concentran genes característicos de cada especie, y que están relacionados con el metabolismo especializado y la síntesis de enzimas hidrolíticas (Bentley et al., 2002; Ikeda et al., 2003; Ohnishi et al., 2008). El cromosoma tiene un origen de replicación central (*OriC*), y al final de los extremos contiene secuencias terminales repetidas e invertidas denominadas TIR (*Terminal Inverted Repeat*). Estas secuencias poseen largos variables, desde 24 a 550Kb, y se presume están involucradas en la finalización de la replicación de los telómeros (Huang et al., 1998). Respecto al inicio de la traducción en *Streptomyces*, el codón utilizado mayoritariamente es AUG (metionina), aunque no es raro encontrar GUG (valina) y CUG (leucina) (Wright y Bibb, 1992).

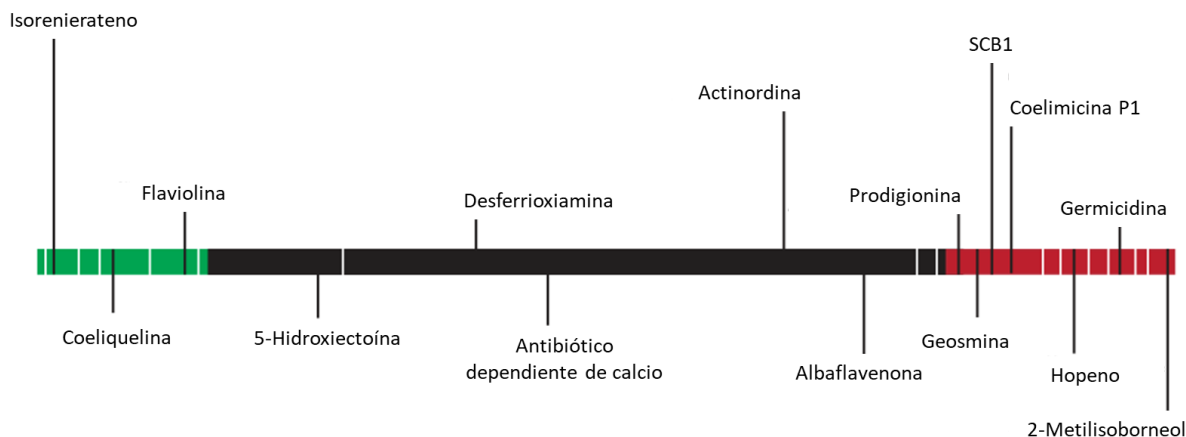


Figura 1.4. Distribución de los BGCs en *Streptomyces coelicolor*. Los metabolitos secundarios se representan en relación con su ubicación cromosómica, enfatizando el hecho que la mayoría de los genes biosintéticos se encuentran fuera de la región central altamente conservada. El brazo izquierdo resaltado en verde, corresponde a las primeras 1,3Mb del cromosoma y el brazo derecho resaltado en rojo, a las últimas 2,3 Mb del cromosoma. La región central del cromosoma (4,9Mb) está en negro. Los BGCs sin estructuras químicas identificadas (desconocidas) se muestran en blanco, mientras que los que tienen estructuras identificadas se muestran en negro. Adaptado de Craney et al. (2013).

La característica más distintiva de los genomas de *Streptomyces* es el alto grado de inestabilidad cromosómica, ya que sufren con frecuencia inserciones o deleciones espontáneas en los extremos, pudiendo originar estas últimas la circularización del cromosoma. Tanto las deleciones como las inserciones son debidas a procesos de recombinación en las regiones terminales poco conservadas (Hopwood, 2006, 2019). Esta plasticidad cromosómica resulta en un alto grado de variación en los BGCs, que podrían haberse adquirido a través de duplicaciones de genes prevalentes y transferencia horizontal de genes (*HGT*, *horizontal gene transfer*) con otras especies de *Streptomyces* u otras bacterias (Lee et al., 2020). La HGT es un importante impulsor evolutivo de la complejidad química de los productos naturales de *Streptomyces*. Los genes específicos de cepa y BGCs que se incorporan a través de HGT, tienden a localizarse en las regiones finales subtelerómicas “inestables” del cromosoma. La presión selectiva podría inducir la migración

de tales BGCs hacia la región central (*core*) del cromosoma donde es probable que se mantengan de manera más estable a través de la herencia vertical y por lo tanto mostrar niveles mucho más altos de conservación entre especies de actinobacterias (van Bergeijk et al., 2020).

Streptomyces también contiene plásmidos, que pueden ser circulares o lineales, de alto o bajo número de copias y que incluso pueden integrarse en el cromosoma. Su tamaño varía entre 10 kb y 1,8 Mb y presentan un contenido en GC similar al del cromosoma (Medema et al., 2010). También se encuentran ampliamente difundidos elementos genéticos con características intermedias entre los bacteriófagos y los plásmidos: los denominados AICEs (*Actinomycete integrative and conjugative elements*), elementos integrativos específicos de sitio y que suelen persistir a lo largo de las generaciones en el cromosoma hasta que se transfieren mediante conjugación a otro hospedador diferente, pudiéndose comportar en él como plásmidos replicativos (Hopwood et al., 1984; Hopwood, 2019). Estos actúan como moduladores de la diversidad del genoma hospedador y están implicados en la adquisición de agrupaciones de metabolitos secundarios por HGT (Medema et al., 2010). Se han descubierto además numerosos transposones en *Streptomyces*, existiendo ejemplos tanto de elementos integrativos específicos de sitio, como de elementos capaces de integrarse al azar en el genoma. También existe un gran número de fagos capaces de infectar a estas bacterias, llamados actinofagos. Todos estos elementos extracromosómicos se han convertido en herramientas para la manipulación genética de los *Streptomyces*, y a partir de ellos se han creado, por ejemplo, plásmidos integrativos con sistemas de recombinación fágicos como ϕ C31 y ϕ BT1 (Kormanec et al., 2019).

1.6 Estrategias para el descubrimiento de nuevos metabolitos especializados de *Streptomyces*

Para evitar el redescubrimiento de moléculas ya conocidas, se necesitan nuevos enfoques multidisciplinares de *screening* de metabolitos especializados en *Streptomyces*. Tradicionalmente, las principales estrategias de descubrimiento se han centrado en el uso

del fraccionamiento bioguiado de extractos metabólicos. Sin embargo, los datos ómicos se utilizan cada vez más para complementar o sustituir esto, ya que tienen el potencial de reducir el redescubrimiento de metabolitos, guiar el trabajo experimental hacia los metabolitos más prometedores, e identificar las vías enzimáticas que permiten su producción biosintética. En los últimos años, los análisis genómicos y metabolómicos de metabolitos especializados se han ampliado para estudiar miles de muestras simultáneamente (Hooft et al., 2020). Estas técnicas multidisciplinarias que integran metodologías son fundamentales para desbloquear vías biosintéticas ocultas y descubrir nuevas moléculas bioactivas. A continuación, se explican brevemente los enfoques utilizados en esta tesis, y se resumen en el esquema de la Figura 1.5.

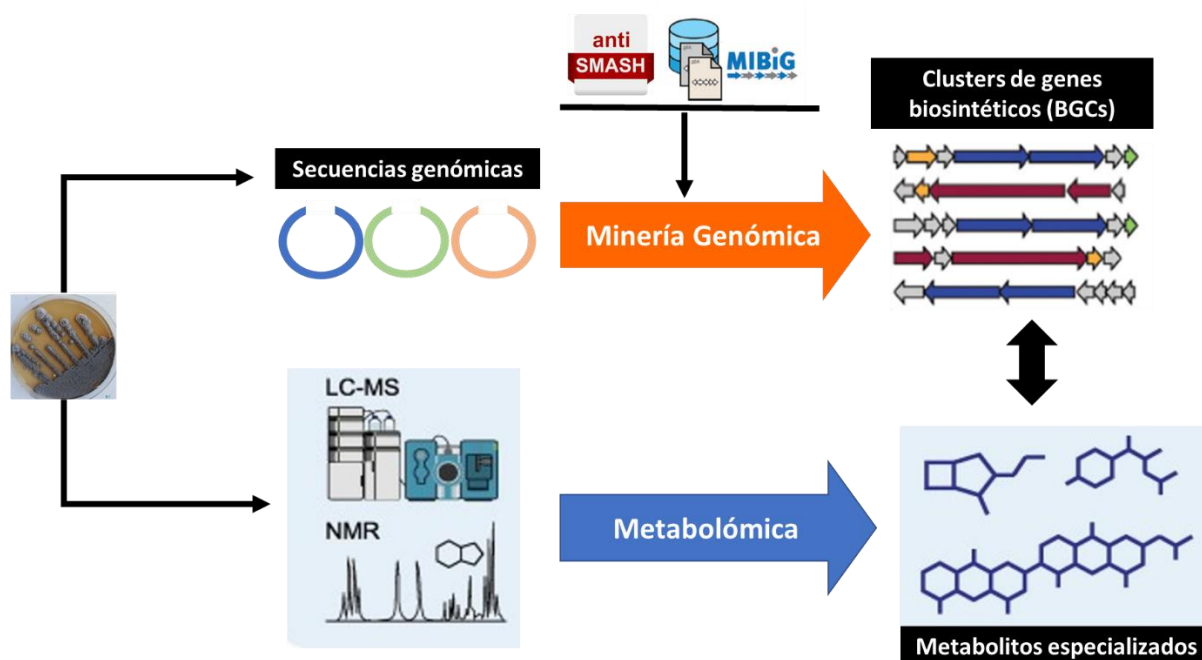


Figura 1.5. Visión general de los enfoques de minería genómica y metabolómica para identificar BGCs y metabolitos especializados en *Streptomyces*. La Información Mínima sobre un cluster de Genes Biosintéticos (MIBiG) es un repositorio para clusters de genes biosintéticos de metabolitos secundarios.

1.6.1 Minería genómica

Todos los productos naturales tienen una base genética, y la capacidad de obtener e interpretar la información genómica para la elucidación de la estructura está cada vez más disponible. La producción de metabolitos especializados está codificada por grupos de genes biosintéticos (BGCs): grupos de genes co-localizados y co-regulados que conjuntamente codifican una vía biosintética. La minería de genomas microbianos y vegetales implica la búsqueda de nuevos metabolitos especializados mediante la detección de BGCs y la predicción de sus funciones y productos codificados. De manera similar a cómo se define el flujo de información en las células mediante la relación entre el ADN, el ARNm y las proteínas, podemos definir un "dogma central" del metabolismo especializado: la secuencia nucleotídica de un BGC codifica un conjunto de enzimas, que juntas ensamblan un compuesto (o una mezcla de análogos estructurales), que a su vez tiene una función especializada (Terlow, 2022). El comprender cómo se traduce la información de la secuencia a la estructura y a la función, es clave para el descubrimiento de productos naturales.

Los grandes avances en secuenciación genómica han potenciado el desarrollo de trabajos de minería de genomas a gran escala. Hasta la fecha, existen 2971 genomas de *Streptomyces* depositados en la base de datos de NCBI, de los cuales 428 corresponden a genomas completos, mientras que los restantes se encuentran a nivel cromosómico, *scaffold* o *contigs* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/?term=streptomyces>). El creciente volumen de datos de secuencia disponible, junto con el desarrollo de herramientas bioinformáticas y bases de datos, contribuyeron a revelar el potencial de producción de varios productos naturales microbianos y la dilucidación de sus rutas biosintéticas (Doroghazi et al., 2014; Medema et al., 2015).

Desde que estos genomas fueron "minados" en busca de metabolitos especializados, se ha hecho evidente que los genomas de actinobacterias filamentosas representan un vasto repositorio de productos naturales novedosos. Por ejemplo, un estudio de 830 genomas de actinobacterias identificó 11.000 BGCs que representan 4.000 familias químicas (Doroghazi

et al., 2014), lo que nos indica que existe un amplio espacio químico en la naturaleza. La priorización de los BGC a estudiar sigue siendo un reto en este campo, pero la riqueza de datos disponibles indica que hay muchos compuestos nuevos por descubrir (Chevrette et al., 2019; Hoskisson y Seipke, 2020). Se estima que solo se han descubierto entre el 1% y el 3% de los antibióticos de los estreptomicetos, y el porcentaje es aún menor para otros actinomicetos menos estudiados. Por lo tanto, estos organismos aún tienen un gran potencial como fuente de nuevos productos naturales (Traxler y Kolter, 2015).

Mediante enfoques de minería del genoma *in silico* se reveló que los genomas de *Streptomyces* tienen entre 25 y 70 BGCs, pero solo una pequeña fracción de estos compuestos bioactivos se sintetiza en condiciones de laboratorio (Belknap et al., 2020). Este hecho se puso en evidencia en el año 2002 con la secuenciación del primer genoma de *Streptomyces*, *S. coelicolor* (Bentley et al., 2002). El análisis de la secuencia de este genoma identificó un mayor número de BGCs de los que se sabía que producía el organismo. Se identificaron otros 18 BGCs, pero en aquel momento sólo se había observado la producción de cuatro compuestos en el laboratorio. Esta revelación dio lugar a la idea que, en general, el metabolismo especializado en *S. coelicolor* es relativamente inactivo en cultivos de laboratorio, ya que la mayoría de las moléculas detectadas en estas condiciones han sido previamente identificadas y vinculadas a BGCs. Cuando se secuenciaron y analizaron los genomas de *S. avermitilis*, *S. griseus* y *S. scabies*, se estableció que se trataba de un fenómeno generalizado y no de una peculiaridad de *S. coelicolor* (Ikeda et al., 2003; Ohnishi et al., 2008; Bignell et al., 2010).

La minería genómica también permite encontrar vías biosintéticas de *Streptomyces* no cultivados presentes en una variedad de hábitats poco explorados, así como vías biosintéticas no caracterizadas en los genomas de *Streptomyces* cultivados. Con el desarrollo de nuevas estrategias de biología sintética (por ejemplo, TAR cloning, *Transformation-associated recombination*), es posible clonar directamente los BGCs completos y expresarlos en huéspedes heterólogos para producir compuestos que son silenciosos en la cepa nativa (Kouprina y Larionov, 2008, 2016). Algunos *Streptomyces*

actúan como buenos candidatos como hospedantes en esta estrategia, como *S. albus* y *S. coelicolor*.

La minería metagenómica es otro método para encontrar rutas de biosíntesis de productos naturales. Con este abordaje, se pueden analizar genomas de microorganismos no cultivables a partir de muestras ambientales, creando una biblioteca de genomas y luego realizar un cribado basado en secuencias en la biblioteca metagenómica (Andreu et al., 2021; Kenshole et al., 2021). Recientemente, se ha desarrollado una herramienta bioinformática (BiG-MAP), que permite evaluar la abundancia de grupos de genes y expresión en muestras de microbioma utilizando datos metagenómicos y metatranscriptómicos (Pascal Andreu et al., 2021).

1.6.2 Metabolómica

La metabolómica es un campo emergente de la investigación “ómica” especializado en el análisis global de los productos de todas las reacciones metabólicas celulares provenientes de organismos vivos. Los metabolitos son los sustratos y productos de los mecanismos moleculares vinculados a los flujos de información en las células, es decir modulan todos los pasos desde la secuencia nucleotídica hasta el fenotipo (Costa dos Santos et al., 2021). Determinar la diversidad de metabolitos especializados producidos por un microorganismo es un importante primer paso hacia una plena explotación de los productos bioactivos (Wu et al., 2016). La complejidad química y la diversidad de los extractos de productos naturales dificultan la asignación de información estructural correspondiente a metabolitos (anotación) y la elucidación de su estructura (identificación), volviéndolos procesos muy desafiantes.

La espectrometría de masas (EM) y la resonancia magnética nuclear (RMN) son las plataformas analíticas de preferencia para la caracterización y el análisis del metaboloma. Ambas técnicas son complementarias por sus diferencias en sensibilidad, límites de detección y ámbitos dinámicos lineales, y porque difieren en la información obtenida para

la identificación de los metabolitos de interés. A continuación, se explican muy brevemente los principios básicos de ambas tecnologías y sus principales ventajas y desventajas.

Para obtener un espectro de RMN, la muestra se somete a un campo magnético que se mantiene constante mientras un breve pulso de radiación (radiofrecuencia) excita a todos los núcleos simultáneamente. Como el corto pulso de radiofrecuencia cubre un amplio rango de frecuencias, los protones individualmente absorben la radiación de frecuencia necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín). A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín. La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial y una computadora registra la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT-RMN) (Gunther H., 2013).

En la EM, a partir de las moléculas orgánicas presentes en una muestra, se generan iones en fase gaseosa (a partir de una fuente de ionización) que posteriormente se analizan según su relación masa/carga (m/z). Existen muchos tipos de analizadores de masas (por ejemplo, los cuadrupolos simples) así como distintas fuentes de ionización como el electrospray (ESI, *electrospray ionization*). La EM en tándem (también llamada MS/MS o MS²) es una variante en la que se acoplan dos o más analizadores de masa mediante un paso adicional para aumentar su capacidad de analizar muestras químicas. Las moléculas de una muestra determinada se ionizan y el primer espectrómetro (MS1) separa estos iones por su relación masa-carga. Los iones de una relación m/z particular provenientes de MS1 se seleccionan y luego se dividen en fragmentos más pequeños. Estos fragmentos luego se introducen en el segundo espectrómetro de masas (MS2), que a su vez separa los fragmentos por su relación m/z y los detecta (de Hoffmann y Stroobant, 2007).

Las tecnologías basadas en RMN tienen una sensibilidad muy inferior en comparación con las metodologías de EM, pero los análisis computacionales y software quimiométricos asociados a la RMN están más desarrollados. A pesar de las limitaciones en sensibilidad y

en la cobertura metabólica, el uso de la RMN es ventajoso para determinadas cuestiones biológicas. Por ejemplo, debido a su naturaleza no destructiva, se utiliza más comúnmente en sistemas de mamíferos que las tecnologías de EM (Ferne 2004). Otra de las ventajas de la metabolómica basada en RMN es su alta reproducibilidad (gran robustez de la señal). Aunque la espectroscopia de RMN es indudablemente potente en la elucidación de estructuras químicas, funciona mejor en compuestos orgánicos puros, ya que en mezclas complejas hay problemas de solapamiento de señales (Wu, 2016). Por su parte, la EM posee alta sensibilidad y selectividad y puede combinarse fácilmente con diversos métodos de separación como cromatografía gaseosa (GC) o cromatografía líquida (LC), y la mayoría de los estudios metabólicos se realizan en estos instrumentos híbridos (Tyc et al., 2017). Los avances en el desarrollo de métodos e instrumentos analíticos de alta sensibilidad en EM han permitido investigar extractos metabólicos de alta complejidad. Como resultado, las tecnologías metabolómicas basadas en EM han sido ampliamente aplicadas en el campo de los productos naturales. Los perfiles metabólicos basados en EM generan intrínsecamente conjuntos de datos muy grandes y complejos, dificultando el análisis posterior. Sin embargo, en los últimos años se han generado herramientas para el análisis de estos datos lo cual será abordado en el Capítulo 4.

La metabolómica puede llevarse a cabo mediante enfoques dirigidos (*targeted*) y no dirigidos (*untargeted*). Mientras que el primero intenta responder si determinados compuestos *x*, *y* y/o *z* están presentes en una muestra, el segundo abordaje es más desafiante ya que implica la búsqueda de metabolitos desconocidos. También existe un tercer abordaje conocido como análisis de sospechosos (*suspected*), que intenta responder qué compuestos de una lista de posibles están presentes en la muestra.

La metabolómica es una herramienta eficaz para facilitar el descubrimiento de nuevos fármacos, ya que permite la comparación de muestras activas e inactivas frente a determinado fenotipo. Así, los compuestos que se producen diferencialmente en cada situación sirven como biomarcadores y evita la redundancia química en una etapa inicial (Wu, 2016). Por otra parte, los abordajes metabolómicos cada vez son más utilizados para

la minería de metabolitos dirigida a la identificación de productos naturales en muestras complejas. En esta Tesis se utilizaron ambas aproximaciones (comparación de perfiles metabólicos y minería metabolómica) para abordar diferentes objetivos utilizando los dos métodos principales RMN (Capítulo 2) y EM (Capítulo 4).

1.6.3 Integración metabologenómica

La vinculación de información entre conjuntos de datos genómicos y metabolómicos es útil ya que permite la anotación estructural y funcional. El término “metabolo-genómica” fue introducido oficialmente en 2016 para describir las correlaciones entre los BGCs y sus metabolitos (Goering et al., 2016). Sin embargo, antes de oficializar este término ya existían algunas aproximaciones. Un estudio con actinomicetos en donde datos genómicos fueron conectados con perfiles de espectros de masas, llevaron a la identificación de las GCFs (familias de BGCs) de las desertomicinas y oasamicinas, productos naturales previamente reportados y cuyos BGCs eran desconocidos (Doroghazi et al., 2014). Otro ejemplo, es el de la arenicolide A, que fue correlacionado con un BGC desconocido (Duncan et al., 2015). En ese trabajo también se identificó un nuevo metabolito, la retimicina A, que fue caracterizado y relacionado con una vía NRPS conocida.

Conocer la correlación entre los compuestos bioactivos y su BGC, es un paso determinante en la elucidación de su ruta biosintética, y permite la optimización del proceso de producción y escalado (Wu et al., 2016). Mientras que las anotaciones funcionales en genómica y metabolómica están cada vez más presentes en las bases de datos en las que se pueden comparar nuevos datos experimentales, se estima que solo del 2 al 5% de las moléculas observadas pueden emparejarse de forma fiable con moléculas conocidas (van der Hooft et al., 2020). En los últimos años, se han desarrollado nuevas herramientas para encontrar estos pares producto-productor, especialmente en el vínculo metagenoma/metaboloma (Duncan et al., 2015; Soldatou et al., 2021; Leão et al., 2022).

1.7 Antecedentes de trabajo y justificación

En el año 2010, nuestro país sufrió pérdidas económicas significativas en el cultivo de papa, ocasionadas por la enfermedad conocida como sarna común (SC) de la papa cuyo agente causal son cepas de *Streptomyces* patógenas. En este contexto, la Dra. María Inés Lapaz realizó sus tesis de Maestría y Doctorado, ambas enfocadas en el aislamiento e identificación de las especies patógenas y en la determinación de los factores de patogenicidad de las mismas. En este marco, se generó una colección local de 235 cepas aisladas en Uruguay a partir de suelo y tubérculos de papa, de las cuales se identificaron 70 cepas patógenas responsables de la enfermedad (Lapaz, 2014; Lapaz et al., 2017). En estos trabajos se encontró gran diversidad en cuanto a la patogenicidad e incluso algunas de las cepas patógenas no presentaron ninguno de los marcadores de patogenicidad reportados hasta esa fecha. Además, en la búsqueda de nuevos factores de virulencia asociados a la sarna común, se aisló y purificó un metabolito identificado como desmetilmensacarcina, que fue el primer reporte de este compuesto como fitotoxina (Lapaz et al., 2018).

En el período 2017-2019 nuestro grupo tuvo en marcha el Proyecto CSIC I+D “Integración de la minería genómica y la metabolómica para descifrar el potencial de metabolitos bioactivos en cepas de *Streptomyces* de Uruguay” (responsable Dra. María Julia Pianzzola). Este proyecto permitió dar el paso inicial en el estudio de esta temática abarcando dos enfoques actuales y complementarios para investigar el potencial de producción de compuestos bioactivos en la colección de cepas de *Streptomyces* disponible, y fue impulsor del desarrollo de la presente tesis.

Por otro lado, y en el marco de las Tesis de Maestría en Química del Q.F. Martín Pérez, todas las cepas de esta colección fueron cribadas en base a su actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos patógenos de humanos y plantas. Se utilizaron como bacterias indicadoras de patogenicidad en humanos cepas de referencia de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus*; y de patogenicidad en plantas *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*, y *Ralstonia solanacearum*. Para los

hongos, se utilizó la levadura *Candida albicans*, y los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Aspergillus carbonarius* y *Fusarium graminearum*. Como resultados de este *screening*, sobre el total de la colección se encontraron 172 cepas con actividad antagonista frente al menos una de las bacterias indicadoras, lo que representa el 73% de la colección. Los datos de actividad antifúngica obtenidos en este *screening* mostraron que 86 cepas de *Streptomyces* tienen actividad frente al menos uno de los hongos evaluados, lo que corresponde a un 36% del total de cepas de la colección (Tesis Martín Pérez, en preparación).

A pesar de que el género *Streptomyces* viene siendo estudiado desde hace ya varias décadas, sigue teniendo potencial para el descubrimiento de nuevos compuestos con potencial aplicación. Los resultados obtenidos como consecuencia del *screening* de actividad antimicrobiana junto con el reconocido potencial de producción de compuestos bioactivos, implicaron una gran motivación para el desarrollo de la presente tesis. En esta propuesta, se planteó ampliar las actividades a evaluar, incluyendo la actividad nematocida y de promoción de crecimiento vegetal para la caracterización de las cepas de *Streptomyces* de nuestra colección. Además, se emplearon nuevas estrategias y herramientas de análisis y búsqueda de los compuestos responsables de las actividades encontradas desde una perspectiva genómica y metabolómica. Resulta importante establecer tanto los genes responsables de las vías de síntesis de estos metabolitos, así como efectivamente su expresión y por tanto producción de los metabolitos bioactivos responsables de las actividades mencionadas.

Durante el transcurso de esta Tesis, se contó con la financiación del proyecto FCE 148941 “Búsqueda de actividades de interés agrícola a partir de cepas de *Streptomyces* spp. aisladas en Uruguay” del Fondo Clemente Estable (ANII) desde marzo 2019 hasta agosto 2021 (prorrogado por pandemia).

1.8 Objetivos y descripción de la tesis

1.8.1 Objetivo general:

Dilucidar el potencial de producción de compuestos bioactivos en una colección de cepas de *Streptomyces* spp. aisladas en Uruguay a partir de suelo y tubérculos de papa, utilizando dos enfoques complementarios: la minería genómica y la metabolómica.

1.8.2 Objetivos específicos:

1. Validar un modelo metabolómico basado en análisis por ^1H RMN para la determinación del potencial patogénico de cepas de *Streptomyces*.
2. Determinar compuestos fitotóxicos asociados a la patogenicidad en papa de diferentes especies de *Streptomyces*.
3. Caracterizar las cepas de *Streptomyces* spp. en base a un *screening* de actividad nematocida frente a *C. elegans*.
4. Caracterizar las cepas de *Streptomyces* spp. en base a actividades vinculadas a la promoción del crecimiento vegetal.
5. Identificar mediante un abordaje genómico y metabolómico los metabolitos responsables de las actividades evaluadas en las cepas de *Streptomyces* seleccionadas.
6. Evaluar el rol de las antimicinas en cuanto a su actividad nematocida en la cepa de *Streptomyces* MAI 2237.

1.8.3 Descripción de la Tesis

El primer y segundo objetivo específico se desarrollan en el **Capítulo 2**, donde se presentan los resultados de la comparación de los perfiles metabolómicos obtenidos por ^1H -RMN entre las cepas de *Streptomyces* productoras de compuestos fitotóxicos y las que no. Los resultados de este capítulo se encuentran publicados en el artículo “*An Integrative*

Approach for the Characterization of Plant-Pathogenic Streptomyces spp. Strains Based on Metabolomic, Bioactivity, and Phylogenetic Analysis”, en la revista *Frontiers in Microbiology* (2021). En el **Capítulo 3**, se desarrollan los objetivos específicos 3 y 4, donde se presentan los resultados obtenidos del *screening* de actividad nematocida y de promoción de crecimiento vegetal (PCV) realizada sobre cepas de la colección. Asimismo, se describen también los resultados de la optimización de las metodologías utilizadas. Por otro lado, en el **Capítulo 4**, se presentan los resultados del objetivo específico 5, enfocado a la búsqueda de los metabolitos responsables de la actividad nematocida, así como los responsables de la actividad PCV sobre una selección de 5 cepas. Esta búsqueda se llevó a cabo mediante un abordaje genómico, implicando la secuenciación del genoma completo de las cepas, así como mediante un abordaje metabolómico que implicó análisis de los espectros de masas de los extractos obtenidos a partir de cultivos de estas cepas. Finalmente, en el **Capítulo 5** se realiza la descripción del objetivo específico 6, donde se describe un *cluster* biosintético responsable de la síntesis de antimicina, candidato de actividad nematocida, así como la construcción de un mutante *knock out* de dicho cluster y la posterior evaluación de su actividad. Por último, se describen las consideraciones generales obtenidas de esta tesis y las perspectivas principales derivadas de ésta.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS

FITOTÓXICOS PRODUCIDOS POR CEPAS DE

***STREPTOMYCES* PATÓGENAS MEDIANTE UN**

ABORDAJE METABOLÓMICO Y FILOGENÉTICO

Los contenidos de este capítulo fueron publicados en Croce V., López-Radcenco A., Lapaz M.I., Pianzola M.J., Moyna G. and Siri M.I. 2021. An Integrative Approach for the Characterization of Plant-Pathogenic *Streptomyces* spp. Strains Based on Metabolomic, Bioactivity, and Phylogenetic Analysis. Front. Microbiol. 12: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.643792/full>.

2.1 Introducción

La habilidad de infectar tejidos vegetales vivos y causar enfermedades como la sarna común de la papa (SC) es un atributo raro entre los miembros del género *Streptomyces* (Li et al., 2019). Hasta la fecha se ha demostrado que solamente una docena de las cientos de especies descritas son patógenas de plantas (Loria et al., 2006). La primera especie patógena descrita y mejor caracterizada es *S. scabies*, mientras que otras especies patógenas descritas posteriormente incluyen *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei*, *S. niveiscabiei*, *S. reticuliscabiei*, y *S. bottropensis* (Lambert y Loria, 1989a, b; Miyajima et al., 1998; Bouček-Mechiche et al., 2000; Park et al., 2003a; Madhaiyan et al., 2020).

Los trabajos realizados en los últimos 10 años sobre especies de *Streptomyces* patógenas de plantas han proporcionado importantes pistas para entender cómo estos organismos son capaces de colonizar e infectar una planta huésped y causar enfermedades. En una revisión reciente, los factores de virulencia conocidos se han clasificado en tres categorías, incluyendo fitotoxinas, fitohormonas y proteínas secretadas (Li et al., 2019). Entre ellos, las fitotoxinas son reconocidas como claves determinantes de patogenicidad en *Streptomyces*, siendo las taxtominas las primeras reportadas y más ampliamente distribuidas (King et al., 1989; Lawrence et al., 1990; Bignell et al., 2014). Más recientemente, se reportaron otros compuestos fitotóxicos, incluyendo las fitotoxinas coronafacoilo y las concanamicinas (Natsume et al., 1998, 2018; Bignell et al., 2018). Además de las fitotoxinas, muchos patógenos vegetales producen fitohormonas, tales como citoquininas, auxinas y etileno, como una forma de alterar la señalización hormonal en el huésped, inducir la secreción de proteínas en la planta para promover la patogénesis, o producir enzimas extracelulares que degradan los polímeros de la pared celular vegetal para adquirir nutrientes, penetrar y propagarse a través de los tejidos (Li et al., 2019).

En el marco de la tesis de Doctorado de María Inés Lapaz se llevó a cabo una exhaustiva identificación y caracterización genética de cepas de *Streptomyces* spp. responsables de SC en cultivos de papa de Uruguay (Lapaz, 2019), en respuesta a un brote severo que causó pérdidas de alrededor de 6 millones de dólares, que correspondieron a casi un tercio de la producción total de papa en 2010. En este estudio se generó una colección local de 235 actinomicetos aislados de suelo y tubérculos de papa, incluyendo 70 cepas de *Streptomyces* patógenas pertenecientes a diferentes especies: *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. europaeiscabiei* y *S. niveiscabiei*. Mediante métodos químicos tradicionales, nuestro grupo identificó y caracterizó una nueva fitotoxina, el poliquétido desmetilmensacarcina (DMSN), producida por una cepa de *S. niveiscabiei* (St1015). El compuesto purificado induce lesiones necróticas profundas en tejido del tubérculo de papa y causa un retraso en el crecimiento de las plántulas de rabanito (Lapaz et al., 2018). La producción de esta nueva fitotoxina fue estudiada en una única cepa y se desconoce si es producido por otras cepas de *S. niveiscabiei* y por otras especies de *Streptomyces*.

Este interesante hallazgo también marcó la importancia de continuar profundizando en la producción de compuestos bioactivos novedosos en las otras cepas de *Streptomyces* patógenas en nuestra colección. Los enfoques clásicos basados únicamente en criterios taxonómicos o ensayos de actividad a menudo conducen al aislamiento de compuestos ya conocidos. De hecho, la bioprospección de cepas microbianas para el aislamiento de compuestos activos ha comenzado a incorporar estrategias integradas, que pueden diferenciar rápidamente lo nuevo de lo ya conocido (Betancur et al., 2017). Este abordaje facilita la identificación de patrones o marcadores de metabolitos que son característicos de una cierta condición. También permite la comparación de metabolitos secundarios entre especies. El análisis metabolómico se ha convertido en una herramienta importante para este tipo de estudios (Nguyen et al., 2016; Betancur et al., 2017). Esta metodología, que se ha aplicado con éxito a una amplia gama de sistemas biológicos (Kim et al., 2011), es

particularmente útil para obtener información sobre la composición química de extractos con alguna bioactividad antes del aislamiento de los compuestos (Betancur et al., 2017).

En base a estas premisas, en este trabajo se aplicó un enfoque integrador para investigar el potencial patógeno de las cepas de nuestra colección. Inicialmente se verificó que la patogenicidad en la mayoría de estas cepas se debe a la secreción de compuestos fitotóxicos. Además, la producción de las fitotoxinas conocidas taxtomina A (TXT) y desmetilmensacarcina (DMSN) fue exhaustivamente estudiada en todas las cepas de *Streptomyces* patógenas de la colección. Finalmente, se llevaron a cabo análisis metabolómicos basados en RMN que fueron capaces de distinguir y clasificar las cepas según su patogenicidad y en acuerdo con su filogenia. Como se detalla en las siguientes secciones, el enfoque permitió la identificación de dos cepas patógenas de *S. niveiscabiei* y dos de *S. puniscabiei* que no producen TXT ni DMSN, lo que sugiere la secreción de nuevos productos naturales fitotóxicos aún no identificados.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Un total de 58 cepas de actinomicetos de nuestra colección local fueron seleccionadas para evaluar la secreción de compuestos fitotóxicos en el sobrenadante de cultivo y realizar análisis metabolómicos. Se incluyeron 29 cepas patógenas y 29 no patógenas. La patogenicidad fue evaluada en un estudio previo, basado en la capacidad de las cepas para inducir necrosis en discos de papa e inhibir la germinación en semillas de rabanito (Lapaz et al., 2017). Las 29 cepas patógenas incluyeron aislamientos representativos de especies de *Streptomyces* causantes de sarna común en Uruguay (6 *S. scabies*, 6 *S. acidiscabies*, 2 *S. europaeiscabiei*, 9 *S. niveiscabiei*, y 2 *S. puniscabiei*), y cepas de referencia para estas especies (DSM41658, DSM41668, DSM41802 y St1015) (Tabla 2.1). Además, se seleccionaron 29 cepas no patógenas de nuestra colección, que en este trabajo se identificaron a nivel de género/especie (Tabla S1, Anexo II). Todas las cepas se cultivaron de forma rutinaria en medio ISP4 a 28 °C (Shirling y Gottlieb, 1966), y fueron conservadas como suspensiones de esporas en glicerol al 20% a -70 °C. Para los ensayos de fitotoxicidad, análisis metabolómico por RMN y HPLC-UV, las cepas se cultivaron en medio OBB (*oat bran broth*) (Shirling y Gottlieb, 1966). Las composiciones de todos los medios utilizados se detallan en el Anexo I. Brevemente, se preparó un pre-inóculo de esporas en Tween 0,0001% y se ajustó para obtener una $DO_{600nm} = 0,15$. Se utilizó una alícuota de 50 μ L de esta suspensión de esporas para inocular 50 mL de medio OBB en matraces de 250 mL, y se incubaron durante 7 días en un agitador orbital a 150 rpm a 28 °C. A continuación, las células se separaron por centrifugación a 11.000 g durante 10 min seguido de filtración (0,45 mm), y el sobrenadante obtenido fue utilizado para los análisis.

Tabla 2.1. Lista de 29 cepas patógenas de *Streptomyces* utilizadas en este estudio, su fitotoxicidad, identificación taxonómica y detección de compuestos fitotóxicos conocidos mediante HPLC-UV y de los genes involucrados mediante PCR.

Cepa	Patogenicidad ^a / Fitotoxicidad	Identificación	Detección química (HPLC)		Detección genética (PCR)	
			TXT	DMSN	<i>txtA</i>	<i>dmsnK1</i>
DSM 41658 ^T	+/+	<i>S. scabies</i>	+	-	+	-
MAI 2294 ^b	+/+	<i>S. scabies</i>	+	-	+	-
St124	+/+	<i>S. scabies</i>	+	-	+	-
St127	+/+	<i>S. scabies</i>	+	-	+	-
St129	+/+	<i>S. scabies</i>	+	-	+	-
St1232	+/+	<i>S. scabies</i>	+	-	+	-
St1113	+/+	<i>S. scabies</i>	+	-	+	-
DSM 41668 ^T	+/+	<i>S. acidiscabies</i>	+	-	+	+
St103	+/+	<i>S. acidiscabies</i>	+	-	+	+
St105	+/+	<i>S. acidiscabies</i>	+	-	+	+
St106	+/+	<i>S. acidiscabies</i>	+	-	+	+
St113	+/+	<i>S. acidiscabies</i>	+	-	+	+
St114	+/+	<i>S. acidiscabies</i>	+	-	+	+
St116	+/+	<i>S. acidiscabies</i>	+	-	+	+
DSM 41802 ^T	+/+	<i>S. europascabiei</i>	+	-	+	-
St1140	+/+	<i>S. europascabiei</i>	+	-	+	-
St1229	+/+	<i>S. europascabiei</i>	+	-	+	-
St1015	+/+	<i>S. niveiscabiei</i>	-	+	-	+

St107	+/+	<i>S. niveiscabiei</i>	-	+	-	+
St108	+/-	<i>S. niveiscabiei</i>	-	-	-	-
St109	+/+	<i>S. niveiscabiei</i>	-	+	-	+
St1011	+/+	<i>S. niveiscabiei</i>	-	-	-	+
St1013	+/+	<i>S. niveiscabiei</i>	-	+	-	+
St1016	+/+	<i>S. niveiscabiei</i>	-	+	-	+
St1017 ^b	+/+	<i>S. niveiscabiei</i>	-	+	-	+
St1018 ^b	+/+	<i>S. niveiscabiei</i>	-	-	-	+
St1020	+/-	<i>S. niveiscabiei</i>	-	-	-	+
St1135 ^b	+/+	<i>S. puniscabiei</i>	-	-	-	-
St1218	+/+	<i>S. puniscabiei</i>	-	-	-	-

^a La patogenicidad fue determinada en un estudio previo (Lapaz et al., 2017).

^b Cepas que fueron añadidas al esquema de MLSA anterior (Lapaz et al., 2017)

^T Cepa tipo

2.2.2 Bioensayo de fitotoxicidad en rabanito

El bioensayo de plántulas de rabanito se llevó a cabo según lo descrito en Fyans et al. (2016) con algunas modificaciones. Se colocaron semillas de rabanito germinadas en pocillos de 13 mm de diámetro de placas de Petri de agar-agua al 1,5 %, y luego se agregaron 200 µl del sobrenadante a cada pocillo. Se ensayaron un total de cinco semillas de rabanito con cada sobrenadante, y las 58 cepas de actinomicetos se evaluaron al menos dos veces en experimentos independientes. Las placas fueron envueltas con parafilm e incubadas a 24 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz por 6 días. Se utilizó medio OBB como control negativo. Se observó y registró la inhibición del crecimiento de la raíz.

2.2.3 Análisis por HPLC-UV

Los análisis de detección de TXT y DMSN en los sobrenadantes de las 29 cepas patógenas de *Streptomyces* se realizaron por HPLC-UV en un equipo Shimadzu Prominence LC-20AT

equipado con detector de arreglo de diodos SPD-M20A y una columna Supelco Discovery C-18 (4,6 x 150 mm, tamaño de partícula de 5 µm). Para la extracción de la TXT, se utilizaron cartuchos Discovery C18 SPS, acondicionados con 1 mL de metanol al 100% seguido de 1 mL de agua destilada y luego se aplicó 1 mL del sobrenadante. Se enjuagó la columna con 1 mL de agua destilada y 1 mL de metanol al 25%. Por último, se eluyó agregando 1 mL de metanol al 100% y los extractos obtenidos se cargaron en la columna de HPLC según lo descrito en Johnson et al. (2007). Para la detección de DMSN, 10 mL de los sobrenadantes de cultivo liofilizados se resuspendieron en 1 mL de metanol, que luego fueron filtrados e inyectados en el cromatógrafo. La inyección se realizó con un gradiente de acetonitrilo y agua según lo descrito por Yan et al. (2012). Los espectros se observaron a 380 nm y 254 nm para la detección de TXT y DMSN, respectivamente. Ambas fitotoxinas fueron identificadas por comparación de su tiempo de retención y espectros UV con los de los estándares correspondientes.

2.2.4 Análisis filogenético de las cepas

El ADN genómico se extrajo de acuerdo con Sambrook y Russell (2001). La secuencia parcial del gen de la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) se usó como marcador filogenético (Guo et al., 2008) para la caracterización taxonómica de las 29 cepas de actinomicetos no patógenas usando los *primers* y condiciones descritas en Lapaz et al. (2017). Brevemente, los productos de amplificación del gen *rpoB* se separaron en geles de agarosa al 1,5 % y se visualizaron con GoodView bajo luz ultravioleta. Los amplicones se purificaron y secuenciaron en ambas direcciones por Macrogen (Seoul, Corea). Las secuencias se ensamblaron, editaron y alinearon usando el programa Geneious 8.0 (Biomatters, Nueva Zelanda). Los árboles filogenéticos se infirieron por el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) utilizando secuencias parciales de 540 pb. Se adicionaron en el análisis otras secuencias obtenidas del sitio web *ARS Streptomycetaceae MLSA* para establecer las relaciones filogenéticas con otros actinomicetos. La topología y los árboles filogenéticos resultantes fueron evaluados utilizando un valor de *bootstrap* de

1000 (Hillis y Bull, 1993). El análisis filogenético de cepas patógenas de *Streptomyces* utilizadas en este estudio está reportado (Lapaz et al., 2017), y la asignación de especies correspondiente se muestra en la Tabla 2.1.

2.2.5 Detección molecular de genes específicos de DMSN y TXT

El ADN genómico de las cepas patógenas se utilizó para amplificación del gen *txtA*, que codifica para una sintetasa involucrada en la biosíntesis de taxtomina A, y del gen *dmsnK1*, que codifica para una poliquétido sintasa involucrada en la biosíntesis de desmetilmensacarina. Para la amplificación del gen *txtA*, los *primers* utilizados fueron *txtA_F* y *txtA_R* (Chapleau et al., 2016), y para la amplificación del gen *dmsnK1*, se utilizaron los *primers* especialmente diseñados *dmsnK1_F* (GTCCTTCTGGCAGCTCATCT) y *dmsnK1_R* (CGATCATCGACTTGATGGAG). La amplificación de ambos se realizó utilizando 25 µL de mezcla de reacción conteniendo: *Taq buffer* 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer*, 10 % v/v de DMSO, 1,0 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen) y 20 ng de de ADN. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Rotor Gene 6000, Applied Biosystems), y el programa incluyó una primera desnaturalización a 94 °C durante 3 min, y luego 30 ciclos de: desnaturalización (95 °C, 45 s), *annealing* (55 °C para *dmsnK1* y 65 °C para *txtA*, 60 s), y extensión (72 °C, 90 s), y finalmente una extensión a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se comprobaron por electroforesis en gel de agarosa 1,0% con 0,5 µg/mL de GoodView (SBS Genetech Co) en tris-borato-EDTA (TBE) 1X y visualizaron bajo luz ultravioleta. Los amplicones fueron secuenciados en ambas direcciones por MacroGen (Corea), y luego ensamblados y editados utilizando el software Geneious 8.0 (Biomatters, Nueva Zelanda), y finalmente comparados en GenBank por la herramienta Blastn.

2.2.6 Espectroscopía por RMN

Los sobrenadantes (10 mL) de las 58 cepas de actinomicetos fueron liofilizados y reconstituidos en 600 µL de agua deuterada conteniendo 0,05 mg/mL TSP (ácido trimetilsililpropanoico) como referencia interna. Después de la centrifugación (a 1500 g

durante 2 min) para eliminar las partículas insolubles, las soluciones fueron transferidas a tubos de RMN de 5 mm (NE-HL5-7, New Era Enterprises Inc., Estados Unidos). Los espectros de ^1H RMN se registraron a 25°C en un espectrómetro Bruker AVANCE III 500 operando a una frecuencia de protón de 500,13 MHz y equipado con una sonda TXI con gradiente-z. Para registrar cada espectro se empleó un ancho espectral de 10 KHz, un tamaño de datos de 32 K y un total de 64 escanes con un retraso de relajación de 5 s entre escaneos.

Todos los espectros de ^1H RMN fueron puestos en fase y se corrigió su línea de base utilizando el programa MestreNova (versión 11.0, MestreLab Research, S.L., España). A continuación, las regiones seleccionadas de los espectros se alinearon mediante el método de cambio de correlación de intervalo (Savorani et al., 2010). Los datos se normalizaron al área espectral total. La región entre 3,0 y 5,4 ppm, que incluye la resonancia de carbohidratos y agua residual, fue tratada como una región ciega y no fue considerada en los análisis. Finalmente, la matriz de datos resultante se exportó como archivo de texto para su uso en análisis multivariados.

2.2.7 Análisis estadístico multivariado

El análisis de componentes principales (PCA), el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA), y análisis jerárquico de conglomerados (HCA) se llevaron a cabo con el paquete PLS_ToolBox (versión 8.5, Eigenvector Research Inc., Manson, WA, Estados Unidos) implementado para MATLAB (revisión 2015a, The MathWorks Inc., Natick, MA, Estados Unidos). Para todos los modelos, los datos se centraron en la media y se escalaron usando un factor de Pareto (Van Den Berg et al., 2006). En primer lugar, se analizaron los datos realizando un PCA, que permite la identificación de valores atípicos (*outliers*), reduce la dimensionalidad y facilita la identificación de grupos de datos o tendencias (Wold et al., 1987; Trygg y Wold, 2002; Trygg et al., 2007). La validación cruzada de los modelos de OPLS-DA se logró utilizando el método de subconjuntos aleatorios (random subsets), realizando 20 iteraciones sobre datos divididos en 8 partes de

igual tamaño. Las curvas de ROC (*Receiver Operating Characteristic*) y las áreas bajo las curvas (AUCs) fueron calculadas para asegurar el buen ajuste de los modelos resultantes (Ekelund, 2012; Simundic, 2012). También se realizó la prueba de permutaciones con 200 iteraciones para determinar el grado de sobreajuste y validar los análisis discriminantes (Ni et al., 2008). El HCA se llevó a cabo utilizando el método de Ward (Ward, 1963).

2.3 Resultados

2.3.1 La mayoría de los sobrenadantes de las cepas de *Streptomyces* patógenas presentaron actividad fitotóxica

En primer lugar, se verificó si la patogenicidad de las cepas seleccionadas era debida a la secreción de compuestos fitotóxicos o a otros mecanismos. Los ensayos de fitotoxicidad fueron realizados en los sobrenadantes de las 58 cepas crecidas en medio OBB, y la fitotoxicidad fue confirmada por la inhibición del crecimiento de la raíz de rabanito después de 6 días de incubación (Figura 2.1, Tabla 2.1).

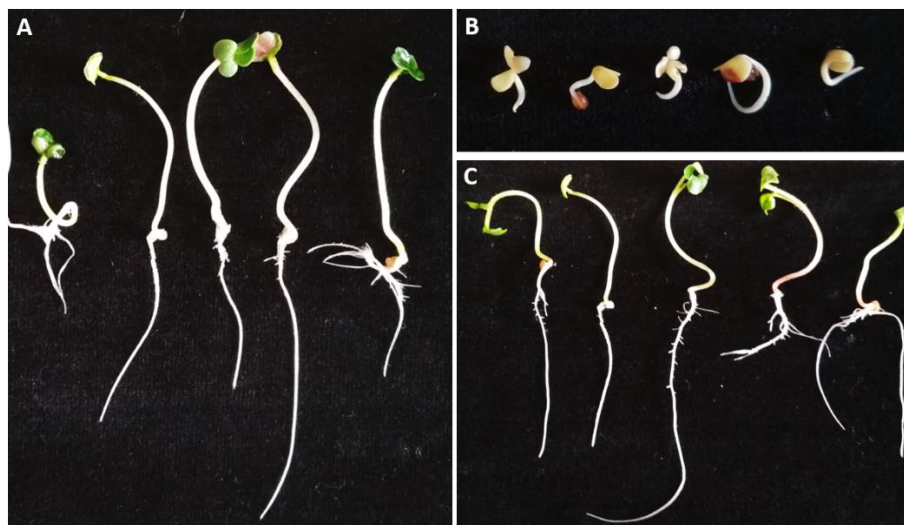


Figura 2.1. Resultados representativos del ensayo de fitotoxicidad en plántulas de rabanito 6 días después de la inoculación con los sobrenadantes de cepas de actinomicetos evaluadas en este trabajo. (A) Control inoculado con medio OBB. (B) Foto del resultado de la inoculación del sobrenadante de la cepa St107 como ejemplo de fitotóxico y (C) de la cepa MAI2306 como ejemplo de no fitotóxico. La inoculación con sobrenadantes fitotóxicos inhibe la elongación de las raíces y conduce al retraso en el crecimiento de los brotes, sin diferencias significativas entre las cepas.

Se analizaron 29 cepas no patógenas para descartar posibles efectos fitotóxicos de otros metabolitos no asociados con patogenicidad producidos en las condiciones de crecimiento. El análisis filogenético de estos aislamientos no patogénicos reveló una gran diversidad,

relacionados a por lo menos 16 especies diferentes de *Streptomyces* (Tabla S1, Anexo II). Además, cinco aislamientos fueron asignados a *Kitasatospora* sp., otro género de actinomicetos altamente relacionado con *Streptomyces*. Como era de esperar, ninguna de estas cepas mostró actividad fitotóxica en las condiciones de cultivo utilizadas.

Por otro lado, la mayoría de las cepas de *Streptomyces* patógenas mostraron actividad fitotóxica en los sobrenadantes de cultivo, demostrando que la patogenicidad se debe a la secreción de metabolitos fitotóxicos. Solo dos cepas patógenas, identificadas como *S. niveiscabiei* (St108 y St1020) no mostraron fitotoxicidad. Previamente, se verificó la patogenicidad de ambos aislados en base a la inhibición del crecimiento de la raíz de brotes de rabanito, utilizando un inóculo de las cepas en lugar de sobrenadantes (Lapaz et al., 2017). Estos hallazgos revelaron que estas cepas no producen compuestos fitotóxicos bajo las condiciones de cultivo ya descritas.

2.3.2 Correlación de la fitotoxicidad con fitotoxinas ya conocidas producidas por *Streptomyces*

Se analizó la producción de TXT y DMSN en las 29 cepas patógenas por HPLC-UV, con el objetivo de correlacionar la fitotoxicidad observada a nivel de los sobrenadantes con la presencia de estos compuestos con reconocida actividad fitotóxica. En la Figura 2 se muestran dos cromatogramas representativos para la detección de ambos compuestos. Los picos correspondientes a las toxinas se identificaron en base a la comparación con los estándares correspondientes, los cuales tienen tiempos de retención de 4,2 min (TXT) y 14,4 min (DMSN) como se puede observar en las Figuras 2.2 A y 2.2 C, respectivamente. A su vez, la identidad de cada compuesto se verificó por su espectro UV (Figuras 2.2 B y 2.2 D). La toxina TXT fue producida por todas las cepas de *S. scabies*, *S. acidiscabies* y *S. europaeiscabiei* de nuestra colección (Tabla 2.1). Además, se detectó DMSN en sobrenadantes de cultivo de 6 de las 10 cepas de *S. niveiscabiei*, lo que sugiere que, al menos dentro de nuestra colección, esta fitotoxina reportada recientemente es única de esta especie patógena. Por otro lado, y en concordancia con el ensayo de fitotoxicidad en

rabanito, no se detectó ninguna de estas dos fitotoxinas en sobrenadantes de las cepas St108 y St1020 identificadas como *S. niveiscabies*. Además, no se detectó ni TXT ni DMSN en las otras cuatro cepas cuyos sobrenadantes sí mostraron fitotoxicidad (St1011, St1018, St1135 y St1218).

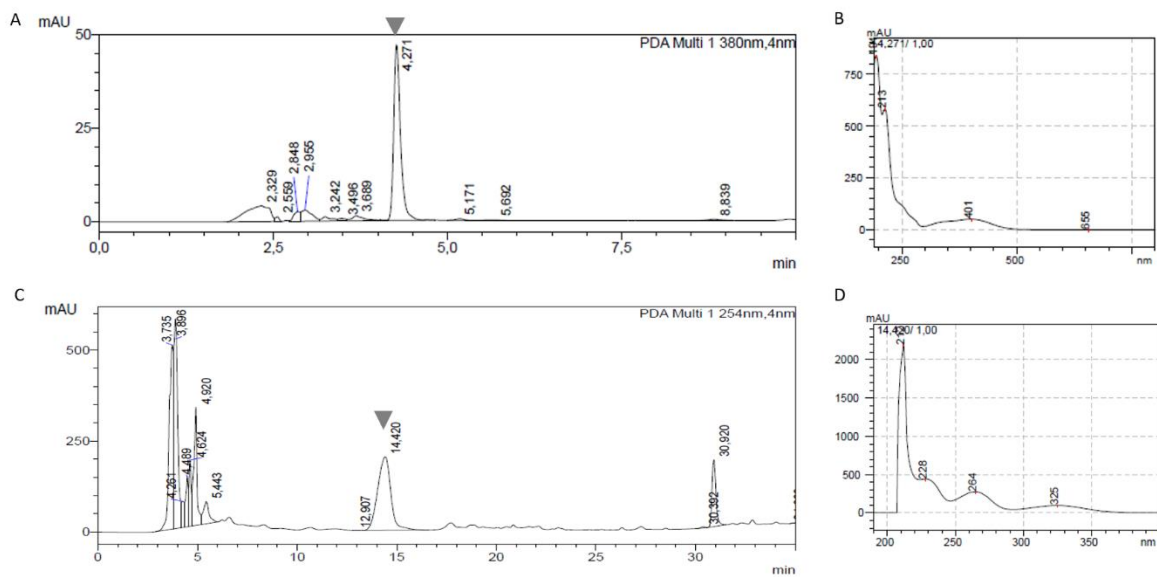


Figura 2.2. Cromatogramas representativos y espectros UV de la detección de taxtomina A (TXT) y desmetilmensacarcina (DMSN) en sobrenadantes de cepas patógenas de *Streptomyces*. (A) Cromatograma de *S. acidiscabies* St105 a 380 nm con el pico de TXT a los 4,2 min; (B) espectro UV para TXT a los 4,2 min; (C) cromatograma de *S. niveiscabies* St1017 a 254 nm que muestra el pico de DMSN a los 14,4 min; (D) Espectro UV para DMSN a los 14,4 min.

Para corroborar la capacidad de producción de estas fitotoxinas, se realizó la detección de los genes involucrados en su biosíntesis, *dmsnK1* y *txtA*, para DMSN y TXT, respectivamente. Como era de esperar, la presencia de los genes biosintéticos correspondientes, se confirmaron en todos los aislamientos que produjeron cada fitotoxina según los resultados del análisis por HPLC-UV. Llama la atención que el gen de la DMSN, *dmsnK1* está presente en todos los aislamientos de *S. acidiscabies*, aunque esta fitotoxina no fue detectada por HPLC-UV. Estos resultados pueden explicarse por la existencia de BGCs silenciosos o

truncados, lo que lleva a que no se produzca la fitotoxina en las condiciones de cultivo seleccionadas (Tabla 2.1). En el caso de los aislamientos de *S. niveiscabiei* se encontraron resultados diferentes. Ninguno de los aislamientos produjo TXT ni se detectó el gen *txtA*. Por otro lado, si bien se detectó la presencia del gen *dmsnK1* en casi todos los aislamientos, solo 6 de 10 aislamientos produjeron DMSN según los resultados del HPLC-UV (St1015, St107, St109, St1013, St1016 y St1017). Estos resultados también sugieren que a pesar de que el gen está presente en el genoma, no se expresa en algunas condiciones. Algunos aislamientos que tienen el gen *dmsnk1*, no producen la fitotoxina en las condiciones estudiadas y, como mostraron fitotoxicidad en rabanito, este resultado indica que estas cepas pueden producir otras fitotoxinas. Finalmente, los aislamientos de *S. puniscabiei* no tienen ninguno de estos genes y tampoco se detectaron estas fitotoxinas, lo que sugiere la secreción de otras fitotoxinas no identificadas.

2.3.3 Conectando el perfil metabólico con el potencial patogénico y la filogenia de las cepas

En la Figura 2.3A se muestran los espectros de ^1H RMN de los sobrenadantes de las 58 cepas empleadas en este estudio. Como se mencionó anteriormente, la región sombreada entre 3,0 y 5,4 ppm contiene principalmente resonancias de carbohidratos que corresponden a componentes del medio de cultivo y al pico de solvente residual, y por lo tanto no fue considerado en el análisis. En los perfiles de ^1H RMN se pueden distinguir fácilmente variaciones en el exometaboloma, tanto en la región aromática-olefínica (9,0 a 5,5 ppm), como en la región alifática (3,0 a 0,0 ppm). Estos constituyen la base para el desarrollo de modelos estadísticos de análisis multivariado para discriminar entre cepas de *Streptomyces* fitotóxicas y no fitotóxicas. Inicialmente, se llevó a cabo un PCA para evaluar las tendencias de los datos, y la gráfica de puntajes resultante se presenta en la Figura 2.3B. Aquí, se pueden distinguir dos grupos, cepas fitotóxicas y no fitotóxicas; por lo que se contruyó un modelo estadístico para evaluar si era posible discriminar entre los dos grupos por medio de un OPLS-DA (Figura 2.4A). Este modelo validado mostró una buena discriminación entre

ambos grupos (Figura S1, Anexo II). El análisis de los gráficos de valores de carga del OPLS-DA que se muestra en la Figura 2.4B permitió detectar que los sobrenadantes de las cepas patógenas se correlacionan con las señales correspondientes a las fitotoxinas conocidas, incluyendo TXT (7.29, 2.93 y 2.62 ppm) y DMSN (7,60, 7,46, 7,34, 5,76, 1,39 y 0,97 ppm), así como las resonancias a 0,88 y 0,77 ppm que se corresponden inequívocamente a los perfiles ^1H RMN de las cepas de *S. puniscabiei* St1135 y St1218.

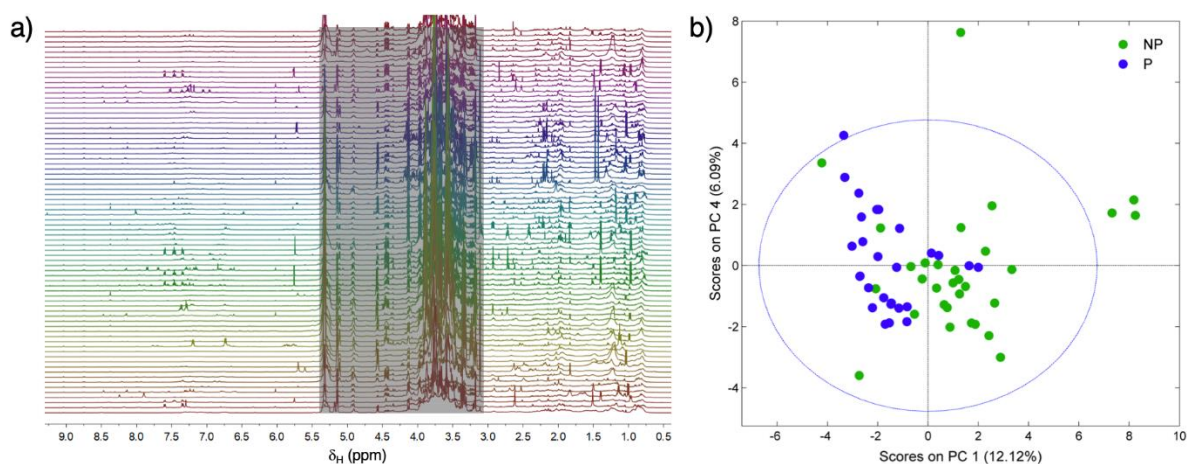


Figura 2.3. (A) Espectros apilados de ^1H RMN de los sobrenadantes de las 58 cepas de actinomicetos analizadas en este estudio. Los datos de la región sombreada entre 3,0 y 5,4 ppm, que contienen las señales de los carbohidratos y el agua residual, no se consideraron en los análisis multivariados. (B) Gráfico de PCA obtenido de los datos espectrales de ^1H RMN donde se puede observar la agrupación de sobrenadantes fitotóxicos (P, *phytotoxic*) y no fitotóxicos (NP, *non-phytotoxic*).

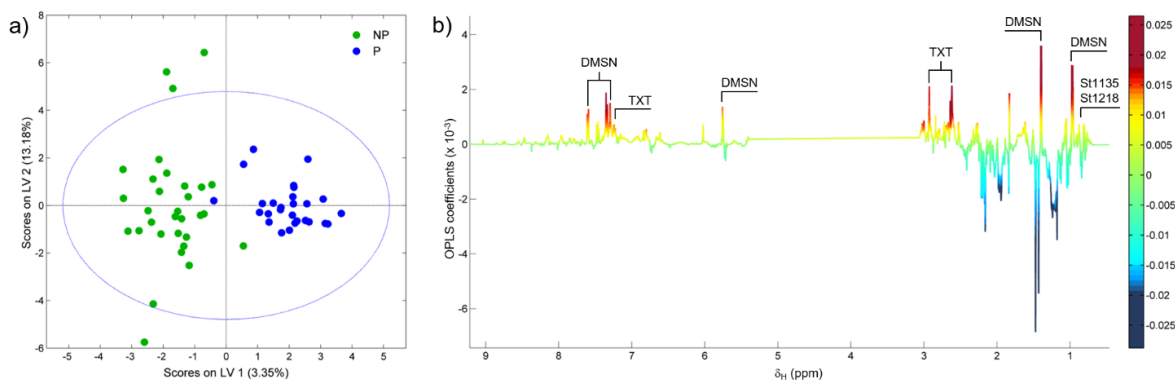


Figura 2.4. Gráficos de OPLS-DA (A) y de carga (B) obtenidos del análisis entre 27 cepas de *Streptomyces* fitotóxicas (P) y 31 no fitotóxicas (NP). Las señales correspondientes a los metabolitos que se correlacionan con las cepas fitotóxicas están anotadas en el gráfico de valores de carga (B). El modelo presentó coeficientes R^2Y y Q^2Y de 0,81 y 0,54; respectivamente, y una curva ROC con un área bajo la curva de 0,93. La prueba de permutaciones realizada con 200 iteraciones cumplió la prueba de Wilcoxon con $p < 0.05$ (Figura suplementaria 2, Anexo II).

Se realizó un HCA considerando las 29 cepas patógenas de nuestra colección. En el dendograma que se muestra en la Figura 2.5 se puede observar que los sobrenadantes se agruparon en seis clusters (I a VI) según su perfil de 1H RMN. Al comparar la distribución de especies en los diferentes clusters obtenidos se observan varias similitudes entre la clasificación obtenida mediante los perfiles metabólicos y las relaciones filogenéticas entre las cepas evaluadas mediante MLSA (Tabla 2.1) (Lapaz et al., 2017). Por ejemplo, todas las cepas identificadas como *S. scabies* y *S. europaeiscabiei* se agruparon en el grupo II con una pequeña diferencia entre ellos, tal como como se observó en el MLSA donde ambas especies están estrechamente relacionadas filogenéticamente.

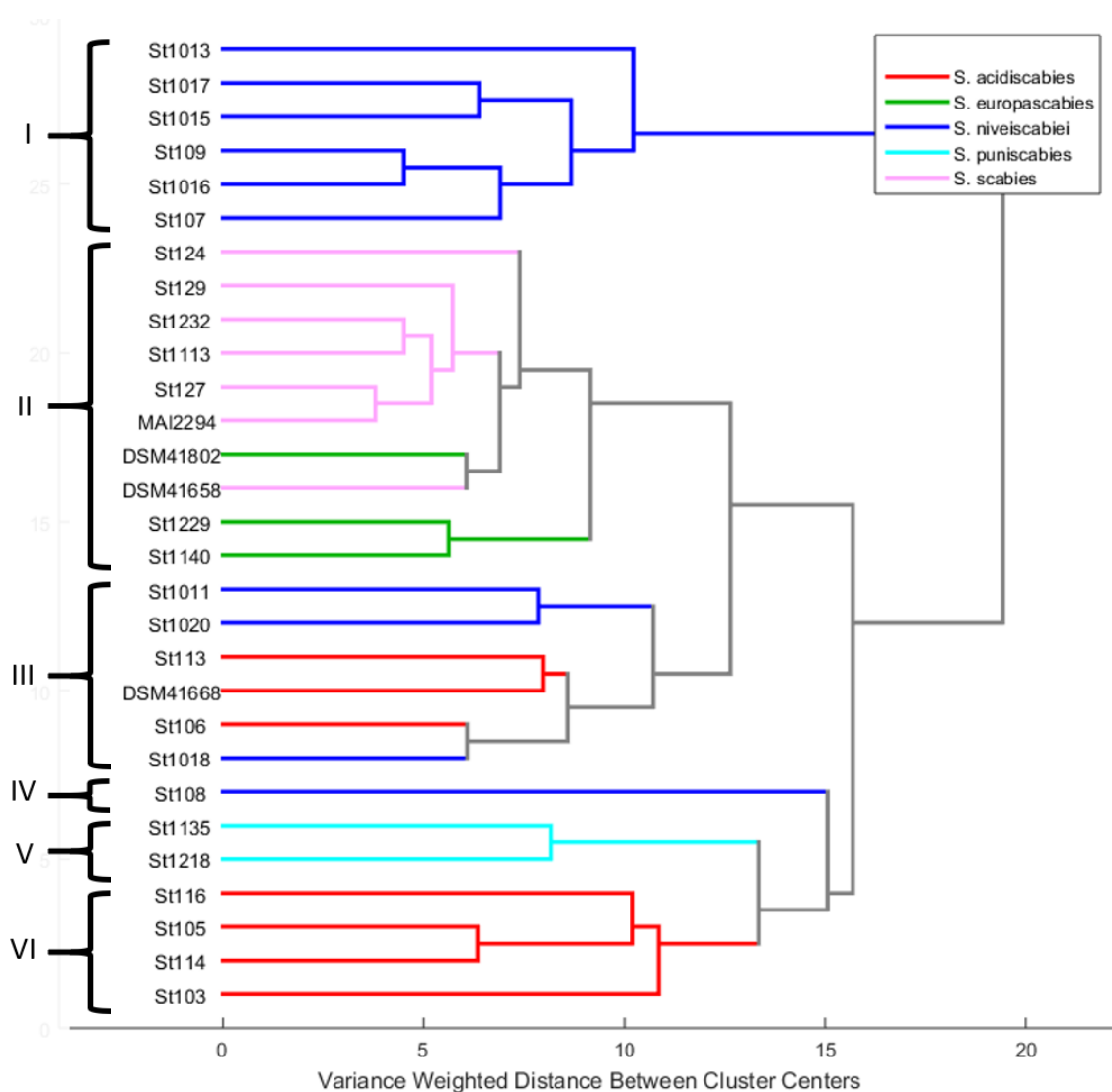


Figura 2.5. Dendrograma HCA de las 29 cepas patógenas realizado por el método de Ward utilizando los datos de ^1H RMN centrados en la media y con escala de Pareto. Los números romanos representan grupos de acuerdo a su similitud del perfil metabólico, y las diferentes especies de *Streptomyces* están codificados por colores como se indica en la leyenda.

Además, todas las cepas del grupo I pertenecen a la especie *S. niveiscabiei*, aunque algunas otras cepas de esta especie se agruparon en los grupos III y IV (St108, St1011, St1018 y St1020). La gran distancia que presentó el grupo I en relación a los otros grupos (grupos II-VI) sugiere diferencias importantes en términos de los perfiles metabólicos de esas cepas,

que pueden explicarse por la producción de DMSN. Los perfiles de ^1H RMN de estas cepas productoras de DMSN se muestran en la Figura 3 del material suplementario (Anexo II). La misma situación puede observarse entre las cepas de *S. acidiscabies*, que se agruparon en los clusters III y VI. Finalmente, las cepas agrupadas en el grupo V se identificaron filogenéticamente como *S. puniscabiei*.

2.4 Discusión

Existen pocos reportes en bibliografía sobre las diferencias entre los metabolitos secretados por especies de *Streptomyces* patógenas de plantas. En este trabajo, el tema fue abordado desde una perspectiva metabolómica y filogenética. Durante varios años, las taxtominas se han identificado como determinantes esenciales de patogenicidad en especies de *Streptomyces* patógenas. Sin embargo, la gran diversidad que presenta este género y su alto potencial metabólico, sumado a su capacidad de movilizar BGCs por transferencia horizontal de genes, dió lugar a la aparición de nuevas especies patógenas (Huguet-Tapia et al., 2016; Zhang et al., 2016). En estudios recientes se ha demostrado la existencia de otros compuestos fitotóxicos que también contribuyen al desarrollo de SC, y de los que no se conocía previamente su fitotoxicidad (Li et al., 2019). Para profundizar en estos hallazgos, en este trabajo se llevó a cabo un abordaje metabolómico basado en RMN, para determinar el potencial patogénico de las cepas de *Streptomyces* y se identificaron nuevas cepas que tienen la fitotoxina descubierta por nuestro grupo (Lapaz et al., 2018) y otras fitotoxinas.

Además de las 70 cepas de *Streptomyces* patógenas pertenecientes a diferentes especies, nuestra colección local incluye más de 200 cepas de actinomicetos aislados de suelo y tubérculos de papa, que no habían sido previamente estudiadas. La gran diversidad encontrada en el análisis filogenético revela la heterogeneidad que presenta este grupo bacteriano (Figura S1, Anexo II). Además, este trabajo demostró que los análisis filogenéticos basados en *rpoB* pueden ser utilizados como método para diferenciar aislamientos desconocidos, aunque se necesitaría realizar más estudios para una identificación taxonómica precisa al nivel de especie.

En esta tesis, el ensayo de rabanito utilizado previamente para inferir patogenicidad fue adaptado y aplicado para inferir la fitotoxicidad de sobrenadantes (Bignell et al., 2010; Fyans et al., 2016). Como era de esperar, casi todos los sobrenadantes obtenidos de cepas patógenas mostraron fitotoxicidad en este ensayo, lo que indica que la patogenicidad de

estas cepas de *Streptomyces* se explica, al menos en parte, por la secreción de metabolitos y/o proteínas con actividad fitotóxica. Los resultados obtenidos para las 29 cepas no patógenas que mostraron no tener actividad fitotóxica nos permitió validar la interpretación de los resultados positivos, y así excluir que la fitotoxicidad sea debida a la existencia de compuestos fitotóxicos derivados de la degradación de los componentes del medio de cultivo.

En una revisión reciente, Li et al. (2019) describen una visión general del conocimiento actual sobre los factores de virulencia que contribuyen a la infección y el desarrollo de enfermedades por *Streptomyces*. Además de las taxtominas, actualmente hay evidencia de que otras fitotoxinas juegan un papel clave en el desarrollo o gravedad de las enfermedades causadas por especies de *Streptomyces*. Los estudios previos que realizó nuestro grupo (Lapaz et al., 2018) dieron lugar al descubrimiento de la DMSN como un nuevo compuesto fitotóxico producido por la cepa *S. niveiscabiei* St1015. Además, existen muchas otras fitotoxinas reportadas; incluyendo el coronafacoilo (Bignell et al., 2010, 2018), las concanamicinas (Fyans et al., 2016), la borrelidina (Cao et al., 2012) y la fridamicina E (Natsume et al., 2018). En este trabajo, planteamos la hipótesis de que la DMSN y/o TXT podrían estar presentes en varias cepas de nuestra colección, por lo que realizamos su detección mediante análisis por HPLC-UV en sobrenadantes de cultivo, así como la detección de genes clave de su vía metabólica mediante PCR. Los resultados mostraron que la TXT fue producida por todos los aislamientos de *S. scabies*, *S. acidiscabies* y *S. europaeiscabiei* evaluados (Tabla 2.1), y como era de esperar, la presencia del gen *txtA* fue confirmada en esas cepas. Además, el gen *txtA* está ausente en todas las cepas de *S. niveiscabiei* evaluadas, aunque la cepa tipo de esta especie, NRRL B- 24457, tiene reportada la presencia de este gen (Park et al., 2003a). De estos resultados, se sugiere que las cepas de *S. niveiscabiei* aisladas en Uruguay podrían haber perdido este gen o incluso una parte del BGC, como se ha observado con algunas cepas de otras especies (*S. scabies* y *S. acidiscabies*) (Zhang et al., 2016, 2018).

Además de detectar la presencia de DMSN en la cepa St1015, que en este trabajo se utilizó como cepa de referencia, la misma se detectó en sobrenadantes de cultivo de otras cinco cepas de *S. niveiscabiei*. Parecería ser que, al menos dentro de nuestra colección, esta fitotoxina recientemente reportada es exclusiva y característica de esta especie patógena. Estos hallazgos son similares a los obtenidos por otros autores. Por ejemplo, la producción de concanamicinas parece ser particular de la especie *S. scabies* (Natsume et al., 1998, 2001). En este trabajo, se demostró que *S. niveiscabiei* es una nueva especie asociada con SC que se caracteriza por producir esta fitotoxina. Actualmente, nuestro grupo se encuentra profundizando en análisis bioinformáticos para determinar el BGC correspondiente en otras especies de *Streptomyces*.

Curiosamente, el gen *dmsnK1*, un gen clave en la ruta biosintética de la DMSN, se detectó en todas las cepas de *S. acidiscabies* y, con la excepción de St108, en todas las cepas de *S. niveiscabiei* de nuestra colección. El hecho de que esta toxina no sea producida por cepas de *S. acidiscabies* que tienen el gen *dmsnK1* puede deberse a que su BGC está silenciado o truncado, o a las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio. El medio OBB fue seleccionado en este trabajo ya que está reportado que todas las fitotoxinas conocidas están inducidas en esas condiciones (Babcock et al., 1993; Natsume et al., 1996, 1998, 2005, 2018; Cao et al., 2012; Fyans et al., 2015). A pesar de esto, los mecanismos de regulación involucrados pueden ser complejos, ya que los metabolitos secundarios no se expresan de forma constitutiva. Las condiciones específicas requeridas para su expresión dificultan su estudio en el laboratorio.

Por otro lado, en las cepas de *S. niveiscabiei* St1011 y St1018, las cuales mostraron fitotoxicidad en rabanito, no se detectó ni DMSN ni TXT por HPLC-UV. Además, otras dos cepas, St1135 y St1218, relacionadas con *S. puniscabiei* en el esquema MLSA, tampoco producen ninguno de los compuestos conocidos ni tienen los genes correspondientes. Sin embargo, los sobrenadantes de cultivo de estas cepas fueron capaces de producir inhibición del crecimiento de las raíces y retraso en el crecimiento de los brotes de rabanito, de igual

manera que las cepas productoras de TXT o DMSN. Para estas cepas proponemos que se estén produciendo otros compuestos fitotóxicos que podrían ser novedosos. Por ejemplo, hasta el momento no se ha reportado ninguna fitotoxina para *S. puniscabiei* (Park et al., 2003b).

Para evaluar las diferencias en la producción de metabolitos se llevó a cabo un enfoque metabolómico basado en el análisis de perfiles de ^1H RMN. La gran cantidad de datos generados requiere de análisis multivariados para clasificar las muestras en diferentes grupos y así, facilitar su interpretación según la distribución de metabolitos bajo distintas variables. También permite evaluar simultáneamente muchos metabolitos y determinar su correlación con distintas propiedades biológicas (Betancur et al., 2017). La metabolómica basada en RMN se ha utilizado tradicionalmente en estudios referidos a humanos y a plantas (Nicholson y Lindon, 2008; Kim et al., 2011), pero es menos utilizada en microorganismos. En el caso de los actinomicetos, la mayoría de los trabajos realizados utilizando la metabolómica como abordaje metodológico se centran en la identificación de nuevos compuestos con actividad antibiótica, dejando un poco de lado a otros metabolitos bioactivos (Betancur et al., 2017; Wu et al., 2017; Senges et al., 2018). Además, la mayoría utiliza LC-MS/MS como herramienta analítica. En este trabajo se utilizó la metabolómica basada en RMN para explorar y predecir la potencial patogenicidad de cepas de género *Streptomyces*. Mediante la comparación entre cepas fitotóxicas y no fitotóxicas, se encontró que existen diferentes perfiles químicos entre las muestras analizadas. Los gráficos de carga correspondientes mostraron que la discriminación se debió principalmente a picos correspondientes a los compuestos conocidos (DMSN y TXT), y a una fitotoxina desconocida asociada con las cepas St1135 y St1218 de *S. puniscabiei* que aún resta identificar. Por otro lado, las señales de las cepas no fitotóxicas no muestran un patrón específico y se relacionaron principalmente con metabolitos primarios, incluyendo lipoproteínas y *N*-acetilglucosamina.

A pesar de que el número de trabajos relacionados a estudios filogenéticos o metabolómicos ha aumentado en los últimos años, pocos de ellos han reportado estudios que relacionen ambos abordajes. Por ejemplo, Nguyen et al. (2016) relacionan estudios filogenéticos con metabolómicos (basados en espectrometría de masas), para establecer las relaciones entre los cambios metabólicos y las adaptaciones evolutivas de las especies del género de plantas *Panax* en diferentes climas. En cuanto a las actinobacterias, en el trabajo de Betancur et al. (2017) se utilizó una estrategia integradora basada en información taxonómica, bioactividad y perfiles metabólicos, la cual se combinó con procedimientos de dereplicación para seleccionar y priorizar cepas como fuente de nuevos compuestos activos contra fitopatógenos. En este trabajo, se compararon resultados obtenidos del árbol filogenético (MLSA) con un dendograma HCA obtenido de perfiles metabólicos basados en ^1H RMN de especies patógenas de *Streptomyces* para investigar la relación entre su taxonomía y la producción de compuestos fitotóxicos. En estos dendogramas, la distancia entre dos objetos corresponde al grado de similitud entre ellos. Por eso, en este caso, una distancia pequeña entre grupos indica una gran similitud entre los perfiles químicos de las cepas, y cuanto más aumenta esta distancia, también lo hace el grado de divergencia entre ellas (Betancur et al., 2017). La gran distancia observada en el grupo I en relación con los demás grupos sugiere diferencias importantes en términos de perfiles metabólicos, que en este caso pueden explicarse por la secreción de DMSN en esas cepas, todas pertenecientes a *S. niveiscabiei* (Figura suplementaria 3, Anexo II). Aparentemente, las señales de alta intensidad correspondientes a las resonancias de este compuesto tienen un efecto importante en la discriminación (Figura 4B). Este hallazgo destaca la importancia biológica que tiene la DMSN, siendo un metabolito secundario secretado en grandes cantidades por cepas de *S. niveiscabiei*. La gran relación observada en el dendograma HCA entre cepas identificadas como *S. scabies* y *S. europaeiscabiei* indican un estrecho vínculo entre la filogenética y la metabolómica en este caso. Por otra parte, algunas cepas identificadas como *S. niveiscabiei* (St108, St1011, St1018, y St1020) se agruparon en los grupos III y IV, y una situación similar se puede observar entre cepas de la especie *S. acidiscabies* las cuales

fueron agrupadas en los grupos III y VI. El hecho de que el dendograma HCA no coincida con el árbol filogenético obtenido por MLSA es esperable, ya que estas técnicas se basan en diferente información, haciéndolas complementarias. Estudios previos han demostrado que incluso diferentes cepas de la misma especie de *Streptomyces* contienen diferentes BGCs que codifican la producción de metabolitos secundarios específicos de la cepa (Seipke, 2015). En este trabajo, se presentan ejemplos de cepas filogenéticamente relacionadas que no producen los mismos metabolitos secundarios, y cepas pertenecientes a diferentes clados que producen metabolitos similares (como las cepas de *S. acidiscabies* que producen taxtomina). En el trabajo de Betancur et al. (2017) se encontraron resultados similares relacionados con compuestos activos contra fitopatógenos. Finalmente, las cepas agrupadas en el grupo V están filogenéticamente relacionadas con *S. puniscabiei*, por lo que la filogenia y la metabolómica también están relacionadas en este caso. Se cree que para estas cepas está involucrado un compuesto fitotóxico no identificado. Este estudio nos permitió priorizarlas para realizar más estudios químicos, que se plantean como perspectiva de este trabajo.

El enfoque adoptado en este trabajo tiene el potencial de identificar directamente compuestos candidatos a ser metabolitos nuevos. Esta conclusión es apoyada por la correlación entre la diversificación del metaboloma y la distancia filogenética comprobada en este estudio. Se cree que para las cuatro cepas pertenecientes a *S. niveiscabiei* y *S. puniscabiei* en las que no se detectó ni TXT ni DMSN (St1011, St1018, St1135 y St1218), están presentes otros compuestos fitotóxicos. Más importante aún, estas cuatro cepas habrían sido clasificadas como productoras de fitotoxinas mediante los modelos de análisis estadístico multivariado PCA, HCA y OPLS-DA; incluso si los datos de fitotoxicidad no hubiesen estado disponibles, destacando claramente los beneficios de ahorro de tiempo de la metodología propuesta.

Como conclusión, cabe señalar que las bacterias que producen tantos metabolitos generalmente los producen en cantidades muy bajas, haciendo muy difícil su aislamiento e

identificación. Con las tecnologías de detección basadas en resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, la identificación de los metabolitos en muestras biológicas sigue siendo un importante obstáculo y cuello de botella (Dona et al., 2016). Todavía hacen falta bases de datos públicas para almacenar y compartir información para el análisis metabolómico basado en RMN. Tales bases de datos se necesitan con urgencia para hacer que los perfiles metabólicos constituyan una verdadera y robusta tecnología “ómica” (Kim et al., 2011).

CAPÍTULO 3
EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD NEMATICIDA Y DE
PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL EN
CEPAS DE *STREPTOMYCES* AISLADAS EN URUGUAY

3.1 Introducción

En este trabajo, de todas las actividades reportadas en actinomicetos, se enfocó hacia la búsqueda de compuestos antiparasitarios y compuestos asociados a la promoción de crecimiento vegetal.

3.1.1 Actividad antiparasitaria

Las infecciones parasitarias son un gran problema sanitario a escala mundial, y dentro de éstas se incluyen las causadas por nemátodos (comúnmente conocidos como gusanos redondos). El filo nematodo es uno de los más grandes pertenecientes al reino animal que, además de parásitos, incluye especies de vida libre (Steppek et al., 2006). No solo tienen un gran impacto en la salud humana, donde afectan a un cuarto de la población mundial, sino que también infectan al ganado y los cultivos, afectando la producción de alimentos y provocando grandes pérdidas económicas (Risi et al., 2019). Las infecciones causadas por parásitos afectan en gran medida al ganado, con un impacto económico en veterinaria estimado en 10 billones de dólares a nivel mundial (Mphahlele et al., 2020). En la agricultura, las pérdidas anuales se estiman en 118 billones de dólares anuales mundialmente, siendo *Meloidogyne* spp., conocido como el nemátodo de la raíz, el principal responsable debido a su amplio rango de hospederos y su distribución mundial (Atkinson et al., 2012).

Históricamente, el control de infecciones por nemátodos se ha basado en quimioterapia. Si bien existen métodos no químicos, como el control inmunitario (vacunas), genético (basado en la selección de animales resistentes a infecciones) y biológico (principalmente mediante el uso de hongos nematófagos), en la práctica el uso de productos químicos es la principal medida de control empleada. Esto conlleva al aumento de la resistencia a fármacos conocidos, y a la necesidad urgente de búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Debido al uso indiscriminado de compuestos nematicidas de amplio espectro en ganado, actualmente se ha reportado resistencia a todas las clases disponibles: benzimidazoles (ej.

albendazol), avermectinas (ej. ivermectina) e imidazotiazoles (ej. levamisol) (Kelleher et al., 2020; Mphahlele et al., 2020). En Uruguay, existen unos 300 productos veterinarios registrados con acción nematicida (DILAVE, MGAP), y son de venta libre sin requerimiento de una prescripción veterinaria previa, por lo que existen cifras alarmantes de resistencia (http://www.mgap.gub.uy/bpm/dilave_productosveterinarios_consulta_esp.aspx?,,27,5,0_0,,2,0 MGAP).

Los antihelmínticos actualmente disponibles pertenecen a diferentes clases, incluyendo lactonas macrocíclicas, benzimidazoles, tetrahidropirimidinas-imidazotiazoles, derivados de aminoacetonitrilo y espiroindoles. Los compuestos de estas clases de fármacos son potentes contra una amplia gama de especies de nematodos y, además, las lactonas macrocíclicas son eficaces contra muchos parásitos artrópodos, mientras que los benzimidazoles también contra algunas especies de gusanos planos (Mphahlele et al., 2020). Cada clase de antihelmínticos tiene un modo de acción único contra los parásitos. Los imidazotiazoles, por ejemplo, como el levamisol, son agonistas de la acetilcolina que actúan sobre el sistema nervioso del parásito, provocando la contracción muscular y parálisis en el gusano. Las lactonas macrocíclicas, por otro lado, actúan sobre los canales de cloruro activado por glutamato (GluCl) que causan parálisis de la neuromusculatura del parásito, incluyendo la faringe, evitando así que el gusano se alimente. Los benzimidazoles se unen a la β -tubulina evitando que forme microtúbulos dentro de las células intestinales del helminto, lo que perjudica la absorción de nutrientes resultando en la muerte por inanición (Mphahlele et al., 2020).

Las avermectinas (lactonas macrocíclicas) constituyen una de las clases de antihelmínticos más conocidas, y son metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces avermitilis*. La ruta biosintética de las avermectinas, así como su estructura química y su BGC de 82 kb, se resumen en la Figura 3.1. Las avermectinas contienen cuatro componentes principales (80-90%) A1a, A2a, B1a, y B2a en proporciones variables y cuatro minoritarios (10-20%) A1b, A2b, B1b, y B2b siendo el componente B1a el que tiene la actividad antihelmíntica más efectiva (Figura 1C) (Chen et al., 2016; Zhang et al., 2017).

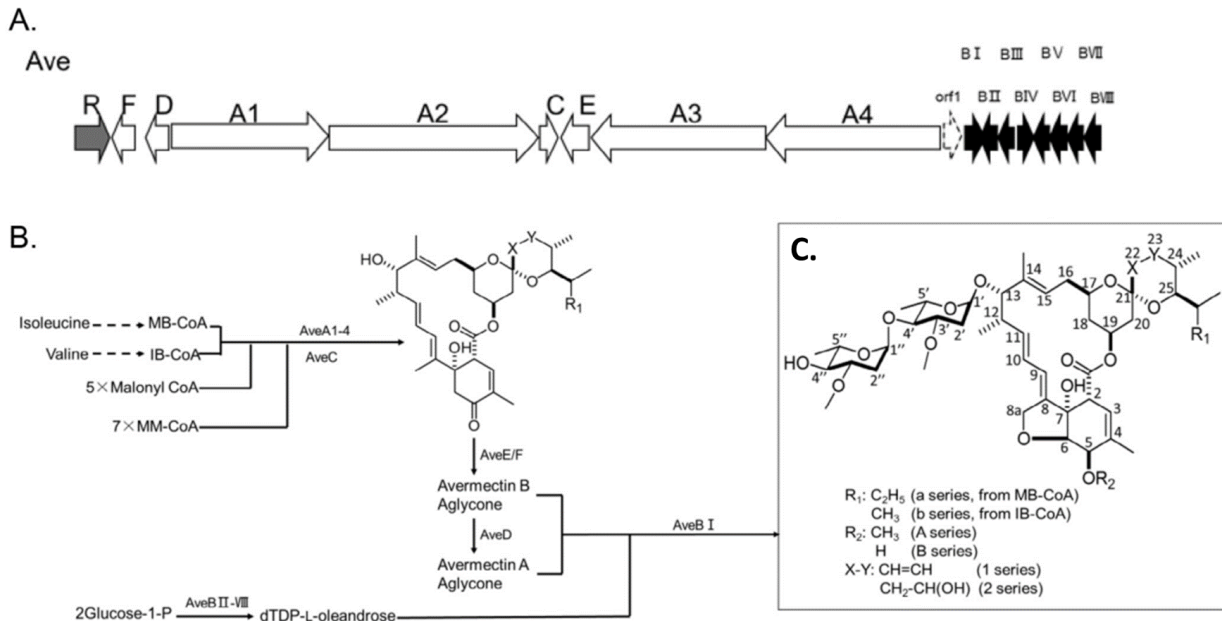


Figura 3.1. Avermectinas (A) *Cluster* biosintético, se muestran los genes implicados en la formación de agliconas de avermectina (en blanco), los genes implicados en la glicosilación de las agliconas (en negro); y el gen regulador (en gris). (B) ruta biosintética y (C) estructura química de las avermectinas A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a y B2b. Los componentes “A” tienen R₂=CH₃; y los “B” : R₂= H; los componentes “1” X-Y= CHCH y los “2” XY= CH₂CHOH; los componentes “a”: R₁=C₂H₅; y los “b”: R₁=CH₃. Imagen obtenida de Chen et al., 2016.

La ivermectina (IVM), introducida como antihelmíntico en la década de 1980 por Merck, es un derivado semi-sintético de las avermectinas, obtenido mediante hidrogenación selectiva de la avermectina B1, consiste en una mezcla con más del 80% de 22, 23-dihidroavermectina B1a y menos del 20% de 22, 23-dihidroavermectina B1b. Es sumamente potente y persistente, por lo que su descubrimiento entusiasmó a otras compañías a invertir en el desarrollo de análogos de ivermectina incluyendo moxidectina, milbemicina, doramectina, selamectina, abamectina y eprinomectina (Holden-Dye y Walker, 2007). En 2015, el descubrimiento de las avermectinas se llevó el premio nobel en fisiología debido a su importante acción antihelmíntica. Sin embargo, las cepas salvajes solo producen bajos niveles de este metabolito, lo que llevó a las empresas a poner el foco en mejorar su producción para satisfacer la demanda (Li et al., 2010; Chen et al., 2016). De

acuerdo con varios estudios empleando *C. elegans* como organismo modelo, el mecanismo de acción de la ivermectina involucra una fuerte y persistente parálisis en la faringe y en los músculos del gusano. Se ha demostrado su acción con una gran variedad de canales iónicos activados por ligando, siendo su alta afinidad por canales de cloruro activados por glutamato la razón principal de su potente actividad antihelmíntica. Sin embargo, también se ha reportado su acción sobre receptores nicotínicos, otros canales de cloruro activados por acetilcolina e histamina, receptores de glicina y receptores P2X4 (Holden-Dye y Walker, 2007). Las avermectinas provenientes del caldo de fermentación de *S. avermitilis* son utilizadas comercialmente para el tratamiento de semillas de maíz, algodón y frijoles, en un producto comercial a base de abamectina (AVICTA™, Syngenta).

3.1.2 Actividad de promoción de crecimiento vegetal

La producción de los cultivos bajo condiciones ambientales sustentables es uno de los mayores desafíos para la investigación agropecuaria. Una de las iniciativas más prometedoras para un nuevo modelo en agricultura está basado en convertir los procesos naturales que ocurren en los sistemas planta-suelo en tecnologías biológicas. En este contexto, el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) para mejorar la agricultura, actualmente recibe gran atención y aceptación (Vurukonda et al., 2018). El uso de BPCV para mejorar la salud de los cultivos es una estrategia muy atractiva para el desarrollo de sistemas agrícolas sustentables, debido a su característica eco-amigable y bajos costos de producción, y además minimiza el consumo de recursos no-renovables (Sathya et al., 2017). Los actinomicetos, especialmente *Streptomyces* spp., representan un gran porcentaje de la microbiota del suelo y son particularmente efectivos colonizadores del sistema radicular de la planta (Tamreihao et al., 2016). A pesar de su existencia ubicua en suelo, rizósfera y tejidos vegetales, existen pocos reportes de la actividad PCV de actinomicetos en relación a otras bacterias (Sousa y Olivares, 2016). Esto puede deberse, en parte, a que este grupo de microorganismos ha sido históricamente utilizado para la búsqueda de antimicrobianos y otros agentes de importancia médica, donde la industria farmacéutica tiene una clara influencia. Sin embargo, más recientemente se le ha dado más

importancia a la actividad PCV por parte de actinomicetos (Sousa y Olivares, 2016; Viaene et al., 2016; Sathya et al., 2017; Vurukonda et al., 2018; Dede et al., 2020).

Como sucede en otras interacciones benéficas, los mecanismos por los cuales los actinomicetos promueven el crecimiento vegetal pueden clasificarse en bioprotección, bioestimulación y biofertilización (Sousa y Olivares, 2016). El primero de ellos, incluye el control biológico de fitopatógenos, el cual puede manifestarse mediante antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, parasitismo e inducción de resistencia sistémica. Todos estos son mecanismos indirectos de actividad PCV y no serán abordados en esta tesis. Los mecanismos directos pueden dividirse a su vez en su acción como biofertilizantes, incluyendo aquí el incremento en la disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno, el fósforo y el hierro, y por otro lado su acción como bioestimulantes, incluyendo la producción de fitohormonas. La capacidad de fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico es exclusiva de los procariotas, siendo un proceso llevado a cabo por la enzima nitrogenasa. A pesar de estar reportada la capacidad de cepas del género *Streptomyces* de fijar nitrógeno (Ribbe et al., 1997; Dahal et al., 2017), la misma ha sido cuestionada ya que no existe evidencia de esto (Mackellar et al., 2016; Sousa y Olivares, 2016). Por otro lado, algunos minerales que son esenciales para las plantas, como el fósforo y el hierro, no se encuentran disponibles para las mismas porque están presentes en formas insolubles en el suelo. Por ejemplo, el fósforo que se encuentran “secuestrado” en la fracción mineral del suelo puede ser solubilizado por ácidos orgánicos secretados por microorganismos (Sousa y Olivares, 2016). Jog et al. (2014) reportaron la solubilización de fósforo debido a la acidificación resultante de la liberación de ácido málico y glucónico por dos cepas de *Streptomyces*, observando también un aumento en el número de ramificaciones y raíces laterales en plantas de trigo inoculadas. Por otro lado, los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular que presentan gran afinidad por el hierro (Sousa y Olivares, 2016). Algunos microorganismos producen gran variedad de estos, siendo los catecoles e hidroxamatos los más conocidos. El género *Streptomyces* es ampliamente conocido por sus sideróforos, incluyendo sus tipos propios característicos: las desferrioxiaminas y coeliquelinas (Sathya

et al., 2017). Además de proveerle hierro a la planta, los sideróforos son también reconocidos por brindarle protección por controlar fitopatógenos mediante la creación de un ambiente competitivo por hierro en la rizósfera (Sathya et al., 2017). Otra forma de promover el crecimiento vegetal es mediante la secreción de fitohormonas. La capacidad de producir fitohormonas como ácido indol-acético (IAA, *indol-acetic acid*) por *Streptomyces* spp. ha sido reportada en varios artículos (Manulis et al., 1994; Abd-Alla et al., 2014; Sousa y Olivares, 2016). El IAA es una hormona vegetal común que pertenece a la clase de las auxinas. Tiene un importante rol en el desarrollo y crecimiento vegetal debido a que induce la elongación y división celular. La producción de IAA y sus vías de síntesis en varias especies de *Streptomyces* se describe en el trabajo de Manulis et al. (1994). El potencial de producción de fitohormonas y otros metabolitos con actividades similares de cepas de *Streptomyces* spp. resulta una actividad más a ser explotada para potenciar la productividad de los cultivos (Sathya et al., 2017).

Existen diversos reportes del uso comercial de cepas de *Streptomyces* como promotoras de crecimiento vegetal (Vurukonda et al., 2018). Por ejemplo, cuatro cepas de *Streptomyces* (*S. lydicus* WYEC108, *S. violaceusniger* YCED9, *S. griseoviridis* K61, y *S. saraceticus* KH400) están presentes en seis preparaciones comerciales utilizadas como biocontroladoras de enfermedades de suelo de origen bacteriano y fúngico. Además, productos como Actinovate® (*Streptomyces lydicus* WYEC 108) y Mycostop® (*Streptomyces griseoviridis* K61) son utilizados para tratamiento de suelos (Rey y Dumas, 2017).

La información anteriormente mencionada sugiere que los actinomicetos y particularmente el género *Streptomyces*, representa una fuente sostenible de productos naturales bioactivos novedosos, que pueden ser ampliamente explorados en varios campos incluyendo agricultura y salud animal. Así, la generación de conocimiento en la búsqueda, caracterización y evaluación de actividades, así como la comprensión de los mecanismos moleculares detrás de cada actividad y su posterior evaluación a gran escala, es necesaria.

En este capítulo se presentan los resultados de todas las actividades evaluadas en este trabajo. En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de cada una de las metodologías a evaluar para posteriormente llevar a cabo el *screening*. Primero se realizó el *screening* de actividad nematocida en 147 cepas de *Streptomyces* seleccionadas en base a los resultados del Capítulo 2, de manera de evaluar cepas que no produzcan metabolitos fitotóxicos. A partir de este *screening* y los resultados de actividad antagonista frente a fitopatógenos (tesis M. Pérez, en preparación), se seleccionaron 25 cepas para la evaluación de las actividades PCV. De esta manera se seleccionaron las cepas más promisorias para posteriores estudios.

Los objetivos específicos de este capítulo son:

1. Optimizar una metodología de *screening* de actividad nematocida en sobrenadantes de cultivo de *Streptomyces*.
2. Realizar un *screening* de actividad nematocida sobre la colección de cepas de *Streptomyces* y seleccionar las que presenten mayor actividad.
3. Optimizar metodologías de evaluación de propiedades *in vitro* de promoción del crecimiento vegetal como la producción de sideróforos, solubilización de fosfatos y producción de auxinas.
4. Evaluar dichas propiedades en cepas de *Streptomyces* de la colección.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Optimización de las condiciones del ensayo de actividad nematocida

La actividad nematocida se evaluó sobre el gusano de vida libre *Caenorhabditis elegans*, el cual es comúnmente utilizado como modelo para la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios (Holden-Dye y Walker, 2007). Una de las principales ventajas que presenta y lo vuelve amigable, es que es de fácil manipulación y manutención y tiene un ciclo de vida corto (3-4 días). Además, *C. elegans* es sensible a la mayoría de las drogas antihelmínticas que son utilizadas contra infecciones de gusanos parásitos de humanos y ganado. Estas características lo vuelven un modelo muy útil para el *screening* de nuevos compuestos antihelmínticos.

Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología de Gusanos del Instituto Pasteur, en colaboración con el Dr. Gustavo Salinas. El crecimiento, manutención y sincronización de la cepa de *C. elegans* N2 Bristol fue realizada con el apoyo de integrantes de este laboratorio. Si bien este ensayo ha sido previamente optimizado y utilizado para cribado de metabolitos (Risi, 2018; Risi et al., 2019), en este trabajo fue la primera vez que se utilizó para evaluar sobrenadantes de cultivo. Por este motivo, varios parámetros debieron optimizarse antes de realizar el *screening* de bioactividad sobre la colección de cepas de *Streptomyces*.

Por un lado, fue conveniente realizar el *screening* de todas las cepas con un mismo lote de gusanos, ya que se observó que el estadio exacto en el que se encuentran al momento de enfrentarlos a los metabolitos tiene un efecto significativo en la respuesta observada. Idealmente, también sería conveniente producir los sobrenadantes simultáneamente, lo cual no fue posible debido a la gran cantidad de cepas a evaluar. Este hecho implicó que un aspecto a optimizar fuese el manejo de los sobrenadantes previo a su evaluación, de manera de contar con todas las muestras disponibles al mismo tiempo. Se evaluaron tres métodos diferentes de conservación de los sobrenadantes de cultivo: en heladera a 4 °C, en

freezer a -20 °C y liofilizados. Se evaluaron estas variantes sobre los sobrenadantes de dos cepas de *Streptomyces* cultivadas en medio SCN (*Starch Casein Nitrate*). A su vez se evaluó la cantidad de gusanos a ser utilizadas en el ensayo evaluando dos relaciones de suspensión de gusanos: sobrenadante, 90:10 y 50:50, siendo 100 µL el volumen final y conteniendo aproximadamente 120 y 60 gusanos por pocillo, respectivamente.

Finalmente, se evaluó el medio de cultivo a utilizar para la producción de los metabolitos previo a realizar el *screening*, los cuales se seleccionaron en base a datos bibliográficos (Kaur y Manhas, 2014; Rashad et al., 2015; Kaur et al., 2016). Los medios evaluados fueron YME (*Yeast Malt Extract*), SCN (*Starch Casein Nitrate*), e ISP4 (*International Streptomyces Project 4*) cuyas composiciones se detallan en Anexo I. Para esta etapa de optimización se seleccionaron al azar cinco cepas de la colección (MAI 2274, MAI 2261, MAI 2267, MAI 2315 y MAI 2321).

3.2.2 Metodología optimizada para la evaluación de actividad nematocida en sobrenadantes de cultivo

Se describe a continuación la metodología utilizada luego de la etapa de optimización. Para cada cepa se partió de una placa de PMA (*Potato Mash Agar*) o ISP4 con crecimiento confluyente (4-7 días de incubación a 28°C). Se agregaron 3 mL de *Tween* 0.0001% y se recogieron las esporas en un tubo Eppendorf. Esta suspensión de esporas fue utilizada como inóculo en los ensayos siguientes. Las cepas para evaluar se inocularon (50 µL) en tubos de 2,2 cm de diámetro conteniendo 10 mL de medio SCN y se incubaron en shaker con agitación orbital a 180 rpm durante 7 días. Se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo mediante centrifugación a 10000 rpm durante 10 min y se esterilizaron por filtración con membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm. Se tomó una alícuota de 1 mL, se liofilizó y se reconstituyó en 250 µL de DMSO 2% (concentrando las muestras 4 veces).

Por otro lado, los gusanos de *C. elegans* fueron mantenidos y crecidos a 20 °C en placas de NGM (*Nematode Growth Medium*) con un césped de la cepa de *E. coli* OP50 como alimento. Las larvas fueron sincronizadas mediante *bleaching* según lo descrito por Risi (2018). Para

llevar a cabo el ensayo, los gusanos en estadio L4 fueron lavados tres veces y recuperados en buffer salino (K buffer, Anexo I) conteniendo 0.015% de BSA en el último lavado. Posteriormente, se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano, aproximadamente 60 gusanos por pocillo (Figura 3.2). Para calcular la concentración de la suspensión de gusanos a utilizar, se colocaron tres gotas de 10 μ L de la misma en un portaobjetos, se observó a la lupa y se calculó el promedio de gusanos. En base a ello, se ajustó el volumen de la suspensión de manera de obtener 60 gusanos en 50 μ L. Luego se agregaron 50 μ L del sobrenadante a evaluar para completar el volumen final de 100 μ L. Una vez sembradas las placas, se agitaron suavemente para lograr contacto entre los gusanos y la muestra.

Para realizar el seguimiento de cada ensayo, se midió la motilidad de *C. elegans* utilizando el equipo WMicrotracker™ ONE (*Phylum Tech*). Este equipo mide de forma rápida, sencilla y reproducible el movimiento de *C. elegans* mediante sensores infrarrojos (Simonetta y Golombek, 2007). Además, las placas fueron inspeccionadas para registrar una valoración cualitativa sobre el estado de los gusanos y la producción de larvas, para lo cual se dispuso de dos lupas con una magnificación de 12x a 75x. En la Figura 3.2 se esquematiza el flujo de trabajo para llevar a cabo el *screening* de actividad nematocida sobre la colección de cepas de *Streptomyces*.

3.2.3 Pre-screening de actividad nematocida

En una primera instancia, este ensayo fue utilizado como *pre-screening* para evaluar la actividad nematocida en 147 cepas de *Streptomyces* de la colección (Tabla A1, Anexo III). Cada cepa se analizó por duplicado, y se utilizaron pocillos con controles negativos (DMSO 2% y K buffer) y positivos (Ivermectina 5 μ M). La medida de motilidad fue tomada a tiempo inicial (previo a agregar la muestra, lo que llamamos habituación), a un tiempo intermedio (24 hs) y a tiempo final (48 hs). Para cada muestra se calculó el valor promedio de ambos duplicados. Los resultados obtenidos fueron corregidos para normalizar el 100 % inicial de movimiento (habituación), y los datos fueron analizados para determinar el porcentaje de

motilidad de los gusanos a las 24 y 48 hs. Además, las placas fueron inspeccionadas mediante lupa a ambos tiempos, registrando movilidad y producción de larvas.

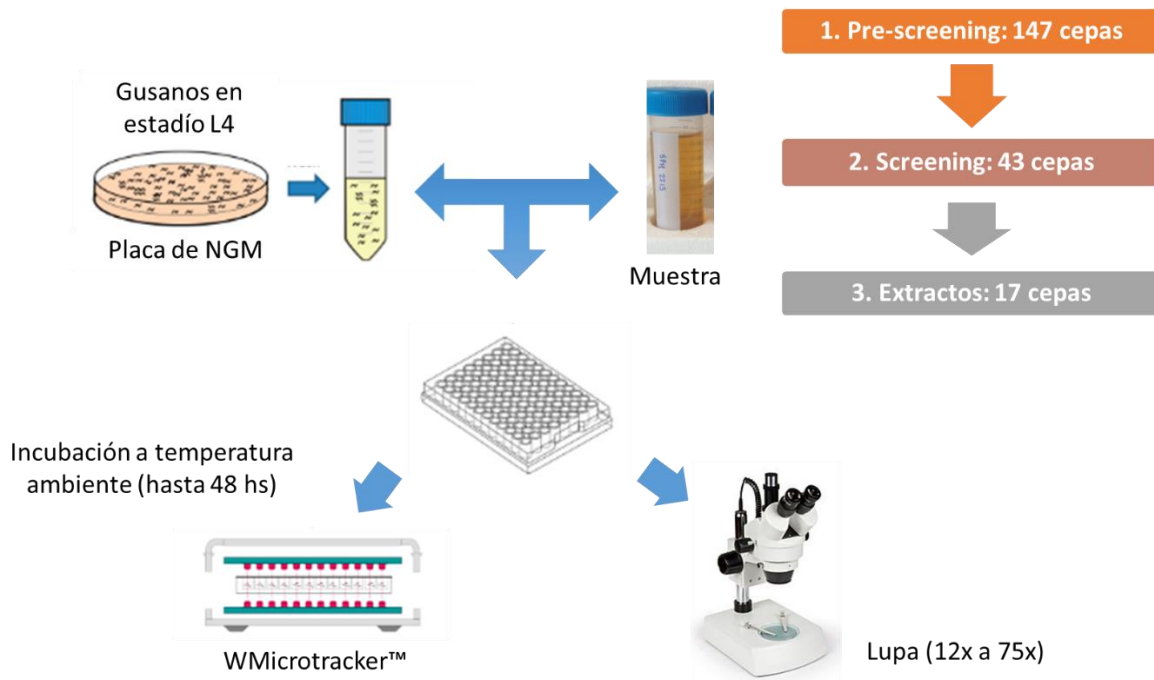


Figura 3.2. Flujo de trabajo para la evaluación de actividad nematocida sobre una colección de 147 cepas de *Streptomyces*. Una suspensión de gusanos en estadio L4 se enfrentó a cada una de las muestras (sobrenadantes de cultivo o extractos). Se midió la motilidad de los gusanos en el WMicrotracker™ y se inspeccionó bajo lupa a las 24 y 48 hs.

3.2.4 Screening de actividad nematocida

El ensayo de pre-screening permitió seleccionar un subconjunto de 43 cepas que mostraron actividad nematocida y sobre las cuales se repitió la evaluación. Cada muestra se analizó por duplicado y se utilizaron controles positivos y negativos como se detalló anteriormente. El total de las muestras fueron evaluadas en una misma placa, lo que permitió realizar un gráfico de la cinética de la motilidad de los gusanos (una medida cada 30 min durante 18 horas). Además, todas las muestras se evaluaron bajo lupa a las 24 hs y 48 hs registrando cualitativamente la afectación de los gusanos con relación a la motilidad y producción de larvas.

3.2.5 Identificación molecular de las cepas con actividad nematocida

A partir de los resultados del screening, las cepas seleccionadas fueron identificadas en base al gen *rpoB*. El análisis filogenético se llevó a cabo mediante amplificación, secuenciación y construcción de los árboles filogenéticos tal como se describe en el Capítulo 2 (Croce et al., 2021).

3.2.6 Preparación de extractos orgánicos y acuosos a partir de sobrenadantes de cepas seleccionadas con actividad nematocida

Las cepas seleccionadas a partir del *screening* de actividad nematocida se inocularon con 200 μ L de una suspensión de esporas en matraces conteniendo 50 mL de medio de cultivo SCN. Los matraces se incubaron durante 7 días, a 28 °C con agitación a 180 rpm y se obtuvieron los sobrenadantes según se describe en el Capítulo 2. También se incluyó un control de medio de cultivo sin inocular.

Los sobrenadantes obtenidos se procesaron mediante extracción líquido/líquido con acetato de etilo (1:1). Para ello, cada sobrenadante filtrado se trasvasó a un embudo de decantación, se agregó el mismo volumen del solvente orgánico y se agitó vigorosamente durante dos minutos. Se recogió la fase orgánica en un matraz y se repitió el procedimiento dos veces más. Se combinaron las fracciones orgánicas obtenidas, se agregó Na_2SO_4 al matraz para eliminar el exceso de agua, se filtró por algodón y se pasó a un balón para eliminar el solvente por evaporación a vacío. Se pesó el residuo de extracto obtenido para cada muestra y se re-suspendió en DMSO 2% ajustando a una concentración de 30 mg/mL. Los viales se sonicaron durante 10 minutos para asegurar la disolución de los compuestos presentes en los extractos.

Por otro lado, 10 mL de la fase acuosa obtenida a partir de la extracción con acetato de etilo fueron liofilizados y posteriormente resuspendidos en 5 mL de DMSO 2% (concentración del sobrenadante 2x). Se realizó la evaluación de actividad nematocida sobre los extractos orgánicos y acuosos observando su motilidad y producción de larvas en la lupa a las 24 y 48

hs. También se incluyó la evaluación de actividad nematocida sobre extractos orgánicos a partir de los medios de cultivo OBB, TSB y SFM (cuya composición se detalla en el anexo I) para 5 cepas de *Streptomyces* seleccionadas sobre las cuales se continuó profundizando en el Capítulo 4.

3.2.7 Screening de propiedades de promoción de crecimiento vegetal *in vitro*

Se partió del antecedente de trabajo de nuestro grupo de investigación en el cual se encontraron varias cepas con actividad antagonista frente a microorganismos fitopatógenos (tesis de Maestría M. Pérez). En primer lugar, se seleccionaron 10 cepas de *Streptomyces* que presentaron los mayores niveles de actividad antimicrobiana y nematocida con el objetivo de poner a punto en nuestro laboratorio las diferentes metodologías de evaluación de propiedades vinculadas a la PCV. Posteriormente, se amplió el *screening* a un total de 25 cepas de la colección. Las propiedades evaluadas fueron: la producción de fitohormonas, en particular ácido indol-acético (IAA), la producción de sideróforos y la capacidad de solubilizar fosfato (orgánico e inorgánico).

3.2.7.1 Producción de fitohormonas

A partir de una placa esporulada en medio ISP4 de cada cepa a evaluar, se preparó una suspensión de esporas como se detalla en la sección 3.2.2. Se realizó un sub-cultivo en tubos conteniendo 10 mL de medio TSB con triptófano (10 g/L) e incubando a 28 °C en agitación por 5 días. Los cultivos se pasaron a tubos de 50 mL, se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min, y los sobrenadantes obtenidos se filtraron por membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm. Estas muestras fueron utilizadas para evaluar la producción de auxinas (indoles totales) mediante el método colorimétrico utilizando el reactivo de Salkowski (Tamreihao et al., 2016). También se evaluó la producción de IAA mediante HPLC-UV. Como control positivo se utilizó una cepa de *Azospirillum brasilense* Az39 productora de IAA, y como control negativo el sobrenadante obtenido a partir del medio de cultivo sin inocular.

Para llevar a cabo el método colorimétrico se partió de 1 mL del sobrenadante, al cual se le agregó 1 mL del reactivo de Salkowski (cloruro férrico 0.5 M, ácido perclórico 70%) y se incubó 30 min en la oscuridad. Posteriormente, se observó la aparición de una coloración rosada en las muestras positivas y se cuantificó mediante absorbancia a 540 nm, utilizando el control del medio de cultivo como blanco. Paralelamente, se preparó una solución de 100 ppm a partir de un estándar de IAA (Sigma Aldrich CAS 87-51-4), se realizaron diluciones y se construyó una curva de calibración abarcando un rango de concentraciones de 5 a 100 ppm. A partir de la misma se calculó la concentración de auxinas de cada muestra. En caso de que alguna muestra quedara por encima del rango de la curva, se realizó la dilución correspondiente para realizar la interpolación.

Para detectar y cuantificar específicamente la producción de IAA en los sobrenadantes de cultivo de las cepas de *Streptomyces* evaluadas, se optimizó el método por HPLC-UV según Castillo et al. (2005). El análisis se llevó a cabo en un Sistema HPLC Shimadzu Prominence equipado con una columna C18 de fase reversa Phenomenex. El sistema de detección UV visible fue seteado a 280 nm y el flujo de la bomba se fijó en 0,8 mL/min durante toda la separación. Se utilizó una fase móvil de solvente A (0,1% ácido fórmico en agua miliQ) y solvente B (0,1% ácido fórmico en metanol), en una relación 50:50 (isocrático) y a temperatura ambiente. En primer lugar, se realizó la corrida del estándar de IAA de 100 ppm con el objetivo de identificar su tiempo de retención y así poder determinar en qué muestras se encontraba presente la fitohormona. A partir de las diluciones de este estándar se construyó una curva de calibración (5 a 100 ppm), la cual fue utilizada para cuantificar la cantidad de IAA en las muestras positivas. Previo a analizar las muestras, se ajustó el pH de los sobrenadantes a analizar a 2.8 con el objetivo de favorecer la solubilización de ácidos (Castillo et al., 2005). A partir de los mismos, se realizaron extracciones orgánicas con acetato de etilo en relación 1:1 siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (apartado 2.6). Los residuos obtenidos se disolvieron en 1 mL de la fase móvil y se inyectaron al HPLC.

3.2.7.2 Solubilización de fosfatos

Se utilizó el medio *National Botanical Research Institute's phosphate* (NBRIP), el cual utiliza fosfato de calcio como única fuente de fósforo (Nautiyal, 1999; Li et al., 2019). Para una adecuada visualización de los halos se utilizó el colorante azul de bromofenol adicionado al medio de cultivo (Mehta y Nautiyal, 2001). Para llevar a cabo el método, se inocularon en dicha placa, 10 μ L de una suspensión de esporas de cada cepa de *Streptomyces* a evaluar, preparada como se indica en la sección 3.2.2. Se evaluaron cuatro cepas por placa, que se incubaron a 28 °C y se evaluó la presencia de halos de solubilización alrededor de las colonias luego de 14 días (Tamreihao et al., 2016). Adicionalmente, debido a que el fosfato se encuentra en el suelo mayoritariamente bajo la forma de fitatos orgánicos, se realizó la optimización del método sustituyendo el fosfato de calcio por ácido fítico en el medio NBRIP. Las composiciones de los medios se detallan en el Anexo I. Se llevó a cabo el *screening* tal como se mencionó anteriormente. Para informar los resultados se registró tanto el diámetro de los halos como el de la colonia y se calculó el índice diámetro del halo/diámetro de la colonia. En ambos métodos, se utilizó como control positivo una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

3.2.7.3 Producción de sideróforos

Este ensayo se llevó a cabo según el método de Schwyn y Neilands (1987) utilizando el medio de cultivo Chrome Azurol S (CAS) (Anexo I). Debido a que este medio presenta un compuesto (CTAB) que es tóxico para muchas bacterias, entre ellas *Streptomyces* spp., se realizó la optimización del método de forma tal que las cepas bacterianas evaluadas no entren en contacto con dicho compuesto. Para ello, se evaluaron dos metodologías alternativas siguiendo las modificaciones indicadas por Milagres et al. (1999). Ambas metodologías implicaron la preparación del medio CAS por un lado, y por otro el medio de cultivo YME, óptimo para el crecimiento de *Streptomyces*.

En la primera, se prepararon placas de Petri de manera tal que quedaran divididas, conteniendo el medio YME en una mitad y el medio CAS en la otra. Para ello, se prepararon placas de YME y una vez solidificadas, se cortó con bisturí estéril en la mitad de la placa, la cual se retiró y se sustituyó por CAS-agar. La mitad con el medio de cultivo YME se inoculó con 15 μ L de una suspensión de esporas de la cepa de *Streptomyces* a evaluar (sección 3.2.2). En la segunda metodología, las placas de Petri se prepararon a modo de doble capa de agar, colocando primero el medio CAS fundido (15 mL) y una vez solidificado, se cubrió con una capa de medio YME donde posteriormente, se inoculó la gota de la suspensión de esporas de la cepa a evaluar. En ambos casos, luego de que la gota se secó, las placas se incubaron a 30 °C durante 7 días. Transcurrido este tiempo, se observó la presencia de halos de color anaranjado alrededor de las colonias positivas para producción de sideróforos. Para informar los resultados se midió tanto el radio del halo como el de la colonia y se calculó el índice: radio del halo / radio de la colonia.

3.3 Resultados

3.3.1 Optimización de las condiciones del ensayo de actividad nematocida

En este trabajo se logró optimizar un ensayo de evaluación de actividad nematocida a partir de sobrenadantes de cultivo. En cuanto a la conservación de los sobrenadantes previa a su evaluación, se compararon tres condiciones: 4 °C, -20 °C y liofilizados. La conservación a -20 °C resultó inadecuada, ya que al descongelarse se formaron precipitados en las muestras incluso en el control del medio de cultivo SCN. Estos precipitados no se observaron en los sobrenadantes conservados a 4 °C, ni cuando se retomaron los liofilizados en DMSO 2%. La metodología más práctica y conveniente de analizar los sobrenadantes resultó ser la liofilización, debido a que la conservación en el tiempo resulta más estable que a 4 °C. En cuanto a la cantidad de gusanos, la relación 50:50, que implicó aproximadamente 60 gusanos por pocillo, resultó la más adecuada para la cuantificación de motilidad y para la visualización bajo lupa.

Finalmente, se evaluaron los sobrenadantes obtenidos a partir del cultivo de cinco cepas en tres medios diferentes (YME, ISP4 y SCN), incluyendo además los respectivos controles de medio sin inocular. A las 24 hs luego de agregados los sobrenadantes se registraron los resultados obtenidos por visualización en la lupa. En el caso del medio YME se observaron los gusanos muertos en todas las cepas y en el control del medio de cultivo, por lo cual fue descartado. Por el contrario, en los controles de los medios SCN y ISP4 se observaron los gusanos en movimiento y también se registró la producción de larvas. No se observó afectación de los gusanos en ninguna de las cinco cepas evaluadas en los medios ISP4 y SCN. A priori, ambos medios serían adecuados para el *screening* de actividad con todas las cepas, pero se seleccionó el medio SCN para los ensayos posteriores.

3.3.2 Selección de cepas de *Streptomyces* productoras de compuestos con actividad nematocida

Utilizando el método desarrollado se realizó el *pre-screening* de actividad con un mismo lote de gusanos en estadio joven adulto (L4), evaluándose los sobrenadantes de 147 cepas simultáneamente. En la Tabla A1 (Anexo III) se detallan los resultados normalizados del porcentaje de motilidad a las 24 y 48 hs para cada cepa analizada. El porcentaje de motilidad de los gusanos respecto a la motilidad inicial sirvió como una medida de afectación, es decir, a menores valores, mayor actividad nematocida de los sobrenadantes evaluados (Tabla A1, Anexo III).

En el gráfico de la Figura 3.3A, se resumen los resultados obtenidos, discriminando en diferentes categorías según la actividad nematocida cuantificada. Se distinguieron tres niveles de actividad: actividad alta (motilidad menor al 10 %), actividad moderada (motilidad entre 10 y 50 %) y actividad baja o nula (motilidad mayor al 50 %). En primer lugar, se puede decir que el método de *screening* resultó adecuado para discriminar y seleccionar cepas según su actividad. Entre las 143 cepas de *Streptomyces* evaluadas, se identificaron 15 con actividad alta a las 24 hs y 57 a las 48 hs.

En la Figura 3.3B, se muestran algunos ejemplos representativos de los diferentes comportamientos observados. Por ejemplo, en algunos casos los gusanos se vieron afectados a las 24 hs, pero luego no repitieron este fenotipo a las 48 hs, sino que se mantuvieron o incluso se recuperaron (Figura 3.3B; Tabla A1, Anexo III). Este es el caso de la muestra MAI 2234, para la cual la actividad es moderada a las 24 hs, pero luego este fenotipo no continúa en el tiempo (78% de motilidad a las 48 hs). Otro comportamiento diferente es el que se observó para la muestra MAI 2325, cuya actividad es alta a las 48 hs, pero es baja o nula a las 24 hs (80% de motilidad). Por el contrario, los sobrenadantes de las cepas MAI 2228 y MAI 2237 tienen actividad alta a las 24 hs y 48 hs, y la cepa MAI 2213, tiene actividad moderada a las 24 hs que se incrementa a las 48 hs. Solo las cepas con este tipo de respuesta fueron consideradas en la selección.

En cuanto a los controles utilizados, se puede observar que hay cierto grado de afectación de los gusanos en el tiempo (en el buffer, en DMSO 2% y en el control del medio SCN). Por ejemplo, el porcentaje de motilidad de los gusanos se reduce hasta un 83% a las 24 hs y hasta un 59% a las 48 hs; lo cual fue también considerado a la hora de establecer el criterio para la selección de las cepas.

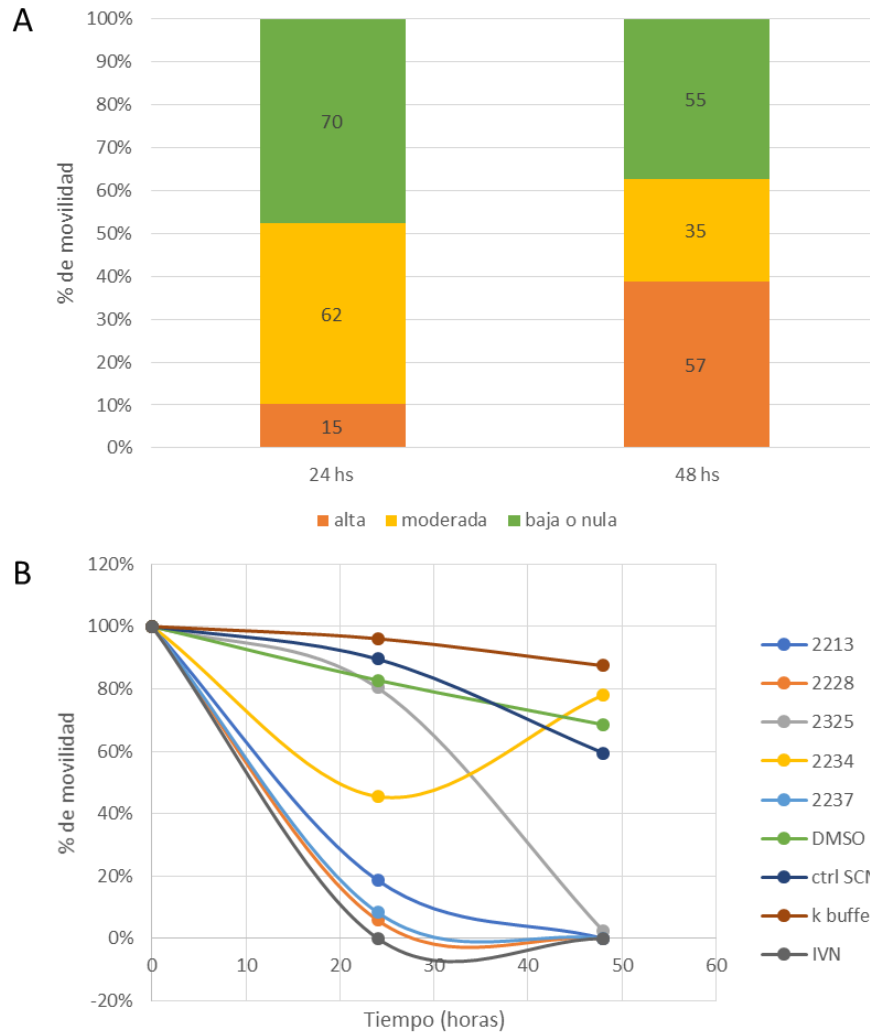


Figura 3.3. Resultados de actividad nematocida registrada a 0, 24 y 48 hs (datos normalizados al 100% del valor inicial). (A) Gráfico de barras que indica la proporción de cepas y su porcentaje de motilidad a las 24 y 48 hs. Los colores indican el nivel de actividad como se indica en la leyenda. (B) Gráfico de motilidad de los gusanos en el tiempo con cepas representativas y los controles según se indica.

Además de estos resultados de motilidad, se tuvo en cuenta la observación bajo lupa y se integraron los resultados de ambos métodos (Figura 3.4). En este caso, el criterio utilizado fue la observación de poco o nulo movimiento de los gusanos (parálisis) y la ausencia de larvas (afectación en la reproducción). En todos los casos, en las muestras en las que se observó muy poco o nada de movimiento de los gusanos adultos, tampoco se observaron larvas (Figura 3.4B). Como es de esperar, se observó una buena correlación entre los datos de motilidad registrados y lo observado bajo lupa. En base a estos resultados, se seleccionaron 43 cepas con actividad nematicida frente a *C. elegans* para repetir nuevamente el *screening* (se indican en rojo en la Tabla A1, Anexo III).

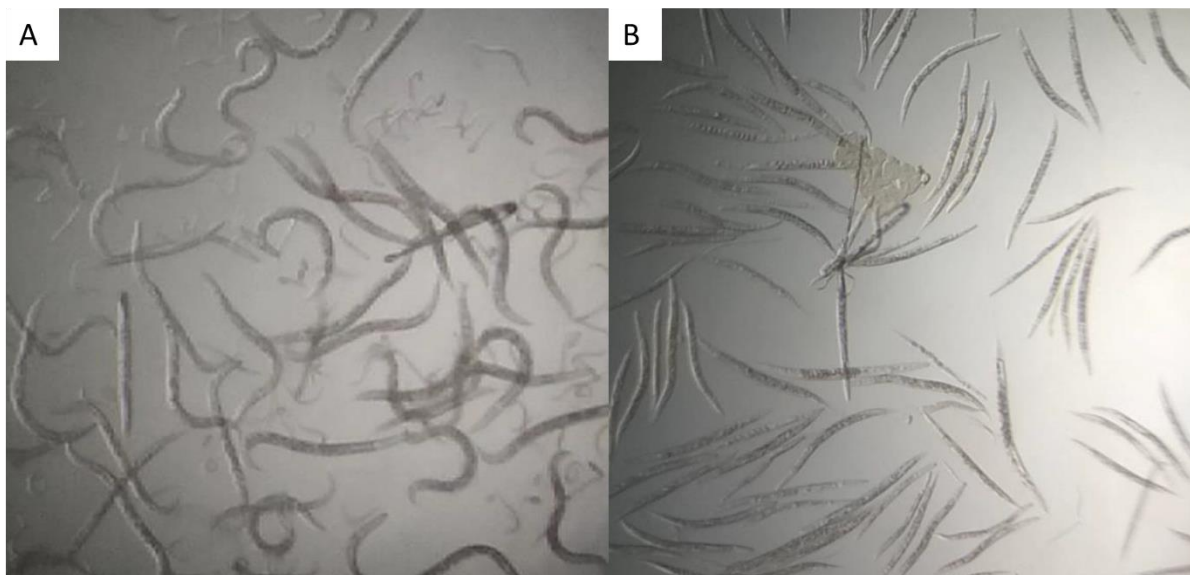


Figura 3.4. Fotos obtenidas de la visualización bajo lupa (75x) de los sobrenadantes de *Streptomyces* luego de 24 hs de incubación con *C. elegans*. Como ejemplo, se observa en (A) una muestra con gusanos no afectados, donde tanto los gusanos adultos como las larvas están en movimiento, y en (B), una muestra donde los gusanos adultos están paralizados y no hay larvas.

En los gráficos de la Figura 3.5, se indica el porcentaje de motilidad de los gusanos a lo largo del tiempo, y se observa su disminución para la mayoría de las cepas. En este caso, el valor inicial fue tomado luego de 2 hs de agregado el sobrenadante y fue considerado el 100% de la motilidad. Se puede observar que a partir de los 600 minutos comienza a verse una

disminución importante de la motilidad de los gusanos para algunas cepas. En algunas cepas se registró una parálisis total a partir de los 900 min aproximadamente (Figura 3.5). Estos resultados fueron verificados en la observación bajo lupa realizada a las 24 y 48 hs. Esta vez, se seleccionaron las cepas con mayor actividad nematocida, considerando como criterio las que presentaron actividad alta (valores menores al 10%) a las 18 hs (Figura 3.5B). Además, estas cepas seleccionadas tampoco produjeron larvas de acuerdo con lo observado bajo lupa. Este ensayo permitió seleccionar un total de 17 cepas con alta actividad nematocida a nivel de sus sobrenadantes de cultivo.

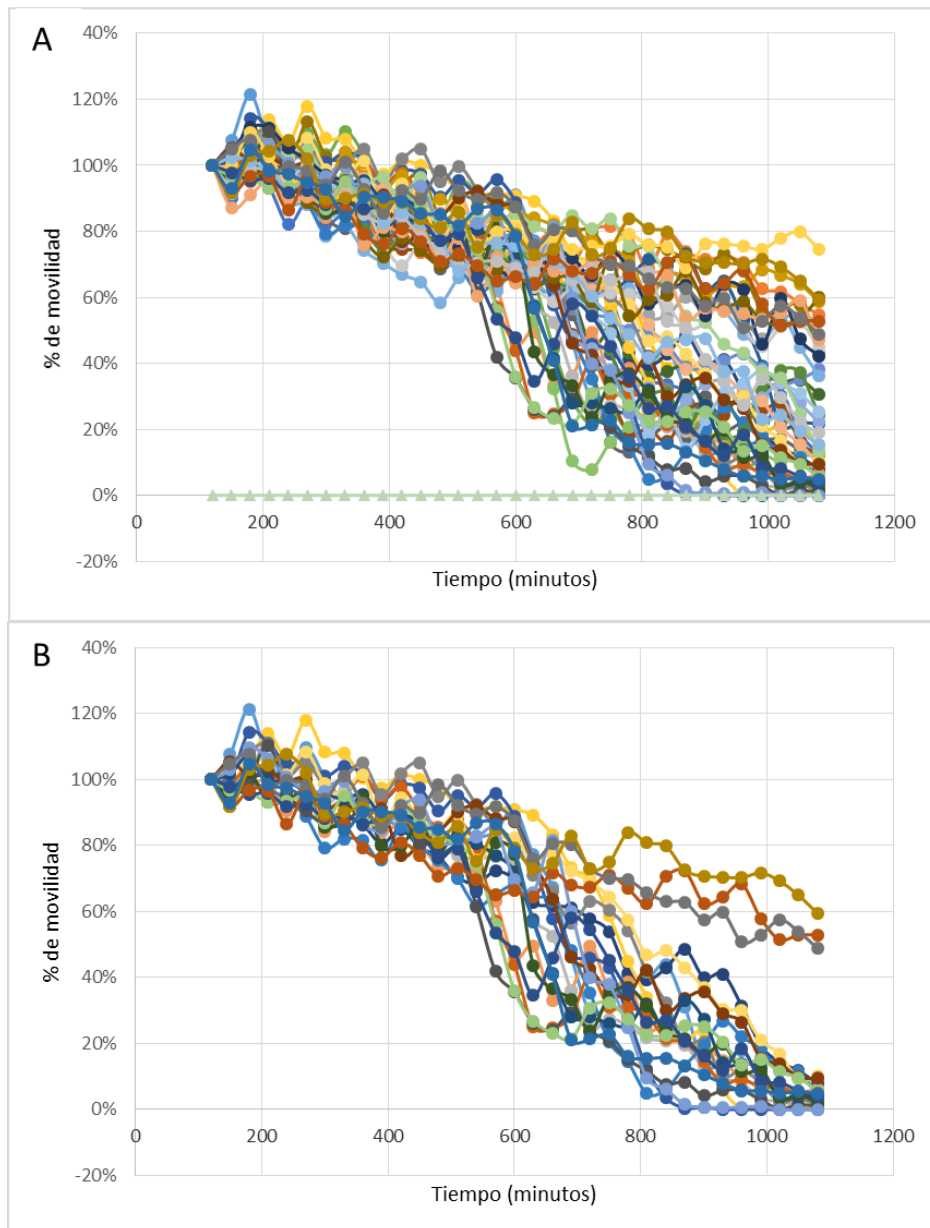


Figura 3.5 (página anterior). Gráficos de los resultados de motilidad (*Wmicrotracker*) de *C. elegans* obtenidos para el ensayo de evaluación de actividad nematocida de sobrenadantes de cultivo de cepas de *Streptomyces*. En (A) se muestran las curvas obtenidas para las 43 cepas evaluadas y en (B) se muestran únicamente las cepas que fueron seleccionadas para posteriores estudios (17). Las curvas mostaza, naranja y gris corresponden a los controles (buffer, medio SCN y DMSO 2%; respectivamente) y la verde en (A) el control positivo (IVN, 5 μ M).

3.3.3 Actividad nematocida en extractos acuosos y orgánicos de las cepas seleccionadas

Posteriormente, la actividad nematocida también se evaluó sobre los extractos acuosos y orgánicos obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivos de las 17 cepas de *Streptomyces* seleccionadas (Tabla 3.1). Al observar los resultados obtenidos bajo lupa a las 24 hs, se determinó afectación de los gusanos (inmóviles y sin larvas) en los extractos acuosos y/o orgánicos según se detalla en la Tabla 3.1. En el caso de los extractos orgánicos las cepas que mostraron actividad a las 24 hs fueron: MAI 2213, MAI 2237, MAI 2274, MAI 2300 y MAI 2311. A las 48 hs todos los extractos presentaron actividad, sin embargo, la actividad a las 24 hs resultó más informativa para la selección de cepas.

Tabla 3.1. Resultados de actividad nematocida (observación a la lupa) en los extractos acuosos y orgánicos de las 17 cepas seleccionadas.

Cepa MAI	En fase acuosa	En fase orgánica
2213	(+)	(+)
2222	(-)	(-)
2235	(+)	(-)
2237	(-)	(+)
2238	(+)	(-)
2245	nd	(-)
2246	(-)	(-)
2248	nd	(-)
2256	(+)	(-)
2274	(-)	(+)
2300	(-)	(+)
2303	(+)	(-)
2305	(+)	(-)
2311	(+)	(+)
2312	(+)	(-)
2340	(-)	(-)
2345	(-)	(-)

(+) Actividad a las 24 hs, (-) sin actividad

nd: no determinado

Las cinco cepas que mostraron actividad a nivel de los extractos orgánicos fueron seleccionadas para continuar profundizando en los compuestos responsables de esta actividad. Los extractos orgánicos obtenidos a partir del cultivo de estas 5 cepas en otros medios de cultivo (SFM, TSB y OBB; composición en Anexo I) fueron evaluados en el marco

del estudio metabolómico realizado en el capítulo 4. Los resultados de este ensayo fueron evaluados a las 24 hs de manera visual utilizando la lupa. Tanto los controles realizados con el buffer de suspensión de los gusanos como la solución de DMSO utilizada para resuspender las muestras no mostraron afectación en los gusanos. Casi todas las muestras dieron actividad nematocida en estas condiciones, la cual fue categorizada según el porcentaje de gusanos y/o larvas muertas según se indica en la Tabla 3.2. No fue posible determinar la actividad nematocida de los extractos obtenidos a partir de los cultivos del medio TSB, ya que todas las muestras incluido el control, presentaron precipitados (P) que afectaron de forma inespecífica la viabilidad de los nematodos. Como resultado de este ensayo, se observó que las 5 cepas mostraron actividad nematocida en al menos uno de los dos medios de cultivo evaluados SFM y/o OBB. Estas muestras fueron seleccionadas para la búsqueda de compuestos nematocidas en el capítulo 4.

Tabla 3.2. Resultados de actividad nematocida (observación a la lupa) en los extractos orgánicos de las 5 cepas seleccionadas en 3 medios de cultivo.

	controles	MAI 2213	MAI 2237	MAI 2274	MAI 2300	MAI 2311
SFM	-	+	++	++	+	-
TSB	P	P	P	P	P	P
OBB	-	++	++	+	+	++

P: precipitados, +: más del 50 % de los gusanos muertos, ++: todos los gusanos y sus larvas muertas, -: no hay afectación.

Particularmente, las muestras de la cepa MAI 2213 en medio OBB y MAI 2274 en SFM, presentaron una actividad muy notoria, observándose un fenotipo tipo “quemado” de los gusanos (Figura 3.6). Dichos gusanos fueron transferidos a una placa de NGM con *E. coli* como alimento e incubadas a 20°C durante 24 hs y se comprobó que estaban muertos.

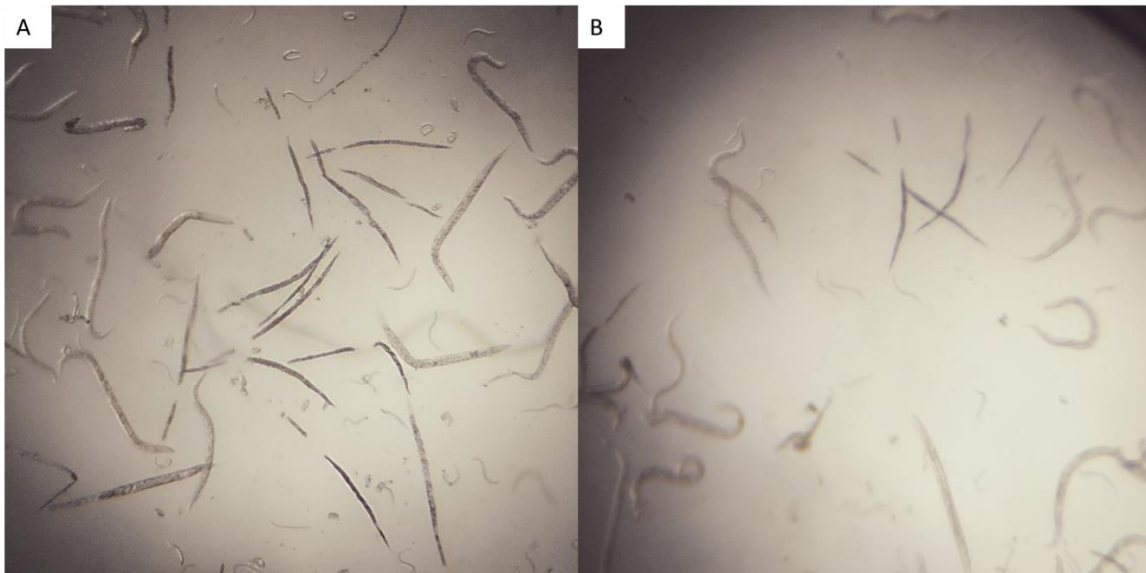


Figura 3.6. Foto de los gusanos luego de 24 hs con el extracto de la cepa MAI 2213 en OBB (A) y MAI 2274 en SFM (B).

3.3.4 Identificación molecular de las cepas de *Streptomyces* seleccionadas con actividad nematocida

En primer lugar, se verificó la presencia del gen *rpoB* para todas las cepas obteniéndose la banda del tamaño esperado (994 pb) y se enviaron a secuenciar a Macrogen (Corea). Con las secuencias obtenidas y editadas, se realizó el alineamiento correspondiente analizándose una secuencia parcial de 540 pb. Se realizó un análisis filogenético basado en la comparación de secuencias parciales del gen *rpoB* con el objetivo de avanzar en la identificación de las 17 cepas de *Streptomyces* seleccionadas en base a su actividad nematocida. Las cepas MAI 2238 y MAI 2305 no se incluyeron en el árbol ya que las secuencias obtenidas fueron de mala calidad. En el análisis se incluyeron 1889 secuencias de cepas de actinomicetos de la base de datos BIGS MLST database. Debido a las dimensiones del árbol generado, se construyó un árbol incluyendo únicamente las cepas más relacionadas filogenéticamente a las seleccionadas en este trabajo (Figura 3.7). Como se puede deducir a partir del árbol, hay gran diversidad de especies entre las cepas seleccionadas. Además, especies distintas se agrupan en un mismo *cluster*, por lo que no es

posible confirmar la identificación a nivel de especie de las cepas utilizando únicamente esta herramienta. Sin embargo, todas las cepas de la base de datos relacionadas con las nuestras pertenecen al género *Streptomyces*, por lo que podemos decir que esta herramienta nos permitió confirmar el género e identificar la o las especies más cercanas.

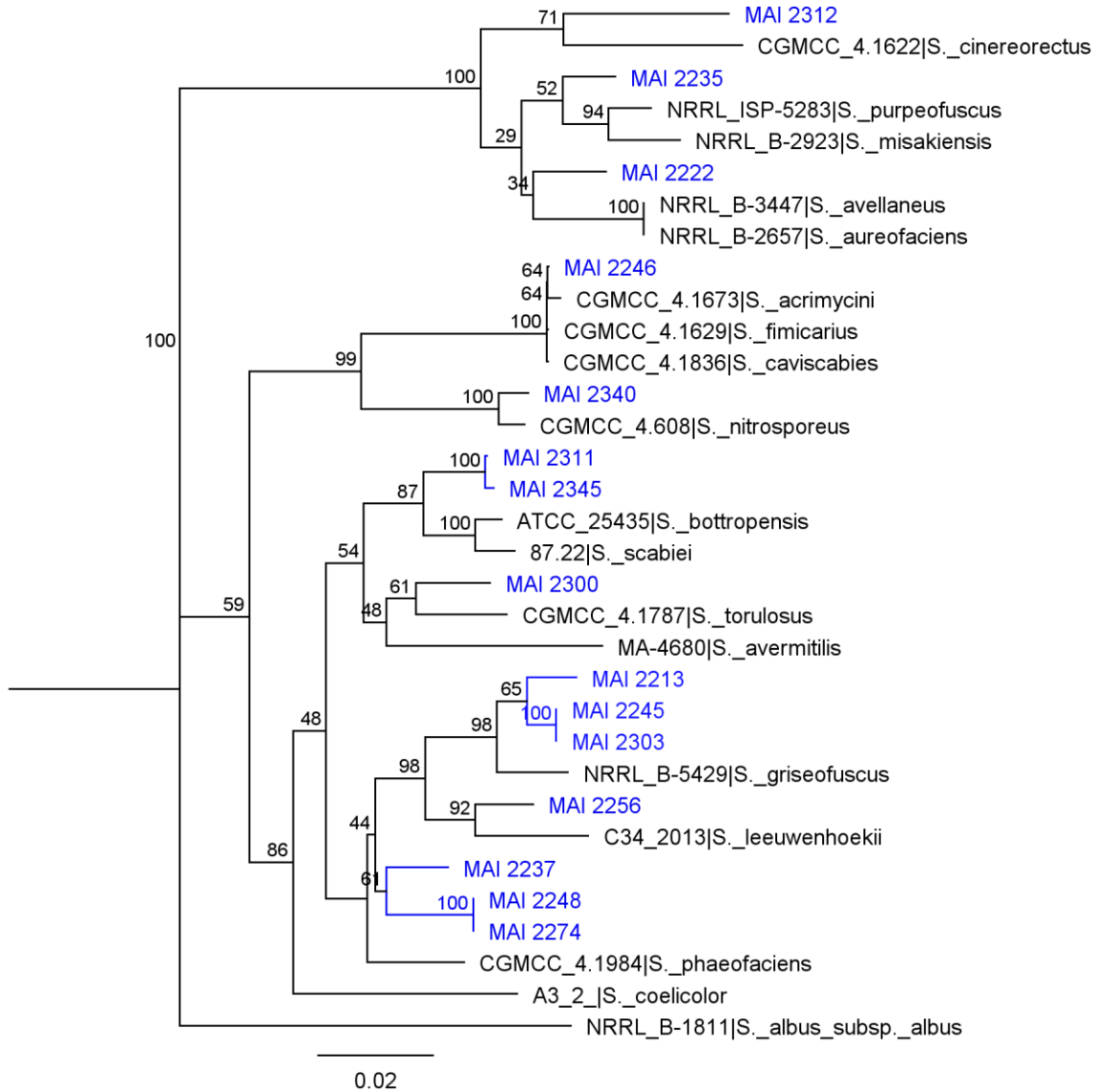


Figura 3.7. Árbol filogenético de una secuencia parcial del gen *rpoB* realizado mediante *Neighbour joining* utilizando 1000 *bootstraps*. Se muestran las cepas seleccionadas con actividad nematocida en azul y las cepas de referencia más relacionadas obtenidas de la base de datos de MLST.

3.3.5 Screening de propiedades directas de PCV en cepas de *Streptomyces* seleccionadas

Los resultados obtenidos en cuanto a las propiedades PCV evaluadas en este trabajo, se encuentran resumidos en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Resumen de resultados de actividad de promoción de crecimiento vegetal con las 25 cepas de *Streptomyces* seleccionadas en base a su actividad nematocida, antibacteriana y antifúngica.

Cepa	[Auxinas] (ppm)	[IAA] (ppm)	Solubilización de P inorgánico ^a	Solubilización de P orgánico ^a	Producción de sideróforos ^b
MAI 2201	8,5	-	4,5	-	4,5
MAI 2208	-	-	3,7	3,7	4,3
MAI 2209	-	-	-	2,7	3,9
MAI 2212	nd	nd	-	-	3,3
MAI 2213	-	-	1,1	1,4	3,9
MAI 2222	22,4	12,4	3,1	2	3,5
MAI 2225	21,3	-	-	-	4,6
MAI 2226	6,9	5,8	-	-	4
MAI 2231	10,4	-	1,1	-	4,7
MAI 2237	38,9	-	-	1,1	4,9
MAI 2238	42,8	5,3	1,4	1,7	-
MAI 2245	nd	-	1,3	1,1	3,9
MAI 2254	-	-	-	nd	nd
MAI 2256	44,3	41,7	1,2	1,2	-
MAI 2260	-	-	1,7	-	4,5
MAI 2270	16,6	-	1,3	1,2	3,2
MAI 2274	nd	nd	-	-	4,2

nd: no determinado

MAI 2283	-	5,8	-	-	4,3
MAI 2293	-	-	-	-	4
MAI 2300	nd	-	-	1,5	4,6
MAI 2311	49,4	6,8	0,8	1,6	3,2
MAI 2327	36,7	7,8	2,3	1,1	3,8
MAI 2331	-	-	-	nd	nd
MAI 2345	31,1	-	-	nd	nd

-: menor al límite de detección

^a índice diámetro del halo/diámetro de la colonia

^b índice radio del halo/radio de la colonia

En cuanto a la producción de fitohormonas, se analizaron y compararon los resultados de ambas metodologías: la concentración de auxinas por el método colorimétrico y la concentración de IAA mediante HPLC-UV. En ambos casos, se construyó una curva de calibración, donde el rango lineal quedó definido por el mejor ajuste de la curva ($r^2 > 0.99$), siendo 5-60 ppm para el método colorimétrico y 5-100 ppm en el método cromatográfico. El límite de cuantificación quedó definido en ambos casos por el punto inferior de la curva, siendo de 5 ppm en ambos casos (Figura 3.8). A partir de las curvas de calibración obtenidas se calculó la concentración de fitohormonas, expresada como concentración de auxinas para el método colorimétrico y concentración de IAA para el método analítico.

Por el método colorimétrico, se observó la aparición de color rosado en varias cepas. Particularmente, se identificaron 12 cepas capaces de producir auxinas en concentraciones que van de 6,9 a 49,4 ppm (Tabla 3.3). Por su parte, se optimizó el método cromatográfico basado en HPLC-UV, donde el pico de IAA del estándar de 100 ppm tuvo un tiempo de retención de 6,0 min (Figura 3.9A). Para la identificación de los picos se tomó como criterio aquellas muestras donde se observó un pico en un tiempo de retención de 6,0 +/- 0,1 min. En la Figura 3.9 se muestra el cromatograma obtenido a partir de la corrida del estándar de IAA, el control positivo (*A. brasiliensis* Az39) y una cepa cuyo resultado fue positivo a modo de ejemplo (MAI 2256). Este método permitió la detección y cuantificación de IAA en 7 cepas. Las concentraciones de IAA en los sobrenadantes de estas cepas fueron de 5,3 a 41,7

ppm, siendo la cepa de mayor concentración de IAA la MAI 2256. Como referencia, el control positivo de la cepa de referencia de *A. brasilense* utilizada dió un valor de 20 ppm.

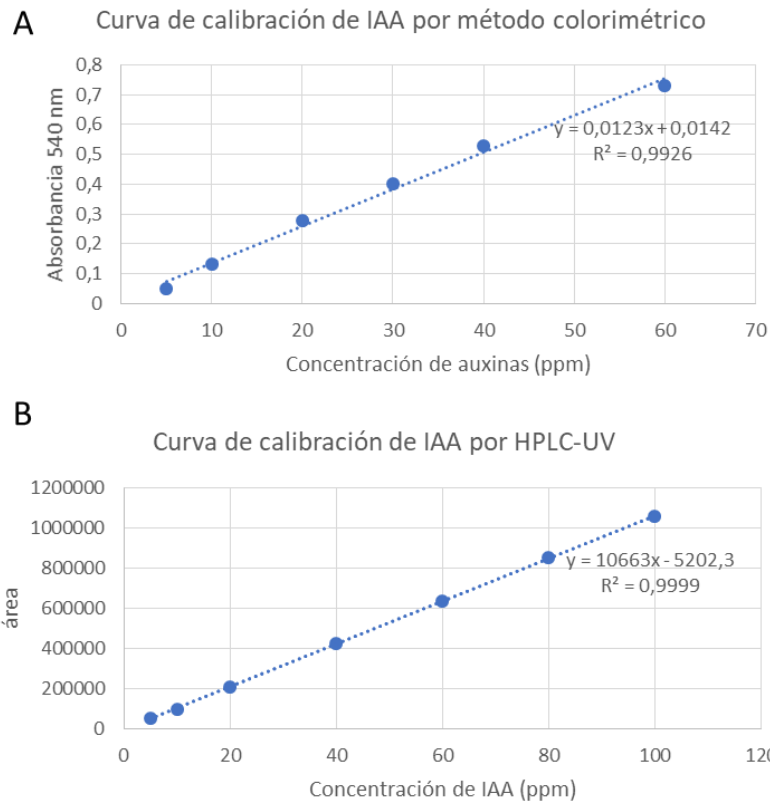


Figura 3.8. Curvas de calibración para la detección de auxinas y IAA. (A) Método colorimétrico a partir del reactivo de Salkowski. (B) Método analítico mediante HPLC-UV.

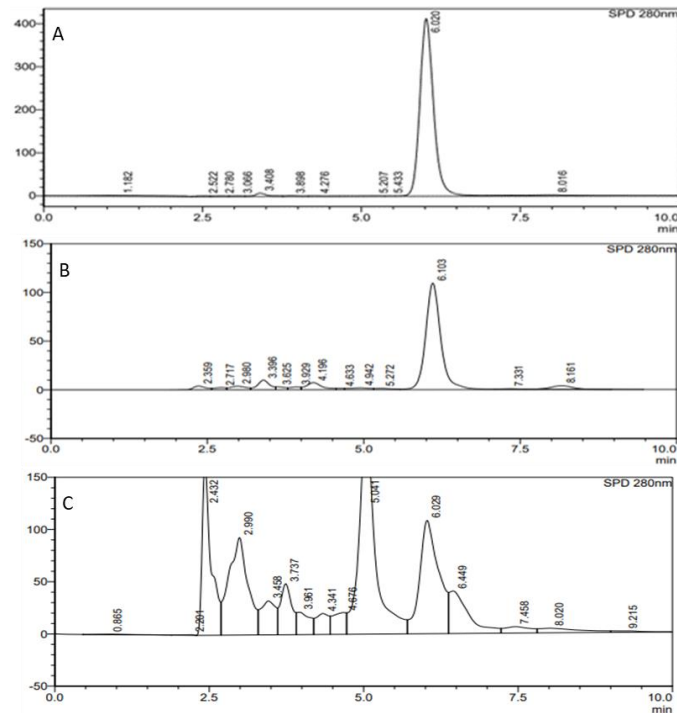


Figura 3.9. Cromatograma de intensidad vs. tiempo obtenido a partir del método de detección de ácido indolacético por HPLC-UV (280nm) optimizado en este trabajo. (A) Estándar de IAA 100 ppm, (B) Control positivo, dilución al décimo (*Azospirillum brasilense* Az39), y (C) *Streptomyces* MAI 2256.

Por otra parte, se optimizó un método para evaluar la solubilización de fósforo tanto orgánico como inorgánico a partir de las cepas de *Streptomyces* de la colección. Dicho método permitió la detección de halos alrededor de las colonias de las cepas capaces de solubilizar el fósforo inorgánico (como fosfato de calcio) y orgánico (como ácido fítico) como única fuente de fósforo en el medio de cultivo. Los halos de solubilización se observaron a partir de los 6 días de incubación, pero se dejaron hasta los 11 días, tiempo en el cual se registraron los resultados. Se detectaron 12 cepas capaces de solubilizar fósforo inorgánico y también 12 cepas capaces de solubilizar fósforo orgánico, las cuales no necesariamente coincidieron (Figura 3.10, Tabla 3.3). Las cepas que presentaron los mayores halos de solubilización y con ambas fuentes de fósforo fueron MAI 2208 y MAI 2222.

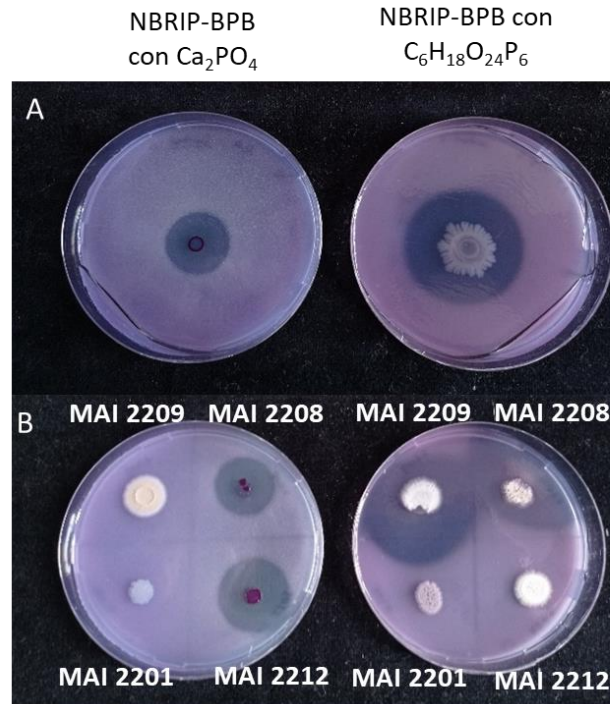


Figura 3.10. Ensayo de solubilización de fosfato inorgánico (Ca_2PO_4) y orgánico ($\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$). (A) Control positivo *Pseudomonas aeruginosa*, (B) Cuatro cepas de *Streptomyces* utilizadas como ejemplo: MAI 2209, MAI 2208, MAI 2201 y MAI 2212.

En cuanto a la optimización de las metodologías para evaluar la producción de sideróforos, se eligió el método donde se colocó mitad YME y mitad CAS-agar en la placa de Petri, ya que los resultados se visualizaron mejor que en el método de la doble capa de agar, puesto que el color del medio quedó muy oscuro. Como era de esperar, se comprobó que el medio CAS-agar efectivamente inhibe el crecimiento de las cepas de *Streptomyces* ya que, al sembrar el inóculo en el medio de la placa de Petri, la colonia solo crecía en la mitad conteniendo el medio YME. Por este motivo, para llevar a cabo el *screening* con las 25 cepas, la gota se sembró en la región de la placa conteniendo el medio YME (a unos 2 cm del borde). La propiedad de producción de sideróforos fue evaluada mediante observación de un medio halo anaranjado sobre el medio CAS a los 7 días de incubación. Esta propiedad fue detectada en casi todas las cepas analizadas, contándose un total de 19 cepas productoras de sideróforos (Figura 3.11, Tabla 3.3).

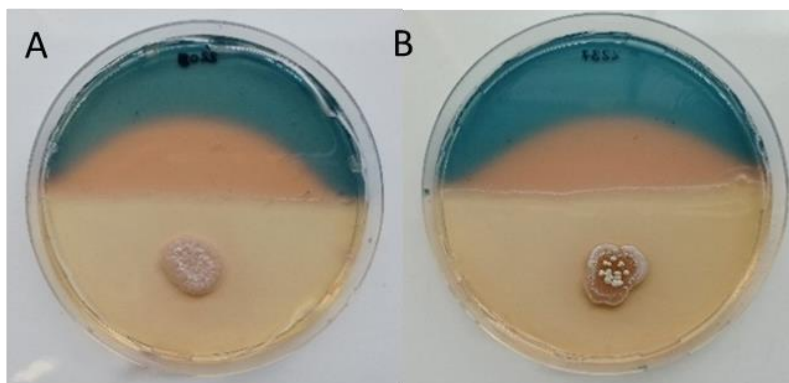


Figura 3.11. Ensayo de producción de sideróforos utilizando el medio CAS en media placa y YME en la otra mitad sobre la cual se inoculó la cepa de *Streptomyces* a evaluar. Se muestran, a modo de ejemplo, los resultados a los 7 días de incubación de las cepas MAI 2208 (A) y MAI 2237 (B).

3.4 Discusión

Varios trabajos realizados en actinobacterias filamentosas han reportado y evidenciado su reconocida habilidad para producir compuestos bioactivos (Kaur et al., 2016; Tamreihao et al., 2016; Sathya et al., 2017; Dede et al., 2020). Las actividades biológicas estudiadas varían ampliamente dependiendo del campo en estudio, desde el área salud humana, hasta aplicaciones en la agricultura e industria. Los resultados de este trabajo, donde un total de 147 cepas de actinobacterias filamentosas fueron evaluadas en cuanto a su actividad nematocida y 25 en cuanto a su actividad de promoción de crecimiento vegetal, son un fiel reflejo del reconocido potencial de estos microorganismos, debido a la alta proporción de cepas que mostraron resultados positivos. Las actividades evaluadas en este trabajo fueron seleccionados en base a que las cepas de nuestra colección fueron aisladas de suelo y tubérculos de papa, donde comparten nicho ecológico con otros organismos; entre ellos, nemátodos que pueden ser capaces de parasitar las plantas y las propias plantas, a las cuales podrían favorecer su crecimiento.

La actividad nematocida ha sido relativamente poco explorada en relación con otras, como por ejemplo la actividad antimicrobiana. El ejemplo de las avermectinas como fármacos antiparasitarios ampliamente reconocidos, que revolucionaron en su momento a la industria farmacéutica ofreciendo una solución al tratamiento de muchas infecciones parasitarias, nos entusiasmó a evaluar esta actividad con nuestra colección de cepas. El ensayo con *C. elegans* utilizado en este trabajo resultó adecuado y rápido para el *screening* de una gran cantidad de cepas. Una de las principales ventajas del uso de *C. elegans* como organismo modelo es que su ciclo de vida puede ser completado en el laboratorio en tres días, obteniéndose grandes cantidades de gusanos en poco tiempo. El ensayo realizado en este trabajo fue optimizado y evaluado por primera vez utilizando sobrenadantes y extractos provenientes de cultivos de microorganismos, y podrá ser utilizado en futuros estudios. Se evaluaron varios medios de cultivo seleccionados en base a bibliografía. Por ejemplo, está reportado que el almidón de maíz y el extracto de levadura afectan la producción de avermectina B1a (Chen et al., 2016), un posible metabolito responsable de

la actividad. Durante la optimización de este ensayo, finalmente se seleccionó el medio SCN, el cual contiene almidón como principal fuente de carbono y no contiene extracto de levadura. Los medios de cultivo SCN e ISP4 son similares, los dos tienen almidón como fuente principal de carbono y se diferencian en las sales. Sin embargo, en nuestro laboratorio fue más accesible usar el SCN.

Se obtuvo una alta proporción de cepas que mostraron cierto grado de actividad nematocida a nivel de sobrenadantes (29%). Sin embargo, se tomaron ciertos criterios para seleccionar aquellas cepas más promisorias, debido a la necesidad de acotar la búsqueda de los compuestos responsables de la actividad. Uno de ellos fue que la afectación de la motilidad de los gusanos (parálisis) sea rápida y sostenida en el tiempo y que además esté afectada la producción de larvas. La parálisis total de los gusanos observada en varias cepas coincide con el efecto que provocan algunos fármacos antihelmínticos conocidos, e implica que existen compuestos producidos por estos microorganismos que causan este efecto. Este resultado puede significar la presencia de fármacos antihelmínticos de las clases ya conocidas, como por ejemplo las avermectinas, o bien la presencia de nuevos compuestos antihelmínticos. La evaluación de actividad en extractos acuosos y orgánicos fue utilizada como estrategia para acotar la naturaleza de los compuestos responsables de la actividad. Las extracciones fueron realizadas utilizando acetato de etilo como solvente en base a lo reportado en otros trabajos, y además resulta un solvente adecuado debido a su bajo riesgo y costo en comparación con otros. Como se puede determinar de los resultados, en dos cepas hubo actividad en los dos extractos, lo que puede deberse a varias causas: una de ellas es la co-extracción del mismo compuesto en las dos fases o que, posiblemente la actividad sea debida a la sinergia de más de un compuesto. El hecho de que algunas cepas no presentaran actividad en este ensayo, pero sí en el *screening* anterior puede deberse a variables durante la extracción. Estos resultados llevaron a plantear hipótesis acerca de los compuestos responsables de tal actividad que será abordada en el Capítulo 4.

También se obtuvieron las relaciones filogenéticas mediante la amplificación y secuenciación del gen *rpoB* de las 17 cepas con actividad nematocida. Los resultados permitieron relacionar las cepas de la colección con algunas cepas de referencia. Las cepas que presentaron esta actividad no corresponden a la misma especie, es decir, no existe un nexo taxonómico con la actividad. Esto implica que los *clusters* genéticos responsables pueden estar presentes en cualquiera de las especies, y pueden transferirse entre cepas mediante transferencia horizontal de genes. La cepa de *S. avermitilis*, reportada como especie productora de avermectinas y por tanto relacionada con actividad nematocida, no se encuentra emparentada filogenéticamente a ninguna de las cepas seleccionadas. Por otro lado, no se encontraron reportes de actividad nematocida en ninguna de las cepas más relacionadas filogenéticamente. Este resultado abre la puerta a la hipótesis de la existencia de otros metabolitos con actividad nematocida, diferentes a las reconocidas avermectinas y producidos por otras especies de *Streptomyces*.

Sería relevante y se plantea como perspectiva de este trabajo testear las cepas seleccionadas frente a otros parásitos nemátodos; como por ejemplo *M. incógnita*, responsable de la pudrición de las raíces de varios cultivos (por ejemplo, tomate), y *Haemonchus spp.* responsable de varias infecciones parasitarias en ganado. Las especies de *Meloidogyne* causan severos daños en una amplia variedad de cultivos agrícolas de importancia económica, representando más del 10% de las pérdidas mundiales en la producción agraria (Kaur et al., 2016).

Las cepas del género *Streptomyces* son realmente prospectivas para su uso como co-inoculantes de plantas. Una mejor simbiosis planta-microbio podría conducir a una mayor producción sostenible de productos agrícolas. Esta promesa se basa principalmente en el uso de microorganismos ecológicos que controlan plagas y mejoran el crecimiento de las plantas. Dado que los actinomicetos son más fáciles de aplicar en comparación con otros grupos bacterianos debido a sus esporas, su uso en agricultura puede ser muy ventajoso a la hora de pensar en un bioinsumo agrícola. Por eso, los actinomicetos también se prueban con rasgos que promueven el crecimiento de las plantas (Dede et al., 2020). Además, el

hecho de ser habitantes del suelo, compartir hábitat con las plantas y ser buenas competidoras frente a otros microorganismos (incluidos patógenos) los vuelve excelentes candidatos.

En este trabajo se utilizaron métodos *in vitro* de promoción de crecimiento vegetal (particularmente la producción de fitohormonas, la solubilización de fósforo y la producción de sideróforos). En primer lugar, los ensayos mencionados fueron optimizados en nuestro laboratorio, dejándose disponibles para futuros estudios. Los resultados obtenidos constituyen una primera exploración sobre una gran colección de cepas, permitiendo seleccionar aquellas más promisorias. Particularmente, las cepas MAI 2208, MAI 2213, MAI 2222, MAI 2237, MAI 2238, MAI 2256, MAI 2274, MAI 2300, MAI 2311 y MAI 2327, han sido seleccionadas para futuros estudios, entre los que se encuentra la secuenciación genómica. Cinco de estas cepas fueron secuenciadas en el marco de esta tesis y el análisis de estos genomas se aborda en el capítulo siguiente. Actualmente se está realizando la secuenciación de las restantes para luego explorar los BGCs correspondientes utilizando herramientas bioinformáticas.

Además, como perspectiva de este trabajo se realizará la evaluación *in planta* de la promoción de crecimiento vegetal, en principio sobre tomate, pero también se evaluarán otros cultivos. Otra perspectiva de esta tesis, y en concordancia con el origen del aislamiento de las cepas, es utilizar las cepas seleccionadas para evaluar su comportamiento en el cultivo de papa, en particular frente a la propia sarna común causada por especies de *Streptomyces* patógenas. En un trabajo donde se evalúa la actividad antimicrobiana de *Streptomyces* versus *Streptomyces* patógenas de papa, se encontró una cepa (PBSH9) que suprimió significativamente la sarna común de la papa, incluso mejor que el producto comercial estreptomicina, y también promovió la emergencia y el aumento del rendimiento de la papa (Zhang et al., 2020). Los mecanismos implicados en la PCV son investigados en el capítulo siguiente.

Los resultados de este capítulo resaltan la importancia de continuar investigando en este tema, especialmente con actinomicetos, que hasta ahora han sido poco utilizados como inoculantes para mejorar la producción agrícola a pesar de su excelente potencial reportado (Vurukonda et al., 2018).

CAPÍTULO 4
ESTUDIO METABOLOGENÓMICO DE UNA
SELECCIÓN DE CEPAS DE *STREPTOMYCES* SPP.
BIOACTIVAS

4.1 Introducción

Los productos naturales microbianos son codificados en *clusters* de genes biosintéticos (BGCs) que están involucrados en la producción de familias de metabolitos relacionados químicamente. Si bien los avances en genómica comparativa han promovido la explotación de enormes cantidades de datos y el descubrimiento de BGCs desconocidos, el estudio de BGCs novedosos y la elucidación de la biosíntesis de metabolitos huérfanos sigue siendo un desafío (Undabarrena et al., 2021). Los conjuntos de datos genómicos y químicos son los dos mayores pilares para el descubrimiento de nuevos compuestos microbianos en la era ómica. El nexo entre los resultados de la minería genómica y el metaboloma para acelerar el descubrimiento de productos naturales se ha mostrado muy prometedor durante la última década, ya que han surgido varias herramientas que contribuyen a cerrar la brecha entre los BGCs y los espectros de masas (Soldatou et al., 2019, 2021).

4.1.1 Minería de genomas

Se han desarrollado recientemente varias herramientas que detectan los BGCs a partir de la secuencia de ADN, incluidos antiSMASH (Blin et al., 2021), DeepBGC (Hannigan et al., 2019), RiPPMiner (Agrawal et al., 2017) y PRISMA 4 (Skinnider et al., 2020). La plataforma antiSMASH (*antibiotics and secondary metabolite analysis Shell*), es la más utilizada e identifica BGCs en genomas bacterianos mediante un sistema basado en reglas que buscan combinaciones específicas de dominios enzimáticos, los cuales son detectados usando el perfil de modelos de Markov ocultos (*Hidden Markov Models [pHMMs]*) y que están codificados en el mismo entorno genómico. Actualmente contiene reglas para la detección de 52 diferentes clases de BGCs que han sido sometidas a una muy cuidadosa curación manual (Blin et al., 2019).

En las últimas décadas, muchos BGCs se han relacionado experimentalmente con productos naturales específicos con estructuras químicas caracterizadas (lo que se conoce como conocidos/conocidos, o *knowns/knowns*). Para permitir un acceso eficiente a este

conocimiento, se introdujo un estándar comunitario: la información mínima para definir un grupo de genes biosintéticos (MIBiG, *Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*) (Medema et al., 2015). Este estándar cubre una variedad de metadatos, incluidas las coordenadas genómicas del BGC, la estructura química de su(s) producto(s), y también las funciones de las enzimas codificadas en el grupo. También se proporcionan enlaces cruzados con el Atlas de Productos Naturales (NPAtlas), una base de datos de estructuras de productos naturales microbianos (Van Santen et al., 2019; van Santen et al., 2022), y con la base de datos de GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) (Wang et al., 2016; Aron et al., 2020) que almacena datos metabolómicos.

Una nueva herramienta que se ha formalizado recientemente es BiG-SCAPE (Navarro-Muñoz et al., 2020) (Figura 4.1). La misma toma como entrada BGCs directamente de antiSMASH y MIBiG, y usa combinaciones optimizadas de varias métricas para agrupar BGCs en múltiples niveles. Específicamente, incluye métricas para el grado en que los dominios de proteínas se comparten entre un par de BGC, la conservación de sintenia y la identidad de la secuencia de aminoácidos. Las redes de similitud de secuencias tienen como gran ventaja que facilitan el mapeo sistemático de las relaciones entre miles de BGC a la vez y los agrupan en familias de grupos de genes (GCF): conjuntos de BGC con un contenido de genes similar, que codifican la producción de moléculas idénticas o muy similares (van der Hooft et al., 2020). La visualización de la red interactiva resultante hace posible identificar instantáneamente GCF con miembros conocidos de MIBiG, lo que puede llevar a la identificación de BGC para nuevos congéneros, o GCFs sin BGCs de referencia de MIBiG, que pueden representar vías biosintéticas que son nuevas o que han pasado desapercibidas (Figura 4.1).

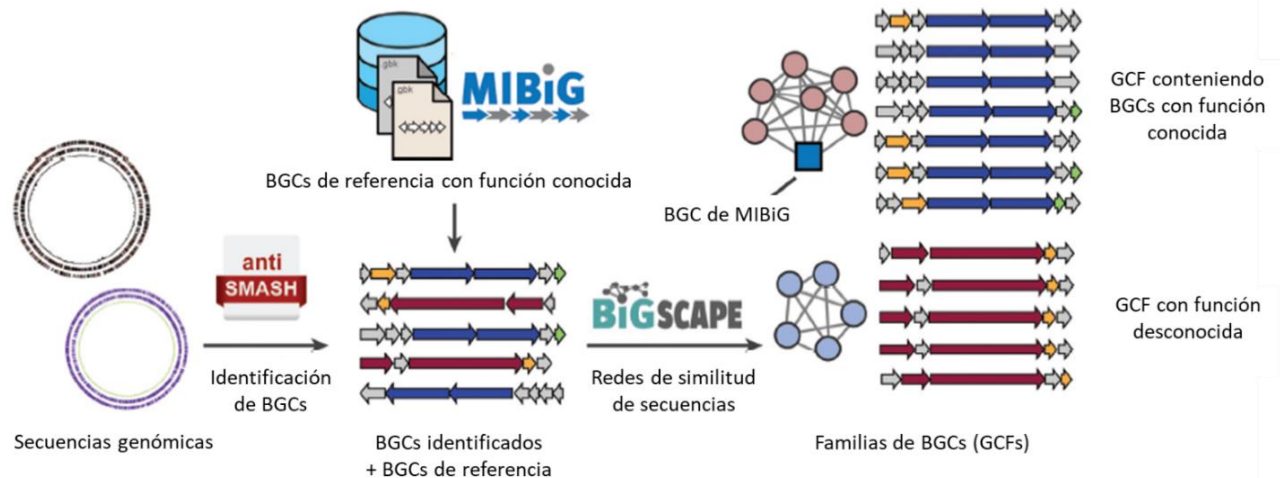


Figura 4.1. Enfoques computacionales para la minería de genomas. Los grupos de genes biosintéticos (BGCs) se pueden identificar automáticamente en secuencias genómicas usando antiSMASH o herramientas relacionadas. Posteriormente, se pueden dereplicar utilizando bases de datos para BGCs de función conocida, como MIBiG. La creación de redes de similitud de secuencias puede identificar grupos de BGC similares en grandes conjuntos de datos. La agrupación de BGCs de referencia puede ayudar a anotar las familias de grupos de genes resultantes (GCF). Imagen adaptada de Van der Hooft et al., 2020.

4.1.2 Minería metabolómica

En la actualidad, uno de los principales obstáculos en la investigación de productos naturales es el redescubrimiento de compuestos ya conocidos. La anotación rápida de los compuestos presentes en una muestra previo a su purificación es entonces un paso crucial e importante que permite evitarlo. En este contexto, la metabolómica basada en espectrometría de masas (EM o MS, del inglés *Mass Spectroscopy*) ha sido ampliamente utilizada debido a su gran sensibilidad y flexibilidad. Esta técnica puede ser acoplada a cromatografía líquida (LC), permitiendo el análisis de compuestos minoritarios presentes en una muestra, además de proporcionar información estructural importante para ayudar en la identificación (Tangerina et al., 2021). La adquisición de espectros de fragmentación de metabolitos (MS/MS o MS en tándem) tiene varias ventajas para anotar e identificar metabolitos (Figura 4.2). Los espectros MS/MS se pueden considerar como códigos de

barras o huellas dactilares de metabolitos, y se han desarrollado varias herramientas para investigar esta información estructural. Un paso inicial suele ser comparar espectros MS/MS experimentales con espectros de bibliotecas, para detectar metabolitos conocidos, o análogos de los mismos, un proceso también conocido como dereplicación (Figura 4.2B).

La EM genera cantidades masivas de espectros, haciendo que el análisis sea realmente complejo. Considerando esto, la plataforma en línea GNPS permite el uso de varias herramientas metabolómicas basadas en MS para analizar grandes conjuntos de datos (Wang et al., 2016). GNPS cuenta con herramientas que tienen como objetivo agrupar metabolitos estructuralmente relacionados en base a la similitud espectral de sus espectros de fragmentación (Figura 4.2C). En general, los metabolitos con una arquitectura química similar producen espectros de fragmentación similares. Basado en este principio, las redes moleculares agrupan los iones parentales (representados por nodos) y la similitud del patrón de fragmentación (representado por uniones) para formar familias moleculares (FMs) de metabolitos relacionados. Esto facilita el análisis de grandes conjuntos de datos, incluso de múltiples organismos, ya que las redes moleculares se pueden usar para encontrar metabolitos relacionados con una molécula conocida de interés, o para correlacionar la presencia de una FM con, por ejemplo, una actividad biológica. La construcción de redes moleculares mediante GNPS se ha aplicado en procesos de selección para la priorización de cepas de grandes bibliotecas microbianas (Wang et al., 2016), en la diferenciación de bacterias relacionadas filogenéticamente (Yang et al., 2013), y en experimentos de investigación de interacción microbiana en co-cultivos (Audoin et al., 2018), entre otros.

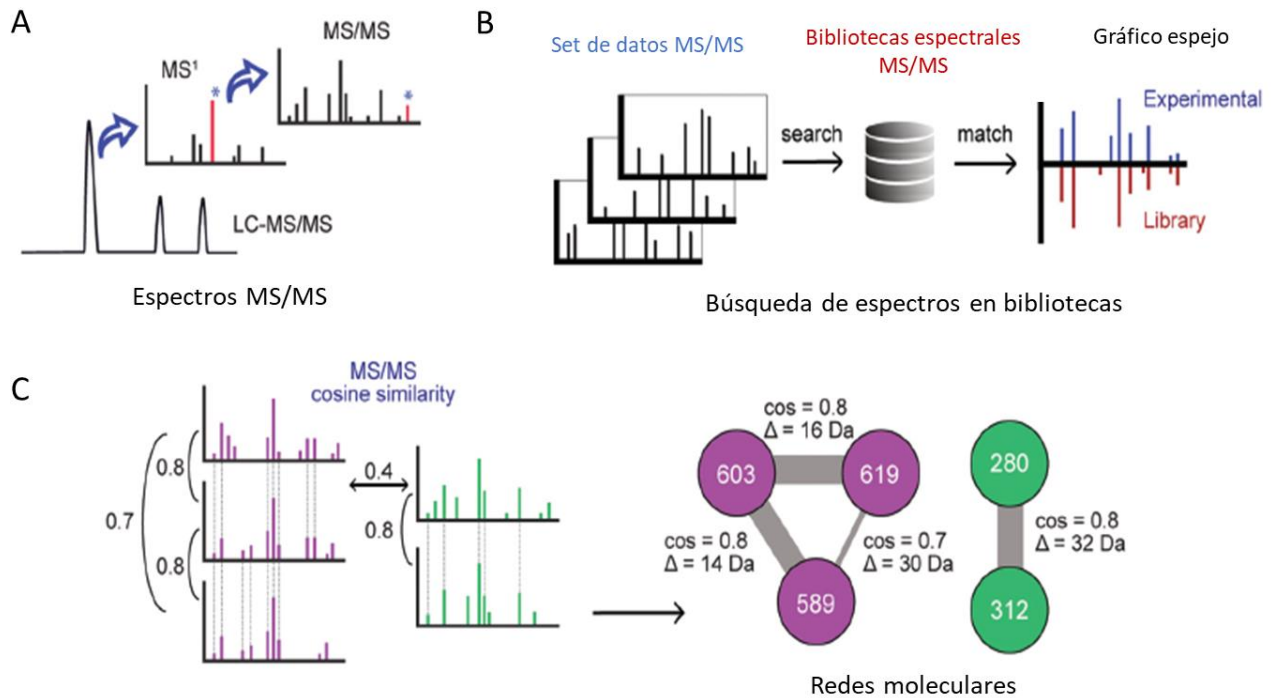


Figura 4.2. Tecnologías de redes moleculares en metabolómica. (A) Los extractos microbianos crudos se analizan mediante LC-MS/MS, a partir del cual se seleccionan y fragmentan los iones más intensos detectados en MS1 para adquirir datos espectrales de MS/MS. (B) Cada espectro MS/MS del conjunto de datos se busca en una biblioteca espectral para encontrar una buena coincidencia espectral. (C) La red molecular organiza los conjuntos de datos MS/MS por similitud espectral (puntuación de coseno), en donde los espectros con altas similitudes se agrupan formando redes moleculares. Imagen adaptada de Van der Hooft et al., 2020.

Cabe mencionar que además de GNPS, varias otras herramientas y plataformas de metabolómica están disponibles también para procesamiento de datos, como por ejemplo, MS-DIAL (con MS-Finder) y MzMine, entre otras (Spicer et al., 2017). Se trata de un área de investigación en actual desarrollo por lo que continuamente surgen nuevas herramientas.

Los objetivos específicos de este capítulo fueron:

1. Obtener los genomas completos de buena calidad de cinco cepas de *Streptomyces* previamente seleccionadas en base a su actividad nematocida y de promoción del crecimiento vegetal.
2. Realizar la búsqueda de BGCs relacionados con las actividades encontradas y analizar la presencia de otros BGCs desconocidos mediante herramientas bioinformáticas (minería genómica).
3. Realizar la búsqueda de los compuestos químicos responsables de las actividades encontradas mediante análisis de los extractos de las cinco cepas por LC-MS/MS (minería metabolómica).
4. Establecer el nexo entre los BGCs presentes en los genomas y los metabolitos producidos en las condiciones evaluadas.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las 5 cepas de *Streptomyces* utilizadas para el estudio metabolo-genómico de este capítulo y sus actividades biológicas se detallan en la Tabla 4.1. Las mismas fueron seleccionadas por presentar actividad nematocida y diferentes características vinculadas a la promoción del crecimiento vegetal (Capítulo 3). Se cuenta además con una caracterización previa de estas cepas en base a su perfil de actividad antimicrobiana, realizada en el marco de la tesis de Magister en Química de Martín Pérez. Estas cepas se encuentran conservadas como suspensión de esporas en glicerol 20% (v/v) a -70 °C. Para preparar dicha suspensión, se partió de una placa esporulada (7 días en medio SFM), se lavó con 3 mL de glicerol 20% y con un hisopo estéril, se juntó la suspensión de esporas en un tubo Eppendorf.

Tabla 4.1. Actividades biológicas de las cepas de *Streptomyces* spp. seleccionadas para el estudio metabolo-genómico.

Cepa	Actividades		
	Nematocida	Antimicrobiana ^a	Promoción de crecimiento vegetal
MAI 2213	<i>C. elegans</i>	<i>C. michiganensis</i>	Solubilización de fosfato (inorgánico y orgánico)
		<i>R. solanacearum</i>	
		<i>X. vesicatoria</i>	Producción de sideróforos
MAI 2237	<i>C. elegans</i>	<i>C. michiganensis</i>	Producción de auxinas
		<i>R. solanacearum</i>	Solubilización de fosfato (orgánico)
		<i>X. vesicatoria</i>	Producción de sideróforos
MAI 2274^b	<i>C. elegans</i>	-	Producción de sideróforos
MAI 2300^b	<i>C. elegans</i>	-	Solubilización de fosfato (orgánico)
			Producción de sideróforos
MAI 2311	<i>C. elegans</i>	<i>A. alternata</i>	Producción de auxinas

<i>A. carbonarius</i>	Solubilización de fosfato (inorgánico y
<i>F. graminearum</i>	orgánico)
	Producción de sideróforos

^a Cepas de microorganismos fitopatógenos: *Clavibacter michiganensis* (MAI 1050), *Xanthomonas vesicatoria* (MAI 2000), *Ralstonia solanacearum* (UY031); *Alternaria alternata* (CBS 105.24), *Aspergillus carbonarius* (NRRL 369), *Fusarium graminearum* (FG 09.005).

^b no se determinó la producción de auxinas en esas cepas

4.2.2 Análisis genómico

Se realizó la secuenciación del genoma completo de las 5 cepas de *Streptomyces* seleccionadas. El análisis de estos genomas estuvo enfocado en realizar la asignación taxonómica de cada cepa y a estudiar los BGCs presentes para relacionarlos con las actividades encontradas. Todos los análisis genómicos fueron realizados utilizando el servidor disponible en el Laboratorio de Microbiología Molecular de Facultad de Química.

4.2.2.1 Extracción de ADN

Para obtener ADN genómico de buena calidad y con buen rendimiento para su secuenciación, se evaluaron dos protocolos de extracción cuya principal diferencia está en el modo inicial de lisis celular.

Protocolo 1: Sambrook y Rusell con modificaciones

Las cepas se cultivaron en 5 mL de TSB durante 3-4 días a 28 °C. Dos mL del cultivo se centrifugaron a 10.000 g, el pellet resultante se mantuvo en freezer a -20°C durante 15-60 min. Se resuspendió el pellet en 0,5 mL de buffer TE25S (25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8,0; 0,3 M sacarosa), se agregaron 10 µL de lisozima (100 mg/mL), se mezcló y se incubó a 37 °C por 30-60 min. Posteriormente se agregaron 5 µL de proteinasa K (20mg/mL) y 30 µL de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%, se mezcló por inversión y se incubó a 55 °C por 60 min. A continuación, se agregaron 100 µL de NaCl 5 M, seguidos de 65 µL de una mezcla de bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) al 10%/NaCl 0,7 M, y se incubó por 10 min a 55 °C.

Se dejó enfriar a 37 °C, se agregaron 500 µL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por 30 min en un agitador orbital a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 11000 g por 15 minutos y la fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo. Se agregó 2,5 µL de RNasa A (10 mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 15-30 min. El ADN se precipitó agregando 0,6 volúmenes de isopropanol frío y se mantuvo a 4 °C durante la noche. Al otro día, se centrifugó a 13.000 g a 4 °C durante 10 min. El *pellet* se lavó dos veces con 0,5 mL de etanol 70%, se secó y se resuspendió en 50 µL de agua calidad miliQ.

Protocolo 2:

Se partió de 50 mL de un cultivo de cada cepa en medio TSB incubado a 28 °C con agitación (180 rpm) durante 4 días a. El cultivo se pasó a un tubo Falcon y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se transfirió la biomasa a un mortero donde se procesó con N₂ líquido hasta pulverizar, evitando que la muestra se descongele. El polvo obtenido se distribuyó equitativamente en 4 tubos Eppendorf (50 mg aproximadamente). La muestra pulverizada se resuspendió en 500 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). Luego, se añadieron 25 µl de SDS al 30%, 5 µl de RNAasa (10 mg/mL), 5 µl de Proteinasa K (20 mg/mL) y 10 µL de lisozima (100 mg/mL), se mezcló por inversión y se incubó a 37 °C por 30 min. Posteriormente, se agregaron 100 µL de NaCl 5M, 75 µL de la mezcla CTAB (10%) /NaCl (0,7 M), se mezcló por inversión y se incubó durante 20 min a 65 °C. Luego, se agregaron 600 µL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó y se centrifugó a 11000 g por 15 min. La fase acuosa (superior) se transfirió cuidadosamente a un tubo Eppendorf nuevo (en caso de ser necesario se repitió el paso anterior). Para precipitar el ADN, se agregaron 400 µl de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.000 g a 4 °C durante 10 min. El pellet se lavó dos veces con 0,5 mL de etanol 70%, se secó y se resuspendió en 50 µL de agua calidad miliQ.

Para seleccionar las muestras de ADN a secuenciar se evaluó la calidad y cantidad de todas las muestras obtenidas. Como requisitos de calidad, se consideraron las relaciones de

absorbancia A_{260}/A_{280} entre 1,8 y 2,0 y A_{260}/A_{230} entre 2,0 y 2,2, y que no se observe degradación en el gel. El requerimiento de cantidad varió según el proveedor y la tecnología de secuenciación siendo mayor a 8 μg de ADN para PacBio (Macrogen), mayor a 300 ng de ADN para Illumina (Novogene) y mayor a 1 μg de ADN para Nanopore. Las relaciones de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} se midieron utilizando el equipo NanoDrop, Genova Nano (Jenway) y la cantidad de ADN se midió en fluorímetro Qubit (Thermo Scientific). La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *Goodview* (SBS Genetech Co., Ltd.) y fotografiado bajo luz UV. Las muestras de ADN se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. En algunos casos, fue necesario realizar la purificación de las muestras de ADN para mejorar la relación A_{260}/A_{280} , para lo cual se utilizó el kit de purificación Clean and concentrate (Zymo Research).

4.2.2.2 Secuenciación, ensamblaje y evaluación de calidad de los genomas

Una vez obtenidos los ADNs de buena calidad y en cantidad suficiente, distintas plataformas de secuenciación fueron utilizadas para cada cepa (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Plataformas y tipos de ensamblaje utilizados para la obtención de la secuencia genómica de las 5 cepas de *Streptomyces* seleccionadas.

Cepa	Tecnología	Ensamblaje y pulido
MAI 2213	PacBio RSII	CANU y Arrow
MAI 2237	PacBio RSII	CANU y Arrow
MAI 2274	Illumina MiSeq + Nanopore	Unicycler (híbrido)
MAI 2300	Illumina MiSeq + Nanopore	Unicycler (híbrido)
MAI 2311	Illumina MiSeq + Nanopore	Unicycler (híbrido)

Para las cepas secuenciadas mediante PacBio RSII, las librerías de ADN fueron preparadas por el proveedor (Macrogen) y secuenciadas mediante la tecnología SMRTbell. Los datos crudos y el análisis de calidad de los *reads* (lecturas) fueron aportados por Macrogen. A partir de los *reads* obtenidos, se realizó el ensamblaje de los genomas mediante el

ensamblador CANU (Koren et al., 2017) y las secuencias se pulieron mediante el programa Arrow.

Para las cepas secuenciadas mediante Illumina MiSeq, la preparación de las librerías y el análisis de calidad de los *reads* obtenidos fueron realizados por el proveedor (Novogene). Los datos crudos fueron filtrados mediante eliminación de *reads* conteniendo adaptadores, *reads* conteniendo N>10 % (siendo N una base no determinada) y *reads* con más del 50 % de las bases de baja calidad (*Qscore* <= 5).

Para la secuenciación mediante la plataforma Nanopore (Oxford Nanopore Technologies, ONT), todo el proceso fue puesto a punto y llevado a cabo en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química. Para la preparación de las librerías se utilizó el kit de ligación SQK-LSK109 y la expansión Native Barcoding EXP-NBD104, siguiendo los protocolos del fabricante (Native Barcoding Genomic DNA – NBE_9065_v109_revZ_14Aug2019 disponible en la sección protocolos de la cuenta web). Para poder secuenciar las tres cepas en una misma corrida, se utilizó un barcode que identificó a cada muestra (barcode 01 -MAI_2274, barcode 02 – MAI_2300 y barcode 03 – MAI_2311). Luego de armar un pool con todas las librerías, las mismas fueron secuenciadas en una celda de flujo Mk1 versión R9 (FLO-MIN106D) en el equipo MinION Mk1B. El análisis y filtrado de los *reads* obtenidos en la secuenciación fue realizado por el software MinKNOW. Para estas tres cepas se evaluaron distintos ensambladores: utilizando únicamente las lecturas de ONT o Illumina y utilizando ambas a la vez (ensamblaje híbrido). Para realizar este ensamblaje híbrido, se utilizó Unicycler v. 0.4.0, una herramienta para ensamblar genomas bacterianos a partir de una combinación de lecturas cortas y largas. Brevemente, a través de Unicycler se realizó un ensamblaje de las lecturas de Illumina usando el ensamblador SPAdes (Bankevich et al., 2012) y luego se construyó el gráfico de ensamblaje usando lecturas largas. Finalmente, se realizó el pulido del ensamblaje final con *reads* de Illumina y se utilizó Pilon para reducir la tasa de pequeños errores (Wick et al., 2017). Además de esta herramienta, para realizar los ensamblajes utilizando sólo las

lecturas de ONT y las de Illumina por separado, se evaluaron los ensambladores CANU y SPAdes, respectivamente (Bankevich et al., 2012; Koren et al., 2017).

El análisis de calidad de todos los ensamblajes fue realizado mediante Quast (Mikheenko et al., 2018). La predicción de genes y anotación se llevó a cabo utilizando el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) versión 2.0 (Aziz et al., 2008), DFAST (Tanizawa et al., 2018) y Prokka (Seemann, 2014). También se realizó un análisis comparativo de los genomas anotados para el cual se construyó el diagrama de Venn correspondiente utilizando la plataforma <https://venndiagram.imageonline.co/es/> disponible online.

Finalmente, los genomas fueron evaluados en las plataformas MiGA (Microbial Genomes Atlas) y BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) disponibles online, los cuales aportan métricas complementarias a valores de calidad (Rodríguez-R et al., 2018; Manni et al., 2021). MiGA utiliza una base de datos para identificar el set de genes presentes típicamente en genomas de bacterias y arqueas, estableciendo un set de genes esenciales. En base a esto, se determinan parámetros de calidad como la completitud (% de genes esenciales presentes), contaminación (% del número de copias de genes esenciales) y calidad (calculada como la completitud – 5x contaminación). De manera similar, BUSCO se basa en el contenido genético de ortólogos de una sola copia casi universales (presentes en más del 90% de las especies consideradas).

4.2.2.3 Identificación taxonómica de las cepas

La identificación de las cepas secuenciadas fue realizada a partir de los genomas ensamblados usando distintos abordajes de análisis genómico. Por un lado, se realizó el análisis en base a índices globales de similitud genómica: Identidad Nucleotídica Media (ANI) y la hibridación ADN-ADN digital (dDDH). El ANI, es muy utilizado en genómica comparativa para cuantificar la similitud entre dos genomas de bacterias o arqueas. Representa el promedio de la identidad de nucleótidos entre las secuencias genómicas de

dos organismos. Para el cálculo de ANI, se utilizó el programa DFAST disponible en <https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/> evaluando la identidad del genoma comparándolo con 13000 genomas de referencia de cepas tipo. Se utilizó el algoritmo *FastANI* (Jain et al., 2018) para calcular el ANI y se consideró el valor de corte de 95% para la asignación de especie. Por su parte, para el cálculo de dDDH, los genomas fueron subidos al servidor *Type Strain Genome Server* (TYGS), una plataforma disponible en <https://tygs.dsmz.de> (Meier-Kolthoff y Göker, 2019). Esta plataforma utiliza el método GBDP (*Genome BLAST Distance Phylogeny*), el cual utiliza el algoritmo BLAST que identifica regiones de similitud entre dos secuencias, para medir las distancias entre genomas de a pares. Los puntajes de BLAST se utilizan luego para calcular una matriz de distancias, que representa las distancias en pares entre todos los genomas. Esta matriz de distancias se transforma en una matriz de disimilitud, donde los valores reflejan la disimilitud entre los genomas. Una vez obtenida esta matriz, se pueden aplicar diversos métodos de construcción de árboles filogenéticos para inferir las relaciones evolutivas entre los genomas. Al igual que cuando se realiza la DDH de forma experimental, valores menores al 70% corresponden al punto de corte para la definición de nuevos taxones (Meier-kolthoff et al., 2014; Meier-Kolthoff y Göker, 2019).

Por otra parte, se llevó a cabo la identificación taxonómica de las cepas en base a similitud de secuencias de 84 genes conservados utilizando el programa AutoMLST disponible en <https://automlst.ziemertlab.com/> (Alanjary et al., 2019). Por último, se realizó un análisis filogenómico en base a un genoma core de 110 genes utilizando una base de datos de 238 genomas de *Streptomyces* disponible a través de una colaboración con el Dr. Francisco Barona-Gómez, investigador principal del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio) - Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav), Irapuato, México.

4.2.2.4 Minería genómica

El análisis de los *clusters* responsables de la producción de metabolitos secundarios a partir de estas 5 cepas se realizó en dos niveles. En un primer nivel, los 5 genomas anotados fueron subidos a la plataforma antiSMASH (*ANTibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell*) disponible en <https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start> (Blin et al., 2021). En un segundo nivel, se utilizó el programa BiG-SCAPE (*Biosynthetic Gene Similarity Clustering and Prospecting Engine*), para la construcción de redes de BGCs por similitud de secuencias agrupándolos en familias de *clusters* genéticos relacionados (GCFs, *Gene Cluster Families*) (Navarro-Muñoz et al., 2020).

Para el análisis por BiG-SCAPE, se evaluaron diferentes valores umbrales (*cuttoff*) para la agrupación de familias según similitud de BGCs (valores de 0,3 y 0,5). Este umbral se define con valores de 0 a 1 (cuanto más bajo es el valor de umbral mayor es la exigencia de similitud entre BGCs para la formación de GCFs). Por definición, el total de GCFs abarca a las familias formadas por la agrupación de dos o más BGCs y, por otro lado, a los *singletons*, que corresponden a BGCs que no se agruparon con ningún otro. Se seleccionó el valor umbral de 0,5 para realizar el análisis de GCFs encontrados en las 5 cepas analizadas, ya que se obtuvo una mayor cantidad de BGCs agrupados en familias. Finalmente, y con el objetivo de profundizar en la distribución de los BGCs presentes en las cepas seleccionadas, se repitió el análisis por BiG-SCAPE adicionando las tres cepas de referencia más similares a cada una según la identificación taxonómica de este trabajo (Tabla 4.7). También se incluyó en el análisis una cepa de referencia de *S. avermitilis* (MA-4680), por su reconocida actividad nematocida (Chen et al., 2016).

4.2.3 Análisis metabolómico

Se realizaron cultivos de estas 5 cepas en diferentes condiciones y a partir de los sobrenadantes se obtuvieron los extractos crudos. Estos fueron analizados mediante LC-MS/MS para evaluar los metabolitos producidos por cada cepa y en cada condición. Este

análisis se realizó en el marco de una pasantía en el laboratorio del Dr. Ryan Seipke de la Universidad de Leeds (Reino Unido).

4.2.3.1 Obtención de extractos crudos a partir de sobrenadantes de cultivo

Se iniciaron cultivos de las 5 cepas seleccionadas en cuatro medios de cultivo: OBB (Oat Bran Broth), SCN (Starch Casein Nitrate), SFM (Soy Flour Manitol) y TSB (Tryptic Soy Broth) cuyas composiciones se indican en el Anexo I. Para ello, se inocularon matraces conteniendo 50 mL de medio de cultivo con 200 μ L de una suspensión de esporas previamente preparada de cada cepa (sección 3.2.2). Dichos matraces se incubaron durante 7 días, a 30 °C con agitación a 180 rpm. Se obtuvieron los sobrenadantes mediante centrifugación a 10.000 rpm, se filtraron por membrana de nitrocelulosa (0,45 μ) y se utilizaron para realizar las extracciones orgánicas con acetato de etilo (1:1). También se realizaron extracciones de cada medio de cultivo sin inocular. Para realizar las extracciones, el sobrenadante filtrado se trasvasó a un embudo de decantación, se agregó el mismo volumen del solvente y se agitó vigorosamente. Se recogió la fase orgánica en un matraz y se repitió el procedimiento dos veces más. Luego se agregó Na₂SO₄ a la fase orgánica para eliminar el agua, se filtró y se pasó a un vial para secar por evaporación al vacío (*GeneVac, spscientific*).

4.2.3.2 Análisis de los extractos mediante LC-MS/MS

Los viales conteniendo los extractos secos fueron re-suspendidos en 600 μ L de metanol, se colocaron en baño de ultrasonido para favorecer disolución, se centrifugaron a 13.000 rpm por 5 min y se pasaron a un vial de HPLC. Todas las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS/MS) por el servicio de espectrometría de masas en la *School of Chemistry* de la Universidad de Leeds. Se utilizó un espectrómetro de masas de alta resolución Bruker MaXis Impact II acoplado a un cromatógrafo UHPLC Dionex 3000 RS conteniendo una columna Agilent C18 (2,1 \times 100 mm) como fase estacionaria. La fase móvil consistió en un gradiente de solvente A (agua con 0,1 % de ácido fórmico) y solvente B (acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico) de la siguiente manera: 0-1,6 min, 5% solvente B; 1,6-6,6 min, 5-100% solvente B; 6,6-8,3 min 100% solvente B; 8,3-9 min, 100-5%

solvente B; 9-10 min 5% solvente B. El flujo de la bomba fue de 0,2 mL/min. El tipo de ionización utilizado fue de electrospray (ESI) en modo positivo. Se obtuvieron los *scans* desde 50 m/z a 2000 m/z, utilizando una energía de colisión de 35 eV. Los datos crudos fueron analizados con el software Compass Data Analysis 4.3 y se obtuvieron los archivos correspondientes en formato mzXML.

4.2.3.3 Análisis de los espectros obtenidos en GNPS y NPAtlas

Para el análisis de los compuestos presentes en los extractos analizados se utilizó la plataforma GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>). Como ya se mencionó, GNPS es un ecosistema *online* de espectroscopía de masas que pretende ser una base de conocimiento para la comunidad donde poder compartir datos espectrales de fragmentación (MS/MS) (crudos, procesados o anotados) de acceso libre (Wang et al., 2016). Esta plataforma permite la realización de diversos análisis de datos espectrales utilizando a su vez múltiples espectros de un mismo set de muestras. En esta tesis, se utilizaron particularmente tres tipos de análisis: la construcción de redes moleculares (*molecular networking*), la búsqueda de compuestos conocidos disponibles en la biblioteca (*spectral library search*), y la anotación de algunos compuestos químicos (*MolNetEnhancer*). Los datos de MS/MS obtenidos fueron contrastados con librerías espectrales de GNPS por una metodología de alto rendimiento que analiza cientos de archivos simultáneamente. De esta manera se pretendió buscar compuestos conocidos o similares que estuviesen presentes en los extractos analizados. Una estrategia disponible para visualizar los datos es mediante la construcción de redes moleculares, cuyo fin es agrupar conjuntos de espectros provenientes de moléculas relacionadas (familias moleculares), incluso cuando los espectros en sí no hayan sido identificados (no coinciden con ninguna molécula conocida). Las redes moleculares en GNPS representan cada compuesto como un nodo, y los alineamientos espectro-espectro como “puentes” entre nodos, suponiendo que patrones de fragmentación similares implican una estructura química similar. En este análisis cada nodo está formado por espectros de fragmentación, de manera tal que todos aquellos

espectros de fragmentación similares se agrupan formando un nodo (también llamado MScluster).

El flujo de trabajo seleccionado fue la construcción clásica de redes moleculares (*Classical Molecular Networking Workflow*) (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) en el sitio web de GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). La masa de tolerancia del ión precursor fue seteada en 2,0 Da y para los iones producto MS/MS en 0,5 Da. La red molecular se creó de manera tal que los “puentes” fueran filtrados para tener una puntuación de coseno superior a 0,7 y más de 6 picos coincidentes. Además, los puentes entre dos nodos se mantuvieron en la red si y solo si cada uno de los nodos aparecía en los 10 nodos más similares respectivos del otro. Finalmente, el tamaño máximo de una familia molecular se estableció en 100 nodos y los puentes con puntuación más bajas se eliminaron de las familias moleculares hasta que el tamaño de la familia molecular estuvo por debajo de este umbral. Luego, se buscaron los espectros en la red contra todas las bibliotecas espectrales de GNPS. Los espectros de la biblioteca se filtraron de la misma manera que los datos de entrada (espectros de las muestras analizadas). Para establecer coincidencias (*matches*) entre los espectros de la red y los espectros de las bibliotecas se consideró como requerimiento una puntuación de coseno superior a 0,7 y al menos 6 picos coincidentes.

En este trabajo, para cada una de las coincidencias obtenidas, se realizó un análisis exhaustivo de estos valores y parámetros para juzgar su confiabilidad. Las bibliotecas que toma en cuenta GNPS son muy variadas y abarcan desde compuestos sintéticos a productos naturales de varios organismos, por ejemplo, MoNA (*MassBank of North America*) y la europea MassBank (*High Quality Mass Spectral Database*). También es necesario considerar aspectos metodológicos como el instrumento, la fuente y el modo de ionización con el cual fueron obtenidos los datos. Para mejorar la información estructural química dentro de la red molecular, se incorporó la información de las anotaciones de estructura *in silico* de GNPS. Para ello, se utilizó el flujo de trabajo GNPS *MolNetEnhancer* (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/molnetenhancer/>). Las anotaciones de clase química se realizaron utilizando la ontología química *ClassyFire* (Ernst et al., 2019).

Como abordaje complementario se utilizó una base de datos de productos naturales, el NP Atlas <https://www.npatlas.org/> (Van Santen et al., 2019; van Santen et al., 2022) para buscar si alguno de los datos obtenidos coincidían con las masas moleculares exactas de los productos naturales registrados en la misma. Para ello, se descargó la lista de 32552 productos naturales aislados a partir de bacterias (12547) y hongos (20005) disponible a la fecha (versión 2021_08). Para realizar la comparación de los productos naturales de esta base de datos con los obtenidos en los extractos analizados, se utilizó el valor del ión precursor ($M+H^+$). Este análisis, se realizó enfocado en los resultados obtenidos en el capítulo 3, donde se identificaron dos extractos con gran actividad nematocida (MAI 2213 OBB y MAI 2274 SFM). Así, se compararon los valores del ión precursor ($M+H^+$) de dichas muestras con los almacenados en el NP atlas, seleccionando únicamente aquellos compuestos de origen bacteriano.

4.3 Resultados

4.3.1 Secuenciación del genoma completo de cepas de *Streptomyces* seleccionadas

Los datos de concentración y pureza de las muestras de ADN secuenciadas se detallan en la Tabla 1 del Anexo IV. Se requirieron varias extracciones para obtener estas muestras en la cantidad necesaria y con los parámetros de calidad requeridos. Ambos protocolos utilizados permitieron obtener ADN de buena calidad, pero el protocolo 2 permitió obtener mayor cantidad de ADN, lo cual era necesario para los servicios de secuenciación. Este resultado era de esperar ya que en dicho protocolo se realiza a una escala mucho mayor, por lo que se parte de mayor cantidad de células. En la Tabla 4.3 se resumen los resultados crudos de secuenciación obtenidos según la tecnología utilizada para cada cepa.

Tabla 4.3. Análisis de calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación

Cepa	Tecnología	N^o total de bases secuenciadas	N^o de lecturas	Cobertura ^a
2213	PacBio	925149394	76523	108x
2237	PacBio	1182811054	91097	139x
2274	Illumina	1600000000	10491640	188x
	ONT	300000000	60000	35x
2300	Illumina	1500000000	9801654	176x
	ONT	1800000000	300000	211x
2311	Illumina	1700000000	11090674	200x
	ONT	1000000000	600000	117x

^a La cobertura es un valor estimado y se calculó dividiendo el número total de bases secuenciadas sobre G, el tamaño estimado del genoma que en este caso se consideró un valor de 8,5 Mb para los genomas de *Streptomyces*.

La cobertura da una idea del número de veces que una base es secuenciada en una reacción. Los rendimientos de la secuenciación fueron excelentes para todas las muestras debido a

que la cobertura para todos los genomas fue muy alta, incluso para la cepa MAI 2274 (ONT) cuya cobertura fue la más baja (35x), dado que es compensada por la alta cobertura obtenida por Illumina (188x) para esa misma cepa.

Las lecturas (*reads*) fueron de alta calidad según los parámetros evaluados por los proveedores (Illumina y PacBio) y en el programa FastQC para las secuencias de ONT. Se consideraron lecturas de alta calidad aquellas con índice de calidad Phred (Q) superior a 30 para las lecturas obtenidas por Illumina y mayor a 7 para las lecturas obtenidas por Nanopore. Este índice de calidad se otorga de forma individual a cada nucleótido, y refleja la probabilidad de que ese determinado nucleótido sea erróneo. Un índice de calidad Phred 30 determina que esa probabilidad de error sea de 1 entre 1000, asegurando una precisión del 99,9% (Ewing y Green, 1998; Ewing et al., 1998).

4.3.2 Ensamblaje de los genomas

En la Tabla 4.4 se detallan los datos obtenidos para el mejor ensamblaje de cada cepa, el cual se seleccionó teniendo en cuenta la longitud total del genoma, el número de *contigs* y el estadístico N50.

Tabla 4.4. Análisis del ensamblaje de los genomas

	MAI 2213	MAI 2237	MAI 2274 ^c	MAI 2300 ^c	MAI 2311 ^c
Nro de <i>contigs</i>	5	13	4	6	7
<i>Contig</i> más largo	7940914	3656104	4268961	4229835	2733708
Largo total	8454032	9198414	7672689	9660631	8270874
GC (%)	72,36	71,43	72,38	70,56	72,63
N50^a	7940914	1569722	4268961	2801713	2361731
L50^b	1	2	1	2	2

^a se define como la longitud de los *contigs* que ordenados de mayor a menor tamaño alcanza la mitad de los nucleótidos del genoma

^b se calcula ordenando todos los *contigs* obtenidos de mayor a menor, y determinando la cantidad mínima de *contigs* cuyo tamaño sea el 50% de todo el genoma.

^c Ensamblaje híbrido (Illumina + Nanopore)

En todos los casos se obtuvieron ensamblajes de buena calidad, con un bajo número de *contigs* y con un % de GC dentro de los valores esperados para el género *Streptomyces*. Como era de esperar, los ensamblajes realizados únicamente con los datos de Illumina, mostraron genomas más fragmentados (entre 56 y 127 *contigs*) mientras que los obtenidos a partir de los datos de sólo ONT tienen entre 4 y 7 *contigs*. El análisis de calidad de los genomas ensamblados se evaluó también mediante las herramientas BUSCO y MiGA. En BUSCO, se utilizó una base de datos de 145 genomas, encontrándose 1579 BUSCOs en total, y se determinó para cada genoma el porcentaje de aquellos que estaban completos, siendo el resto fragmentados o ausentes (Tabla 4.5). En MiGA, se identificaron 106 genes esenciales para estos genomas y en la misma tabla se indican los porcentajes de completitud, contaminación y calidad de cada uno. Según los umbrales dados por la plataforma, se obtuvieron valores de completitud muy altos, contaminación baja, y calidad alta para todos los genomas, excepto para el de MAI 2300 cuya calidad fue considerada intermedia (47,1%). Estos resultados permitieron confiar en la calidad de los genomas obtenidos para continuar con su análisis.

Tabla 4.5. Análisis de calidad de los genomas en base a sus genes esenciales.

Cepa	% de BUSCOs completos	Completitud (%)^a	Contaminación (%)^b	Calidad (%)^c
2213	99,87	98,1	6,6	65,1
2237	98,61	100	7,5	62,5
2274	99,87	99,1	6,6	66,1
2300	99,87	99,1	10,4	47,1
2311	97,97	93,4	3,8	74,4

^a se considera alta cuando es mayor a 92%, ^b se considera baja cuando es menor a 12%, y ^c se considera alta cuando es mayor al 60%.

4.3.3 Anotación de los genomas ensamblados

La anotación de genes se realizó mediante diferentes plataformas DFAST, RAST y Prokka, obteniéndose resultados similares. En la Tabla 4.6, se muestra un resumen de las características más relevantes de la anotación genómica (RAST), donde se detallan los posibles genes que codifican para ARNs y para proteínas (CDS), y dentro de estos, la cantidad de genes que corresponden a proteínas hipotéticas y los genes candidatos con una función conocida.

Tabla 4.6. Características de la anotación de los genomas usando RAST.

	MAI 2213	MAI 2237	MAI 2274	MAI 2300	MAI 2311
N° de CDS	7853	8837	7141	9077	7442
N° de ARNs	85	84	87	92	82
Largo proteínas (promedio)	324,8	312,8	320,2	322,1	334,3
Coding ratio %	88,4	88,3	88,0	88,4	87,7
Proteínas de función conocida	4757	5497	4587	5735	4620
Proteínas hipotéticas	3096	3340	2554	3342	2822

Aproximadamente el 20% de los genes fueron clasificados por la herramienta RAST dentro de 27 categorías funcionales. En la Figura 1 del Anexo IV se muestra la distribución de los genes dentro de las distintas categorías para cada una de las cepas. En resumen, el mayor número de genes está relacionado con el metabolismo de carbohidratos (entre 14,9 y 18,7%) y el metabolismo de aminoácidos y sus derivados (entre 17,5 y 19,5%). En lo que respecta a las actividades de PCV evaluadas en el marco de la tesis, se buscaron particularmente aquellos genes relacionados con la categoría adquisición y metabolismo

del hierro (que comprende a los sideróforos) y metabolismo secundario (que comprende la síntesis de hormonas vegetales). Dentro de la categoría de adquisición y metabolismo del hierro se encontraron entre 22 y 33 genes en los genomas de las 5 cepas estudiadas, la mayor parte de los cuales se encontraron en la subcategoría de sideróforos. Este resultado se correlaciona con la producción de sideróforos observada en las 5 cepas en el capítulo 3. Por otro lado, dentro de la categoría que comprende a la síntesis de hormonas vegetales, se encontraron entre 4 y 5 genes para la biosíntesis de auxinas en todas las cepas a excepción de la cepa MAI 2213. Esto se corresponde con los resultados obtenidos en el capítulo anterior, donde dicha cepa no mostró producción de fitohormonas por ninguno de los dos métodos evaluados.

A partir de la lista de genes anotados se realizó un análisis comparativo de las 5 cepas secuenciadas. Se obtuvo la lista de genes únicos y los que se comparten entre las distintas cepas, observándose un genoma *core* conformado por 1353 genes, y cada cepa aporta un gran número de genes accesorios (Figura 4.3). Este resultado resalta la gran diversidad del género *Streptomyces* en las cepas analizadas.

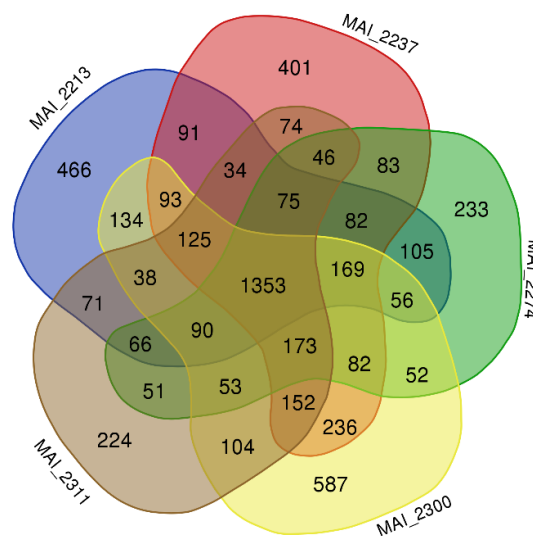


Figura 4.3. Diagrama de Venn para las 5 cepas de *Streptomyces* secuenciadas. Se muestran los genes únicos y compartidos entre ellas.

4.3.4 Identificación y relaciones taxonómicas de las cepas

En la Tabla 4.7 se resumen los resultados obtenidos a partir del cálculo de ANI para las cepas de *Streptomyces* secuenciadas. En cada caso se muestran las tres especies más relacionadas.

Tabla 4.7. Identificación obtenida por el cálculo del ANI.

Cepa	Especie	Cepa	Nro de acceso	ANI (%)
2213	<i>Streptomyces misionensis</i>	DSM 40306	GCA_900104815.1	97,67
	<i>Streptomyces murinus</i>	DSM 41827	GCA_014138855.1	90,24
	<i>Streptomyces murinus</i>	NRRL B-2286	GCA_002154555.1	90,03
2237	<i>Streptomyces curacoi</i>	DSM 40107	GCA_001513975.1	86,09
	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	DSM 40212	GCA_001513955.1	85,90
	<i>Streptomyces cyaneus</i>	CGMCC 4.1671	GCA_004028635.1	85,87
2274	<i>Streptomyces cellostaticus</i>	DSM 40189	GCA_001513965.1	88,49
	<i>Streptomyces bungoensis</i>	DSM 41781	GCA_001514215.1	88,43
	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	ATCC 14511	GCA_001542625.2	88,11
2300	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	DSM 40212	GCA_001513955.1	93,78
	<i>Streptomyces canus</i>	DSM 40275	GCA_001514045.1	91,62
	<i>Streptomyces canus</i>	DSM 40017	GCA_001514145.1	91,58
2311	<i>Streptomyces rishiriensis</i>	NBRC 13407	GCA_003112535.1	92,36
	<i>Streptomyces humidus</i>	JCM 4386	GCA_014649655.1	91,59
	<i>Streptomyces cacaoi subsp. asoensis</i>	NBRC 13813	GCA_016860545.1	88,17

A partir de estos resultados, la única cepa que se logra identificar a nivel de especie, con un valor mayor a 95%, es la MAI 2213 que presenta un valor de ANI de 97,67 % respecto a la cepa tipo de *Streptomyces misionensis* (en gris en la Tabla 4.7). Para las restantes cepas se

pueden establecer sus relaciones taxonómicas más cercanas, pero no se llega a su identificación según este abordaje. Por su parte, en la Figura 4.4 se muestra el árbol obtenido a partir de las distancias GBDP (*Genome BLAST Distance Phylogeny*) calculadas en la plataforma TYGS. Las 5 cepas se ubicaron en *clusters* distintos y se puede ver su cercanía con cepas relacionadas en base a esta métrica (Figura 4.4).

Capitulo 4

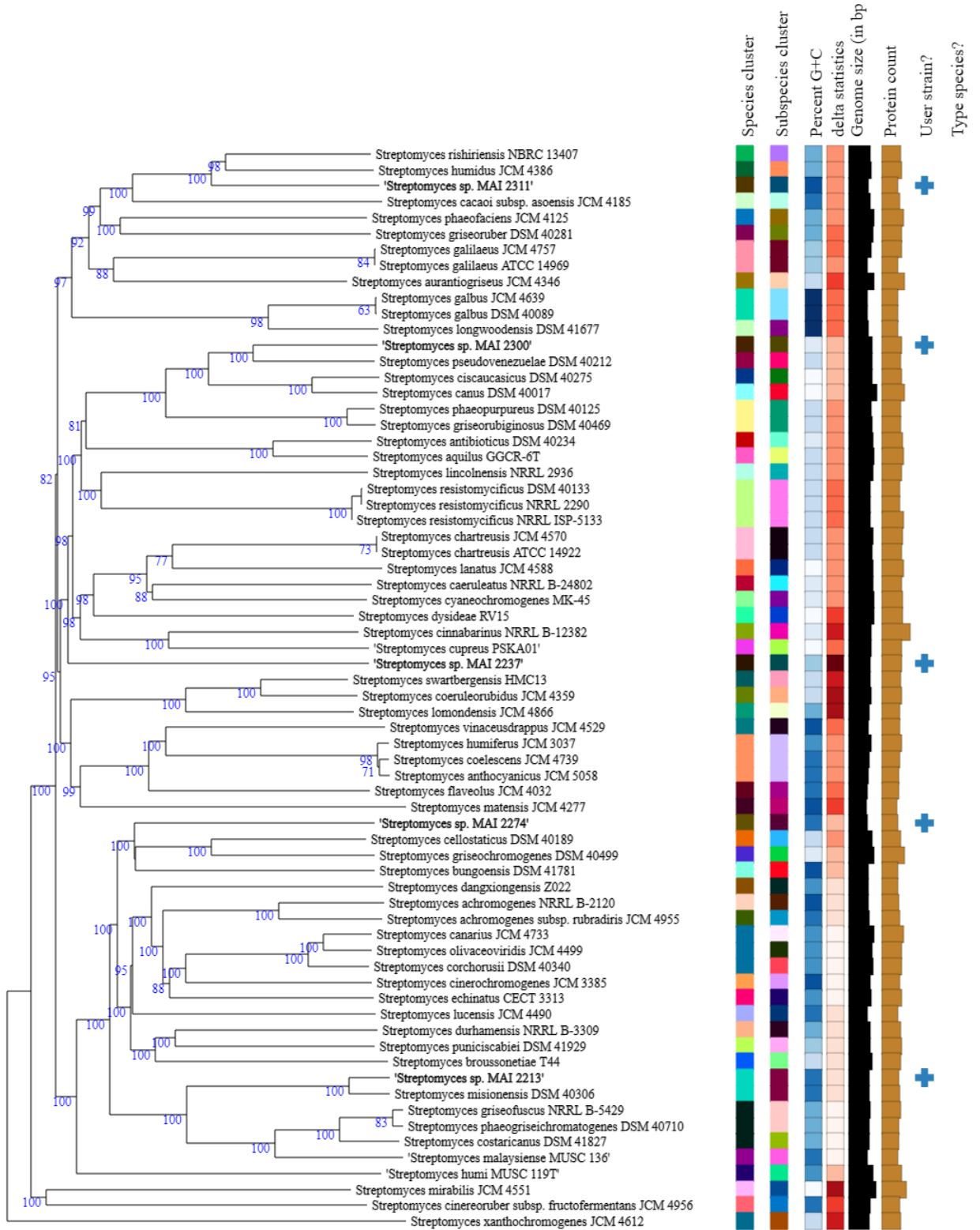


Figura 4.4 (página anterior). Árbol filogenómico obtenido con FastME 2.1.6.1 a partir de las distancias GBDP (*Genome BLAST Distance Phylogeny*) calculadas con los genomas de las cinco cepas de *Streptomyces* secuenciadas en la plataforma TYGS. Los números en cada rama indican valores de pseudo-bootstrap > 60% (en 100 repeticiones) con un promedio de 93,9%. El árbol fue enraizado en el punto medio. Los códigos de colores de la derecha corresponden a la afiliación a grupos de especies (1) y subespecies (2), contenido genómico de G+C (3), valores δ (4), longitud total de la secuencia del genoma (5), número de proteínas (6) y tipo de cepa (7).

Por otro lado, estos resultados fueron también confirmados mediante análisis filogenómicos basados en la comparación de diferentes sets de genes conservados en dos bases de datos diferentes de cepas de *Streptomyces*. Las especies más relacionadas obtenidas en ambos análisis realizados se resumen en la Tabla 4.8 y los árboles correspondientes se muestran en las Figuras 2 y 3 del Anexo IV.

Tabla 4.8. Resumen de las especies más relacionadas obtenidas a partir de los análisis filogenómicos.

Cepa MAI	Identificación filogenómica
2213	(CT) <i>Streptomyces_misionensis_DSM_40306</i>
2237	<i>Streptomyces_sp_CdTB01</i> <i>Streptomyces_griseoviridis_NZ_CP034687.1</i>
2274	(CT) <i>Streptomyces_bungoensis_DSM_41781</i>
2300	<i>Streptomyces_canus_299MFChir41</i> <i>Streptomyces_sviceus_ATCC_29083</i>
2311	(CT) <i>Streptomyces_griseoruber_DSM_40281</i>

CT: Cepa tipo

Las diferentes metodologías de identificación utilizadas, además de usar un abordaje y criterio diferente para la asignación de especies, utilizan bases de datos genómicas

diferentes y por lo tanto los genomas presentes en las comparaciones no son siempre los mismos. Como resultado, se puede decir que solo se logró identificar unívocamente a la cepa MAI 2213 como *Streptomyces misionensis*. Por su parte, para las cepas MAI 2237, MAI 2274, MAI 2300 y MAI 2311 se establecieron las relaciones taxonómicas más cercanas, pero no se llega a una identificación certera por ninguna de las metodologías utilizadas.

4.3.5 Minería genómica

Los resultados obtenidos se resumen en las Figuras 4.5 y 4.6, y el detalle de los *clusters* encontrados se presenta en la Tabla 2 del Anexo IV. Como se puede ver en la Figura 4.5, este análisis permitió la identificación de entre 25 y 33 BGCs en cada genoma, los cuales se relacionan con la biosíntesis de terpenos, poliquétidos, péptidos no ribosomales (NRP), sideróforos, y péptidos ribosomales modificados postraduccionalmente (RiPPs), entre otros. Los tipos de BGCs más abundantes entre las 5 cepas analizadas fueron los híbridos, que consisten en BGCs que comparten más de un tipo de genes (por ejemplo, PKS y NRPS), identificándose entre 2 y 8 BGCs de este tipo en los genomas analizados.

Como se puede observar en la Figura 4.6, más del 50 % de los BGCs predichos por antiSMASH para estas 5 cepas presentan muy baja (menor al 50 %) o nula similitud con otros BGCs reportados en la base de datos de MIBiG. Este resultado sugiere la existencia de nuevos BGCs, y sostiene la idea de la gran diversidad de metabolitos que presenta este género que aún no han sido descubiertos.

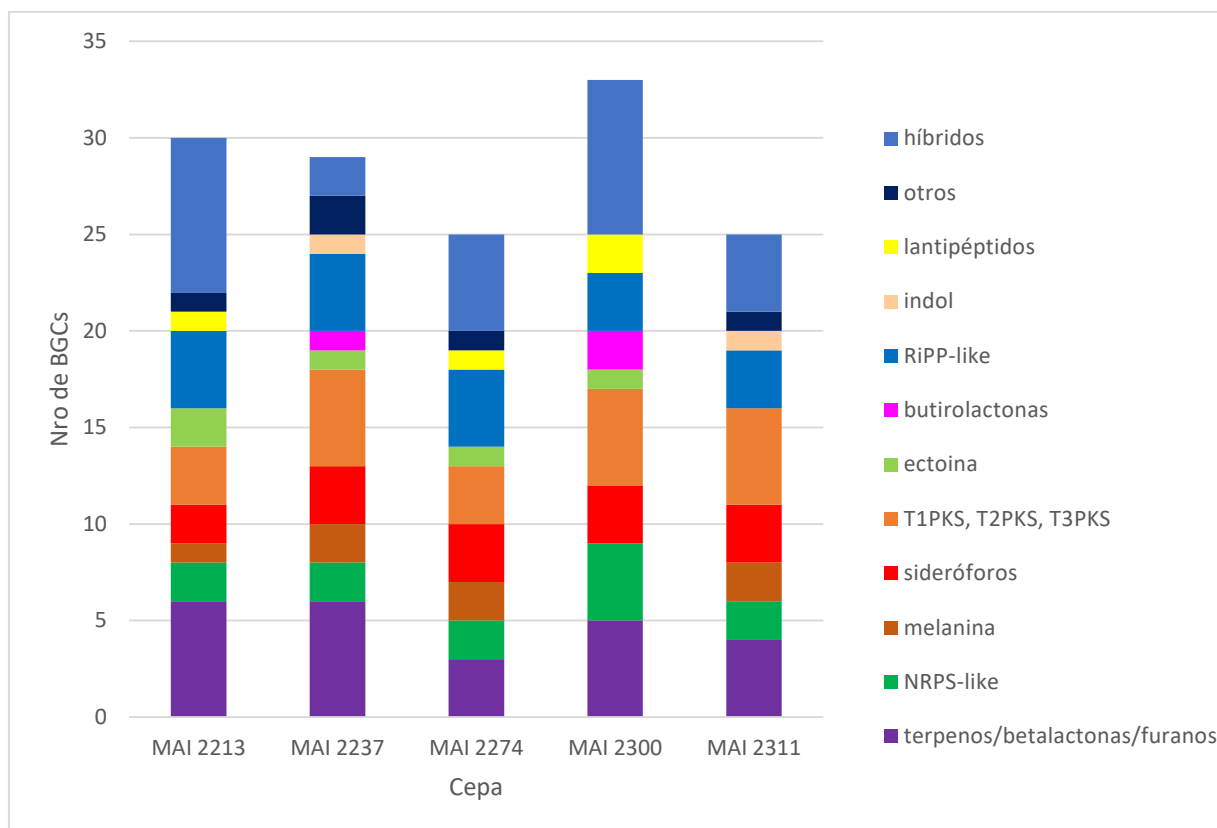


Figura 4.5. Categorías de clusters genéticos involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios (BGCs) presentes en los 5 genomas de *Streptomyces* secuenciados. NRPS, *nonribosomal peptide synthetases*, PKS, *Polyketide synthases*, RiPPs, *Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides*. El Glosario de los tipos de BGCs definidos por antiSMASH está disponible en <https://docs.antismash.secondarymetabolites.org/glossary>.

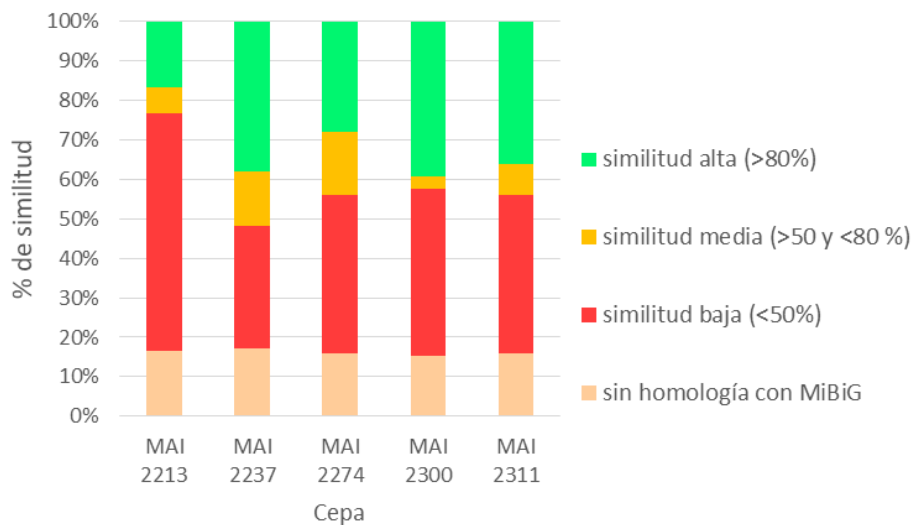


Figura 4.6. Porcentaje de similitud de los clusters de genes biosintéticos (BGCs) presentes en los 5 genomas de *Streptomyces* secuenciados respecto a los BGCs reportados en MiBiG.

Se profundizó en el análisis de aquellos BGCs que presentaron una similitud mayor al 80% con BGCs reportados en la base MiBiG (Tabla 4.9). Varios de estos BGCs están presentes en los genomas de todas o la mayoría de las cepas de *Streptomyces* seleccionadas y corresponden a metabolitos muy comunes en el género. Este es el caso de los hopenos, la geosmina, la ectoína, el pigmento de esporas, la melanina y las desferrioxiaminas. También se encontraron BGCs responsables de la producción de metabolitos con funciones más específicas y que han sido reportados por su actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antioxidante o antitumoral (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Resumen de los BGCs con similitud mayor al 80% con los reportados en MIBiG en las cepas secuenciadas.

BGC más similar (MIBiG)	Categoría	Actividad reportada/función	Referencia	MAI 2213	MAI 2237	MAI 2274	MAI 2300	MAI 2311
Hopeno	Terpeno	Lípidos que forman parte de la membrana bacteriana y se cree que alivian el estrés en condiciones extremas al disminuir la permeabilidad al agua	(Belin et al., 2018)					
Geosmina	Terpeno	Responsable del olor a tierra, algunos derivados tienen actividad antimicrobiana	(Jiang et al., 2007)					
Pigmento de esporas	Híbrido (T2PKS-RiPPs)	Pigmento						
Desferrioxamina B/E	Sideróforo	Sideróforos (adquisición de hierro)	(Takano et al., 2016; Sathya et al., 2017)					
Ectoína	Ectoína	Soluto compatible, ayuda a soportar condiciones de estrés osmótico	(Prabhu et al., 2004)					
Melanina	Melanina	Pigmento						

Albaflavenona	Terpeno	Antimicrobiano	(Gürtler et al., 1994)					
Alkylresorcinol	T3-PKS	Amplio rango de actividades, incluyendo antimicrobianos, antiparasitarios, antitumorales y antioxidantes	(Stasiuk y Kozubek, 2010; Sampietro et al., 2013; Zabolotneva et al., 2022)					
Antimicina	Híbrido (NRPS-T1PKS)	Inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondrial	(Van Der Heul et al., 2018)					
Germicidina	T3-PKS	Inhibidor autorregulador de la germinación de esporas y elongación de hifas	(Petersen et al., 1993; Aoki et al., 2011)					
Isorenierateno	Terpeno	Pigmento carotenoide	(Becerril et al., 2018)					
Informatipeptina	RiPPs	Escasos reportes de actividad	(Mohimani et al., 2014; Damayanti et al., 2021)					
Neopolioxina C	Híbrido (nucleósido-NRPS-betalactona)	Inhibidor de la biosíntesis de la pared celular fúngica (antifúngico)	(Kobinata et al., 1980)					

Butirolactona	Híbrido (terpeno-butiro lactona)	Molécula señal	(Healy et al., 2009)				
Himastatina	Híbrido (terpeno-NRPS)	Antitumoral y antibiótico	(Leet et al., 1996)				
Citru lassina F	RiPP (lassopéptido)	Antibacteriana	(Tietz et al., 2017; Cheng y Hua, 2020)				

4.3.6 Análisis de BGCs desde una perspectiva global: BiG-SCAPE

Se llevó a cabo un abordaje global de análisis de BGCs mediante la herramienta BiG-SCAPE. Esta herramienta permitió explorar la diversidad de BGCs encontrados en los genomas analizados agrupándolos en familias (GCFs). Cada familia contiene BGCs de cepas que se relacionan por estar involucrados en la biosíntesis de metabolitos altamente similares. El número total de BGCs analizados incluyendo los de la base de datos (MIBiG) fue de 352, siendo 142 correspondientes a las 5 cepas secuenciadas en esta tesis (Figura 4.7). Se identificaron un total de 26 GCFs (familias), en las cuales quedaron agrupados 81 de los 142 BGCs presentes en los genomas de las 5 cepas seleccionadas. Los restantes BGCs no quedaron agrupados (*singletons*).

En una primera instancia se analizaron las familias presentes y si las mismas tenían algún *hit* con algún BGC de la base de datos de MIBiG o si eran familias con BGCs completamente desconocidos, encontrándose 19 familias con *hits* de MIBiG. En la Figura 4.7 se muestra la red molecular generada a partir de este análisis, donde cada nodo corresponde a un BGC y están referenciados según la cepa en la que se encontró, incluyendo los BGCs de MIBiG. Se identificaron dos grandes familias que incluyeron mayoritariamente hits de MIBiG. La familia GCF 158 agrupa BGCs clasificados principalmente como híbridos PKS-NRPS y PKS de tipo 1 e incluyó sólo un BGC de la cepa MAI 2311. En la familia GCF 1290 se incluyen BGCs clasificados principalmente como PKS tipo 2 para los cuales en su mayoría no se ha encontrado homología con BGCs ya reportados. En esta familia se agruparon 7 BGCs que pertenecen a las 5 cepas analizadas. También se identificaron familias correspondientes a la ectoína y melanina en las 5 cepas, productos muy comunes en especies de *Streptomyces*, lo cual se corresponde con los resultados previamente mostrados en la Tabla 4.9.

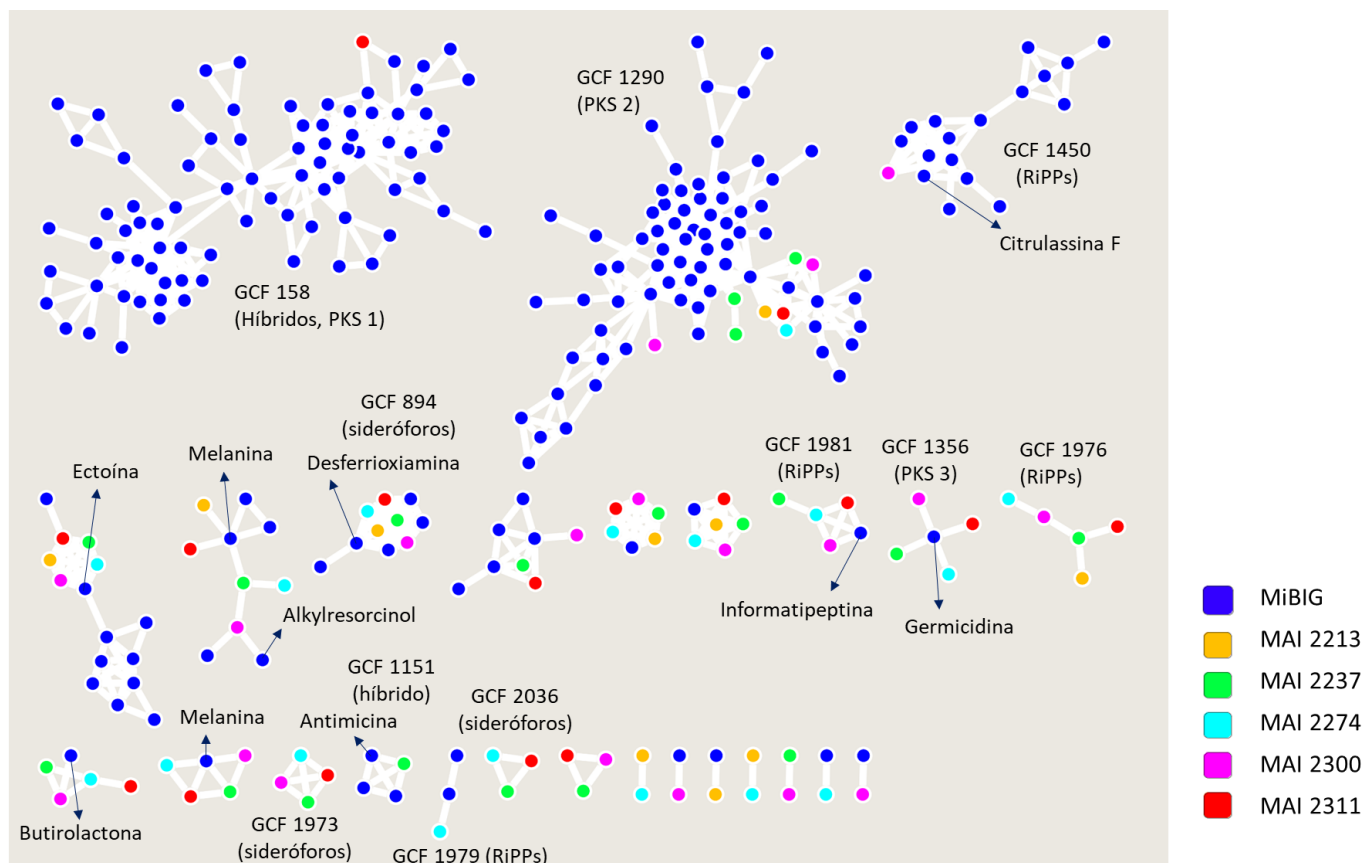
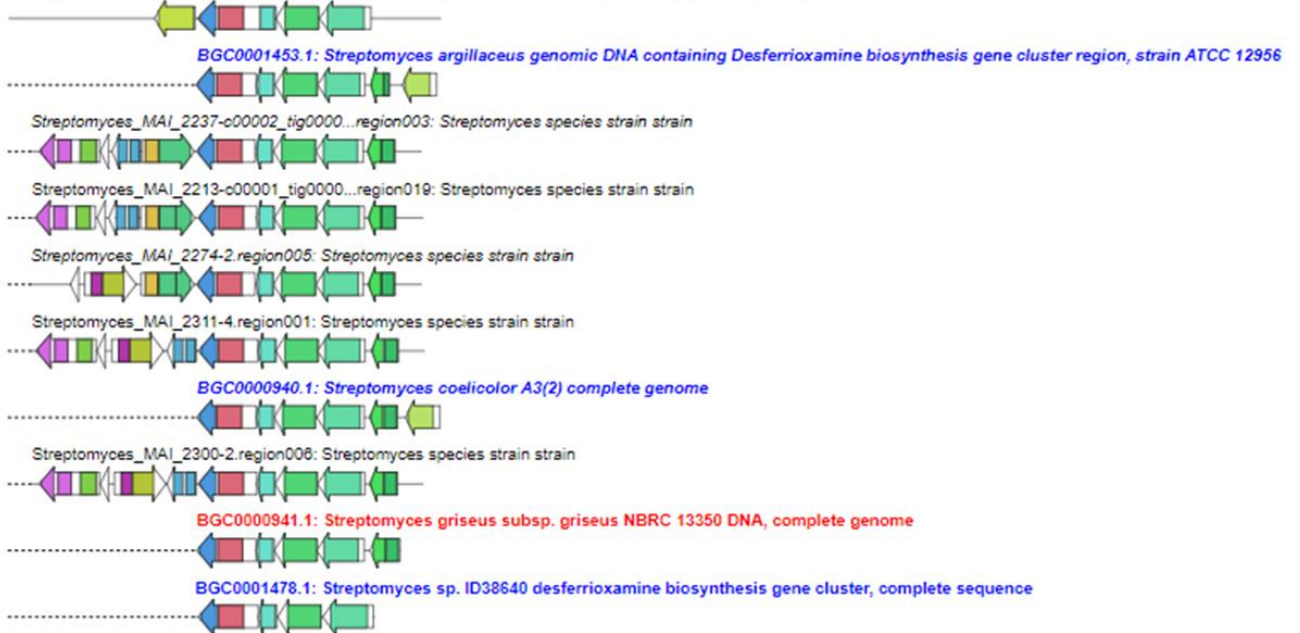


Figura 4.7. Red molecular generada mediante BiGSCAPE referenciada según la cepa, incluyendo los BGCs de MiBiG como se indica a la derecha de la imagen. Se utilizó un *cuttof* (umbral de similaridad) de 0,5. Los números de familias (GCFs) más relevantes se indican junto con el tipo de BGC más presente en dicha familia. Algunos BGCs de MiBiG identificados con algún metabolito se indican con flechas. Imagen editada en Cytoscape. En la Figura 5 del Anexo IV, se muestra la misma imagen, pero referenciada según el tipo de BGC.

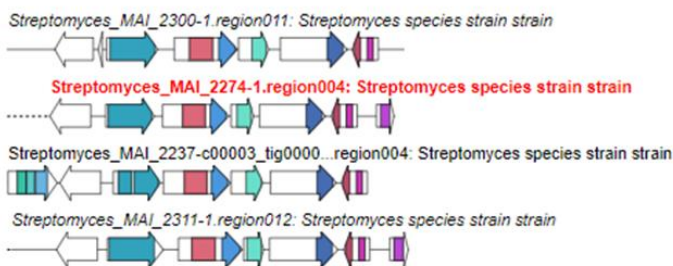
A continuación, se describen con mayor detalle los principales GCFs encontrados, considerando las predicciones de BGCs y su posible relación con las actividades detectadas en las cepas analizadas (Capítulo 3). Considerando que se verificó que las 5 cepas producen sideróforos, se identificaron tres GCFs; las familias 894, 1973 y 2036 que se corresponden con sideróforos predichos según antiSMASH. En la Figura 4.8 se muestra el detalle de los BGCs presentes en estas familias. La familia 894 presenta BGCs de las 5 cepas analizadas y tres BGCs de MIBiG relacionados a la producción de las desferroxiaminas B y E, los cuales mostraron un 83 % de similitud de genes en las 5 cepas. En las otras dos familias (1973 y 2036), los BGCs identificados en las cepas seleccionadas no se agruparon con ningún sideróforo identificado en la base de datos MIBiG (Figuras 4.7 y 4.8), lo que indica que son sideróforos potencialmente novedosos.

GCF 894

BGC0001572.1: *Pantoea agglomerans* strain B025670 desferrioxamine E biosynthetic gene cluster, complete sequence



GCF 1973



GCF 2036

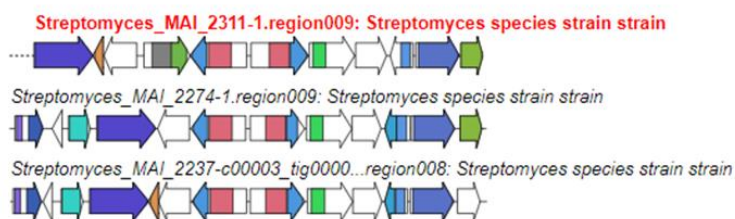


Figura 4.8. Estructura de los *clusters* genéticos relacionados con la biosíntesis de sideróforos presentes en las familias (GCFs) 894, 1973, 2036. Imagen obtenida de BiG-SCAPE.

Por otro lado, se identificó una familia (GCF 1151) conteniendo BGCs de la clase híbridos PKS-NRPS, siendo uno de ellos un BGC de la cepa MAI 2237, que tiene un 100 % de similitud de genes con uno de MIBiG que codifica para la biosíntesis de la antimicina de *Streptomyces argillaceus*. Los otros BGCs que se agrupan en esta familia corresponden a la esplenomicina y a otro sin identificar de la cepa de *Streptomyces* sp. S4 (Figura 4.9). Como se mencionó anteriormente, este compuesto podría ser responsable de la actividad nematocida observada en el capítulo 3, y la construcción de una cepa *knock-out* de esta vía se detalla en el capítulo 5.

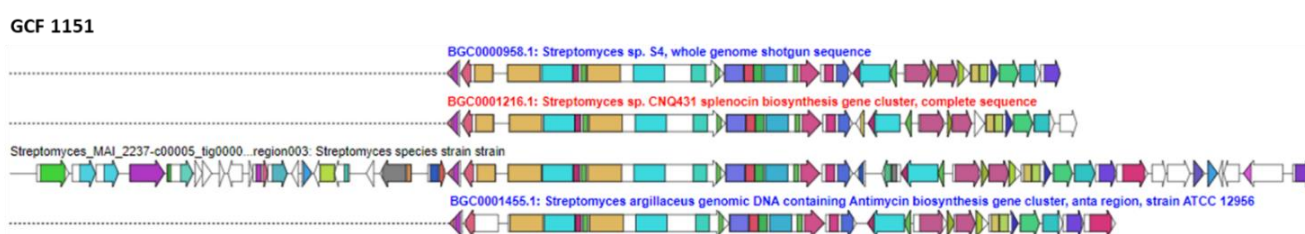


Figura 4.9. Estructura de los *clusters* genéticos relacionados a la biosíntesis de antimicina de la familia 1151. Imagen obtenida de BiG-SCAPE.

También se encontraron cuatro GCFs que incluyen productos naturales de origen ribosómico (RiPPs). Estos compuestos resultan interesantes por su gran diversidad y potencial actividad biológica reportada (Ortega y Van Der Donk, 2016). Uno de ellos, el GCF 1450 incluye a la cepa MAI 2300 y presentó hits con varios BGCs de MIBiG. El más cercano es la citrulassina F, un lassopéptido de la cepa de *Streptomyces avermitilis* MA-4680. El segundo RiPP es el del GCF 1981, que contiene a cuatro de las cepas de nuestra colección y un BGC de MIBiG correspondiente al lantipéptido informatipeptina de *S. viridochromogenes*. La similitud de los genes de este BGC reportado con los de nuestras cepas fue del 100 % para las cepas MAI 2311 y MAI 2274, del 85 % para la cepa MAI 2300 y del 71 % para la MAI 2237. En la Figura 4.10 se muestra la estructura genética de los *clusters* relacionados a la biosíntesis de informatipeptina. Existen escasos reportes de bioactividad de este metabolito del tipo RiPP (Mohimani et al., 2014; Damayanti et al., 2021), por lo que resulta interesante su presencia en nuestras cepas.

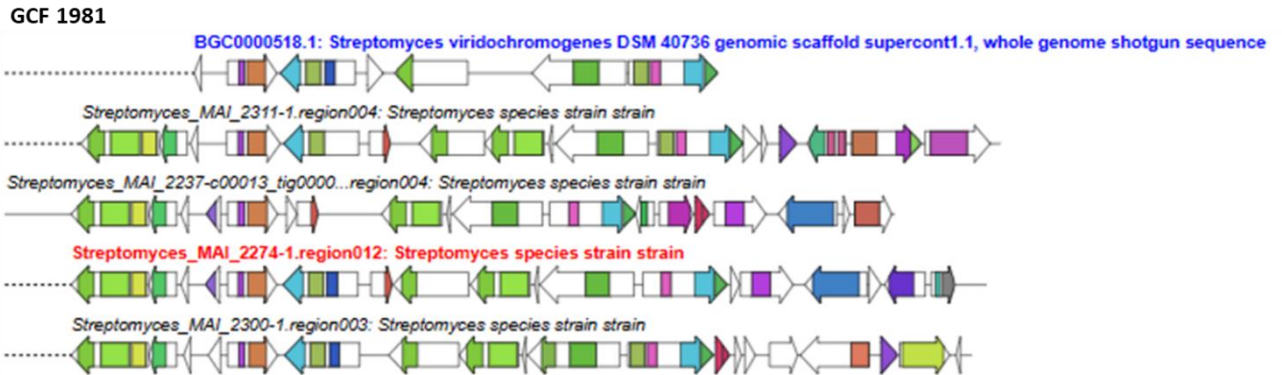


Figura 4.10. Estructura de los *clusters* genéticos relacionados a la biosíntesis de informatipeptina de la familia 1981. Imagen obtenida de BiG-SCAPE.

Otra familia (GCF 1979) contiene solo a la cepa MAI 2274 y la agrupa con el BGC de lantipéptidos producidos por otras bacterias gram positivas (staphylococcin C55 de *Staphylococcus aureus* y lacticin 3147 A1 de *Lactococcus lactis*). La cuarta de las familias asociadas a la biosíntesis de RiPPs, es la familia GCF 1976 que se destaca por incluir a las 5 cepas de *Streptomyces* seleccionadas y ningún *hit* con la base de datos (Figura 4.7 y 4.11).

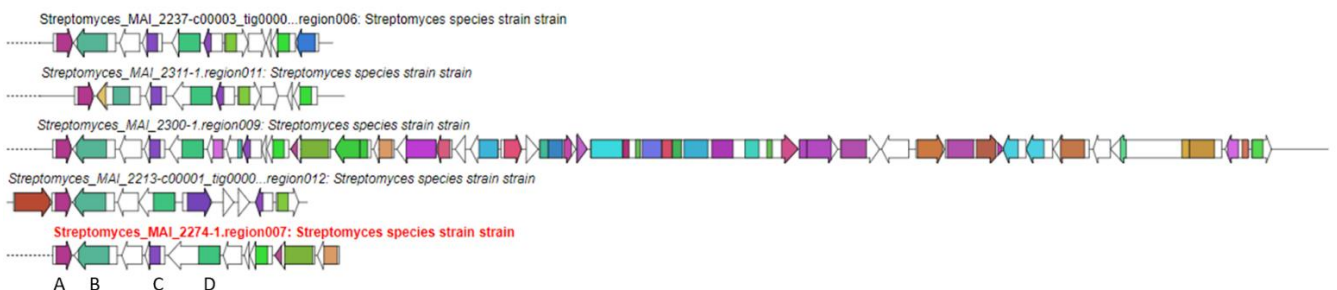


Figura 4.11. Familia 1976 formado por *clusters* genéticos asociados a la biosíntesis de péptidos ribosomales con modificación postraduccional (RiPPs) presentes en los genomas de las 5 cepas de *Streptomyces* seleccionadas.

El análisis de los BCGs que integran esta familia (GCF 1976) permitió identificar cuatro genes o dominios comunes a las cinco cepas (Figura 4.11). Estos incluyen los dominios PF06778 de la clorito dismutasa (A), PF00561 de la alfa/beta hidrolasa (B), y PF13628 y PF05114, los

cuales codifican a las proteínas de función desconocida DUF4142 (C) y DUF692 (D), respectivamente. En un análisis posterior, se vió que esta familia de BGCs no es exclusiva de las cepas secuenciadas, sino que se agruparon también BGCs de otras cepas de *Streptomyces* taxonómicamente relacionadas (Figura 6, Anexo IV). En este nuevo análisis se adicionaron a dicha familia todas las cepas más similares filogenéticamente a las cepas de estudio (según Tabla 4.7) y la de *S. avermitilis*, lo que indicaría que a pesar de ser un BGC distribuido en varias especies de *Streptomyces*, el mismo no ha sido identificado.

Por último, se destaca que aún realizando este nuevo re-agrupamiento incluyendo otras cepas relacionadas, se observaron 30 BGCs de las cepas de nuestra colección que no se agrupan en ninguna familia (*singletons*), sugiriendo una alta proporción de BGCs novedosos. La distribución de dichos BGCs según su tipo en las 5 cepas se muestra en el gráfico de la Figura 4.12, encontrándose entre 3 y 9 BGCs en cada una de ellas.

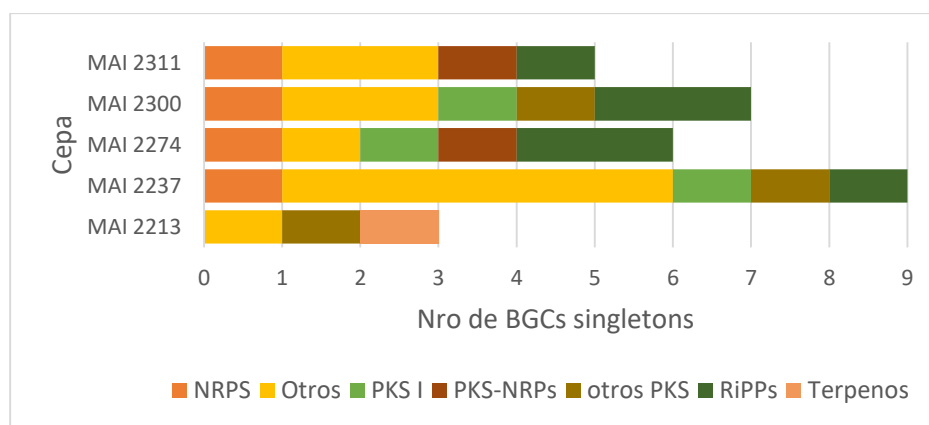


Figura 4.12. Distribución de los BGCs solitarios (*singletons*) en las 5 cepas luego del reagrupamiento por BiGSCAPE incluyendo las cepas más similares filogenéticamente y la cepa de referencia de *S. avermitilis* (MA-4680).

4.3.7 Análisis metabolómico: construcción de redes moleculares

Se llevó a cabo el experimento “*Classical Molecular Networking*” según se detalla en materiales y métodos. Se utilizaron los datos espectrales obtenidos de 18 muestras (5 cepas crecidas durante 7 días en 3 medios de cultivos y sus respectivos controles). Las muestras

de las 5 cepas cultivadas en el medio SCN se excluyeron del análisis debido a inconvenientes presentados durante el crecimiento bacteriano en dicho medio. Los perfiles químicos de cada cepa fueron analizados agrupándolos según el medio de cultivo y los controles respectivos sin inocular fueron utilizados como “blancos”. En la Figura 4.13A, se muestra el análisis interactivo de coordenadas principales (PCoA), donde se observa que el medio de cultivo tuvo un efecto importante en los perfiles químicos obtenidos. En la Figura 4.13B se representa la cantidad de nodos compartidos y únicos entre los diferentes medios de cultivo (cada nodo corresponde a un ión parental). Se observa una mayor proporción de nodos específicos de cada medio de cultivo en relación con el número de nodos compartidos entre dos o más condiciones de crecimiento. La muestra correspondiente a la cepa MAI 2274 en medio TSB no pudo incorporarse al análisis debido a que no fue inyectada en el equipo.

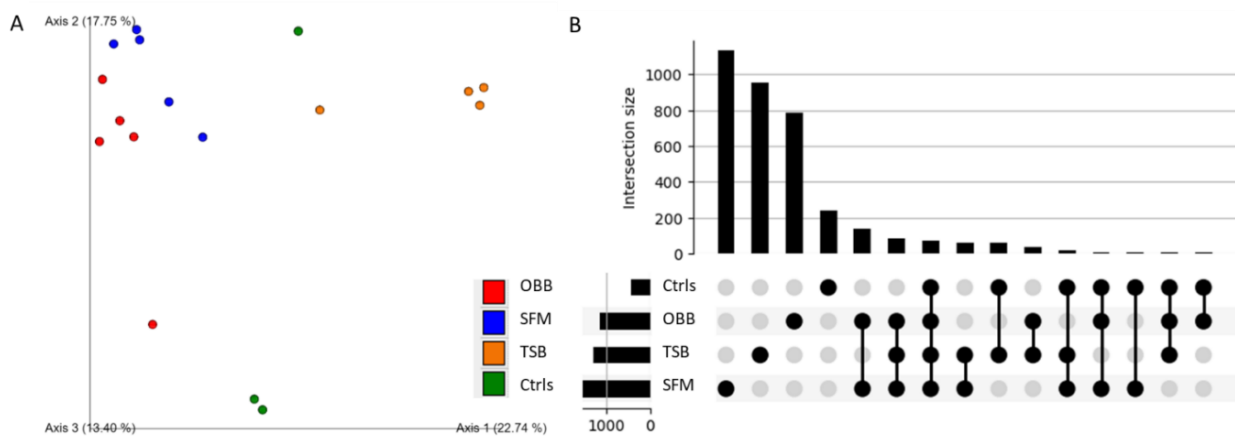


Figura 4.13. Gráficos de los perfiles químicos obtenidos en GNPS a partir de los espectros de LC-MS/MS de los sobrenadantes de cultivo de 5 cepas de *Streptomyces* incubadas en tres medios (OBB, SFM y TSB) y sus respectivos controles sin inocular. (A) Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) en qiime2view. (B) Gráfico de intersección entre los diferentes extractos.

En la Figura 4.14 se muestra la red molecular resultante del análisis de los 15 extractos (5 cepas en 3 medios de cultivo), donde se identificaron un total de 3613 nodos o iones parentales. Se excluyeron 421 nodos del análisis ya que correspondían a iones parentales presentes en los controles de los medios de cultivo, quedando un total de 3192 iones

parentales producidos por las 5 cepas en las tres condiciones. Del total de nodos presentes en la red molecular, sólo el 2,6% (84) fueron producidos en los tres medios de cultivo y sumado al 7,5% (238) producidos en dos medios de cultivo, representan a aquellos compuestos no específicos del medio. De estos últimos, la mayor parte de ellos (137) están compartidos entre los medios OBB y SFM. Se observó una gran especificidad de los compuestos producidos según el medio de cultivo, siendo el 35,5% (1133) producidos exclusivamente en SFM, 29,8% (952) en TSB y 24,6% (785) en OBB. Esto implica que los perfiles de metabolitos secretados por las cepas están determinados por las condiciones de crecimiento y los sustratos presentes en cada medio, que son los que actúan como precursores para la biosíntesis. Por otra parte, si se considera la distribución en función de las cepas, se observa una alta predominancia de nodos específicos de cada una de las cepas, siendo el 21,7 % (692) producidos por MAI 2213, el 19,1 % (609) por MAI 2311, el 18,6 % (593) por MAI 2300, el 17,3 % (552) por MAI 2237 y el 11 % (351) por MAI 2274. A su vez, se obtuvieron 43 nodos (1,3 %) compartidos por todas las cepas analizadas (Figura 7, Anexo IV).

Como se puede observar en la Figura 4.14, hay varios compuestos que están relacionados y dan lugar a familias moleculares (FMs), las cuales están formadas por dos o más nodos. Se identificaron un total de 127 FMs, que incluyeron 731 nodos, que representan un 22,9% del total de nodos identificados. A su vez hay 2461 compuestos (77,1%) que no fueron agrupados en ninguna familia (*singletons*), indicando que su patrón de fragmentación no se correlacionó con ningún otro ión parental. Los resultados dados por el flujo de trabajo MolNetEnhancer dieron lugar a la anotación de 11 clases químicas putativas en la red molecular y varios nodos quedaron sin anotación según este abordaje (Figura 8, Anexo IV).

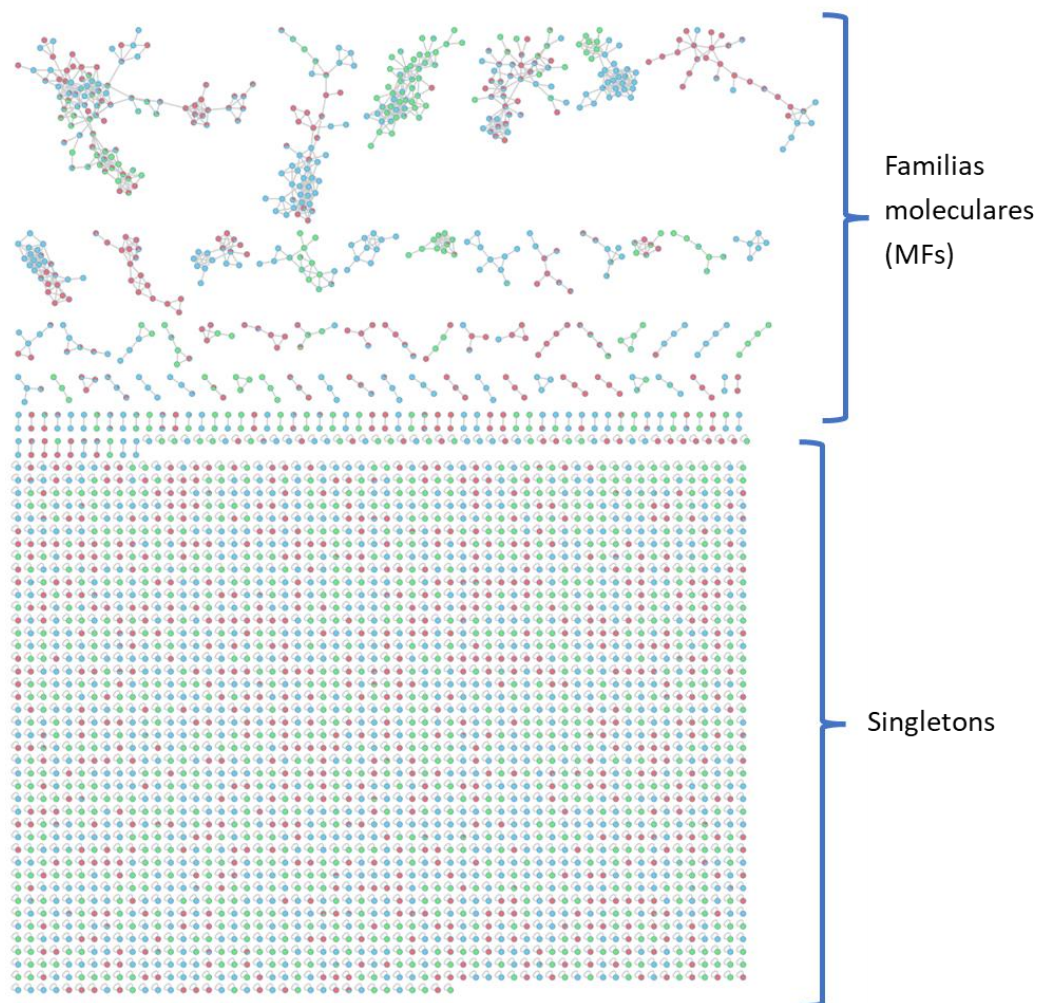


Figura 4.14. Red molecular generada en GNPS con los espectros de fragmentación resultante del análisis por LC-MS/MS obtenidos de los sobrenadantes de cultivo de 5 cepas de *Streptomyces* incubadas en 3 medios de cultivo. Los nodos están coloreados según el medio de cultivo, siendo SFM (celeste), OBB (rosado) y TSB (verde). Cada nodo corresponde a un ión precursor, y los puentes entre nodos indican compuestos similares dando lugar a las familias moleculares (MFs). Se observa una gran cantidad de nodos que no fueron relacionados a ningún otro ión precursor de la red en estas condiciones (*singletons*). Figura creada en Cytoscape. En la Figura 7 del Anexo IV, se muestra la misma imagen, pero referenciada según la cepa.

4.3.8 Compuestos bioactivos candidatos en base a coincidencias obtenidas con bibliotecas de GNPS y su conexión con sus BGCs

Como era de esperar, la mayoría de los nodos no tuvieron coincidencias con las bibliotecas de GNPS. Sin embargo, 455 nodos sí coincidieron con anotaciones putativas (IDs) de las bibliotecas espectrales (el 15% del total de nodos). Esta correlación entre los IDs de las bibliotecas y los posibles compuestos presentes en las muestras analizadas permitió comparar nuestros datos espectrales contra los de compuestos ya depositados y/o identificados en la base de datos en base a un valor de “similitud” (coseno). Del total de familias moleculares identificadas en la red (127), 45 de ellas (35%) presentaron coincidencias con espectros de las bibliotecas de GNPS. En la Tabla 4.10 se resumen algunas de las coincidencias relevantes con su valor de coseno, los picos compartidos entre el espectro obtenido y el de la librería, el valor m/z del precursor (del espectro obtenido y el de la librería), el aducto correspondiente y en qué muestras se encontró. Para complementar esta información, en la Figura 4.15 se muestra la comparación especular entre el espectro obtenido y el de la librería (*mirror match*), donde el espectro de la librería se muestra abajo (en verde) junto con su estructura química. A continuación, se describen algunos compuestos candidatos y relevantes para este trabajo.

El ión parental m/z 571,248 producido por la cepa MAI 2237 en medio SFM, mostró similitud espectral con el espectro de la biblioteca GNPS CCMSLIB00004721134 (aducto M+K) que corresponde a la Antimicina A1 (Tabla 4.10, Figura 4.15). En este caso, la coincidencia está basada en un valor de coseno de 0,71 y 72 picos compartidos. Este compuesto forma parte de una de las familias moleculares identificadas en la red molecular (Figura 4.16), que abarca 16 nodos encontrados en las muestras de la cepa MAI 2237 producidos en los medios OBB y SFM. Este resultado se encuentra sustentado además por el análisis genómico, a partir del cual se identificó en la cepa MAI 2237 un *cluster* genético de gran similitud con el reportado para la biosíntesis de antimicinas (Tabla 4.9, Figura 4.9). A través de la integración de estos resultados, se puede inferir que este BGC es expresado cuando la cepa se cultiva en los medios OBB y SFM, produciendo metabolitos asociados con la familia

de las antimicinas. En el Capítulo 5 se profundiza en el análisis de este cluster genético y su relación con la actividad nematocida frente a *C. elegans*.

Por otro lado, el ión parental m/z 175,34 tuvo similitud con el ácido indol-acético (IAA) de la base de datos NIST14 (M+H, CCMSLIB00003135786). La coincidencia está basada en un valor de coseno de 0,80 y 19 picos compartidos. El IAA se encontró en 3 cepas, MAI 2300, MAI 2311 y MAI 2237 en el medio TSB y además en la cepa MAI 2237 también se encontró en los medios OBB y SFM. La producción de IAA está relacionada con la promoción de crecimiento vegetal y fue verificada en el Capítulo 3 (Tabla 3.3) mediante ensayos colorimétricos y cromatografía líquida acoplada a UV (HPLC-UV). En la Figura 4.16 se puede ver que este compuesto forma parte de una gran familia molecular formada por 48 nodos que incluye 480 espectros en total. Dentro de esta familia, el 48% de los nodos presentaron coincidencias con otros compuestos de las bases de datos, donde algunos de ellos corresponden a derivados indólicos. Este resultado se sustenta con la presencia de los genes correspondientes a la síntesis de IAA identificados durante la anotación de los genomas de las cepas MAI 2237, MAI 2274, MAI 2300 y MAI 2311.

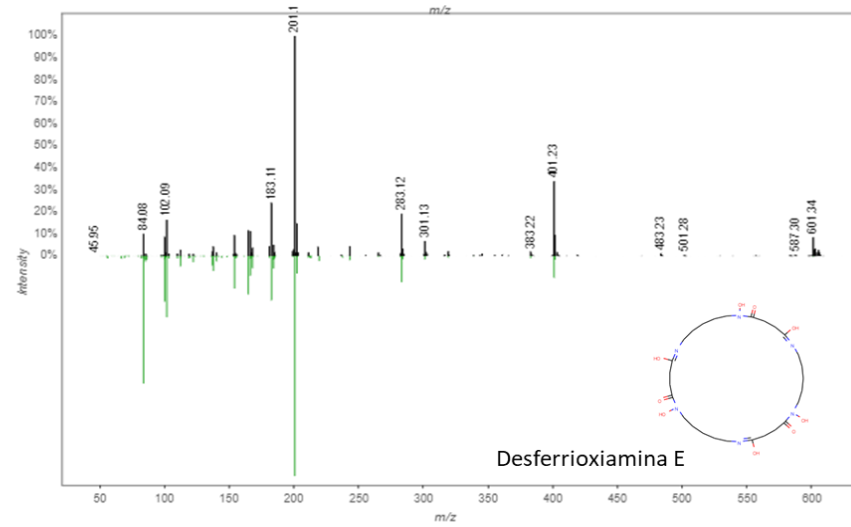
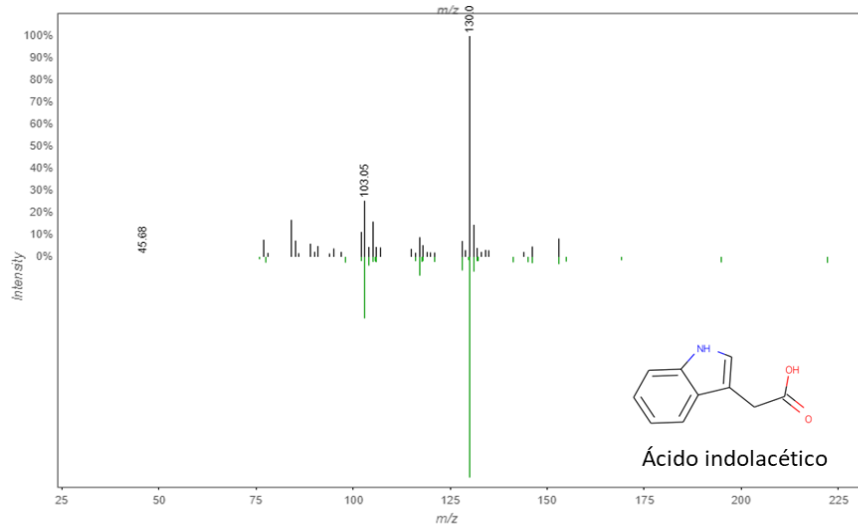
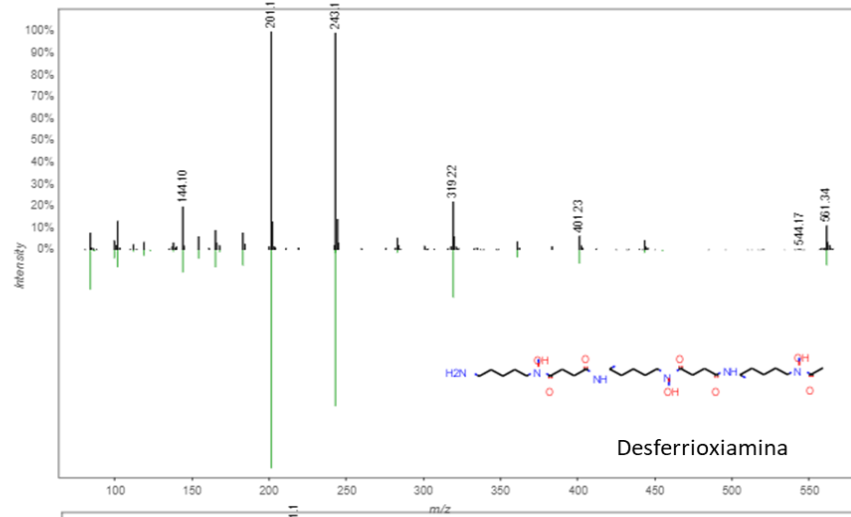
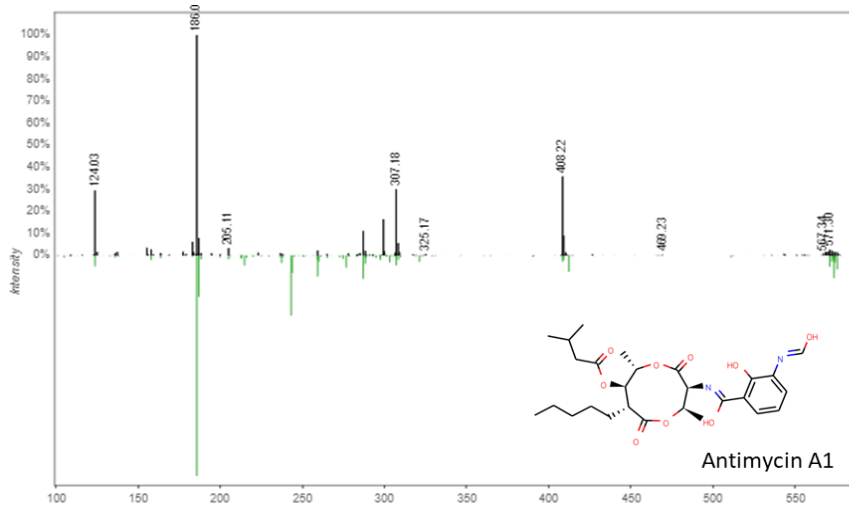
Otra de las coincidencias relevantes fue con metabolitos del grupo de las desferroxiaminas, que son sideróforos con una gran diversidad estructural y altamente representados en las diferentes bases de datos que utiliza GNPS. Por ejemplo, el ión parental m/z 601,47 presentó coincidencia con el aducto M+H de la desferroxiamina E (CCMSLIB00004695126) de la biblioteca MoNA, con el cual se estableció un valor de coseno de 0,85 y 71 picos compartidos (Tabla 4.10, Figura 4.15). También se obtuvieron coincidencias con otras desferroxiaminas presentes en bases de datos (Tabla 4.10). Estos metabolitos fueron agrupados en dos familias moleculares conformadas por 49 y 15 nodos, que en su conjunto abarcan a todas las cepas y condiciones de cultivo, excepto a la cepa MAI 2311 (Tabla 4.10, Figura 4.16). Estos hallazgos se correlacionan también con los obtenidos a partir del análisis por minería genómica en donde se identificaron BGCs asociados a la biosíntesis de desferroxiaminas en todas las cepas analizadas. Además, en este caso la desferroxiamina E identificada en la biblioteca MoNA está conectada con el BGC 940 identificado en MIBiG

como BGC de la desferrioxamina de *S. coelicolor*. Dicho BGC está presente en la familia GCF 894 que agrupa a las 5 cepas de *Streptomyces* de nuestra colección (Figura 4.7 y 4.8).

Finalmente, podemos mencionar que se identificaron varios compuestos que podrían explicar la actividad antimicrobiana detectada en estas cepas en el marco de otros trabajos (tesis de Maestría de M. Pérez). Entre ellos se incluyen por ejemplo la germicidina, sarmentoside B, entre otros. A su vez, estos datos se pueden conectar con los resultados obtenidos por análisis de los BGCs de los genomas; y así establecer el nexo entre genoma-metaboloma. Por ejemplo, el BGC de la germicidina se encontró en todas las cepas (excepto MAI 2213), y en este análisis metabolómico también se observó la coincidencia con la germicidina en todas las cepas a excepción de MAI 2213 (Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Coincidencias relevantes encontradas con IDs de las bibliotecas de GNPS.

Compuesto	Picos compartidos	Coseno	m/z espectro	m/z librería	aducto	Medio/cepa
Ácido indol-acético	19	0,80	175,34	176,07	M+H	OBB 2237 TSB 2300, 2311, 2237 SFM 2237
Antimicina A1	72	0,71	571,25	573,22	M+K	SFM 2237
Desferrioxamina E	71	0,85	601,47	601,35	M+H	TSB 2300, 2237, 2213 SFM 2300, 2237, 2274 OBB 2237
Desferrioxamina E	89	0,75	637,54	639,31	M+K	TSB 2237 SFM 2237
Desferrioxamina	20	0,86	561,27	561,36	M+H	SFM 2300, 2274, TSB 2213
Germicidina A	35	0,74	197,11	197,12	M+H	OBB 2237, 2274, 2300 SFM 2311, 2300, 2237
Sarmentoside B	90	0,85	663,53	665,32	M+H	OBB 2213, 2237, 2274, 2300, 2311



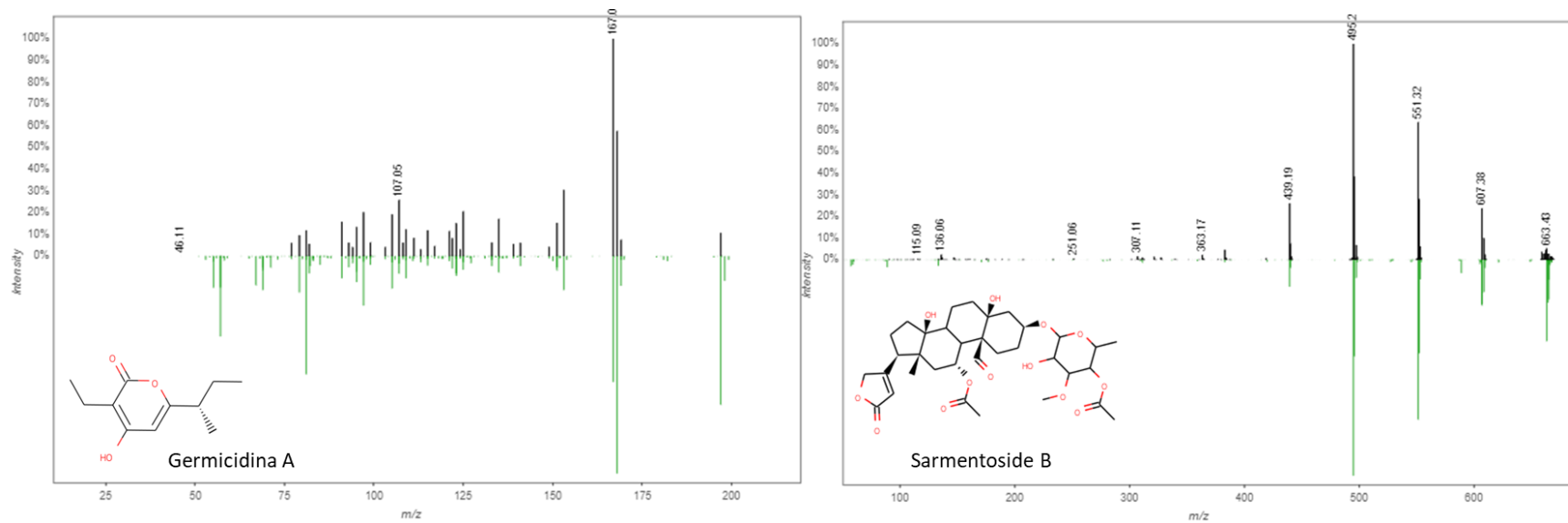


Figura 4.15. Coincidencias con algunos IDs de las bibliotecas de GNPS (*Mirror matches*). El espectro obtenido se muestra en negro y el de la biblioteca en verde junto con su estructura química.

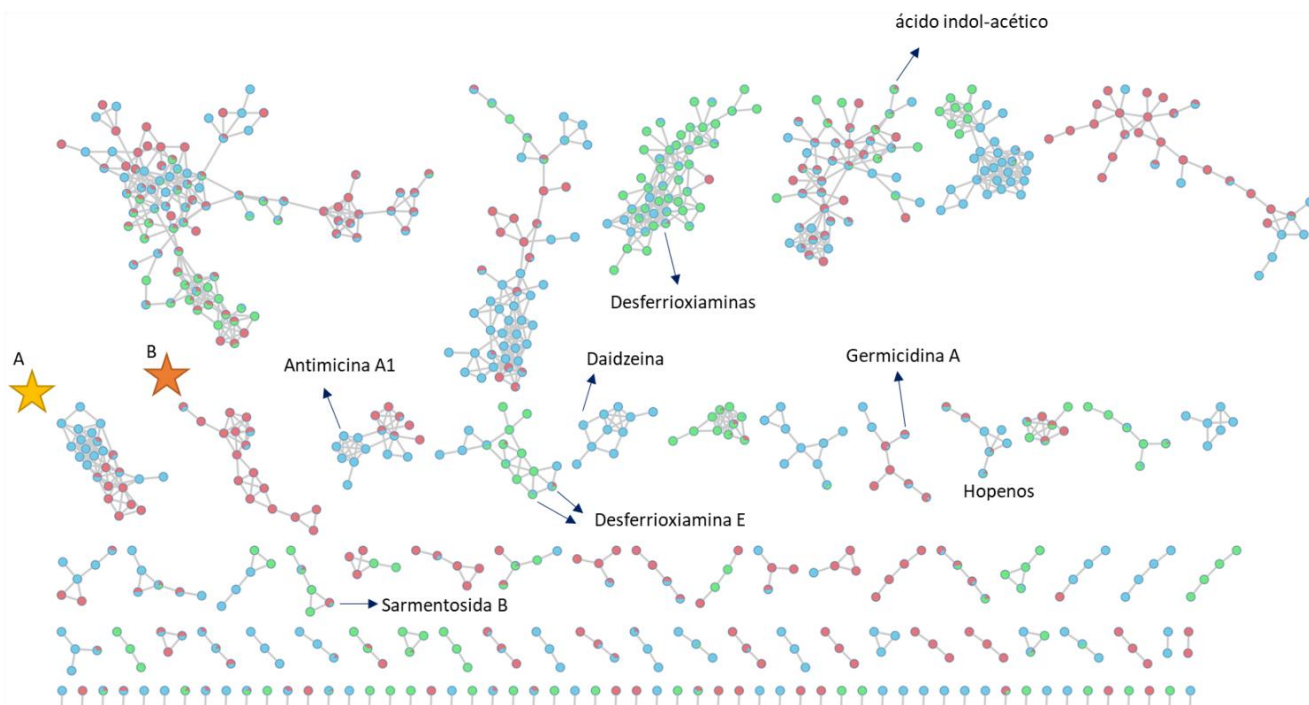


Figura 4.16. Familias moleculares con algunas coincidencias de las librerías obtenidas mediante GNPS con los datos de MS/MS de las 5 cepas en los tres medios de cultivo. Los nodos están coloreados según el medio de cultivo, siendo SFM (celeste), OBB (rosado) y TSB (verde). Cada nodo corresponde a un ión precursor, y se señalan algunos que presentaron coincidencia con compuestos de las bibliotecas de GNPS. Las estrellas indican algunas familias que no presentaron coincidencias con IDs de las bibliotecas.

Finalmente, se identificaron algunas familias moleculares que no presentaron coincidencias con las bibliotecas de GNPS, indicando estructuras novedosas. Por ejemplo, la estrella A corresponde a metabolitos producidos por la cepa MAI 2274 y abarca 125 espectros en 25 nodos que están en el rango de m/z de 434 a 799 (Figura 4.16). La estrella B corresponde a metabolitos producidos por la cepa MAI 2311 y abarca 101 espectros en 17 nodos que están en el rango de m/z de 293 a 362. Ambas familias corresponden a metabolitos producidos en los medios OBB y SFM.

4.3.9 Búsqueda de compuestos nematocidas en la base de datos del NPAtlas

Como alternativa a los abordajes realizados utilizando la plataforma GNPS, se utilizó la base de datos de productos naturales NPAtlas (van Santen et al., 2022). Este análisis se realizó como abordaje complementario ya que esta base de datos incluye una gran variedad de productos naturales microbianos únicamente. Para ello se consideraron las muestras que presentaron actividad nematocida muy alta como se indica en el capítulo 3. Como estrategia se compararon los valores de $M+H^+$ de los iones precursores obtenidos a partir de los datos espectrales. En la Tabla 4.11 se resumen las coincidencias obtenidas indicando el valor del ión precursor encontrado en la muestra y en la base de datos, corroborando si dichos precursores se encontraban en las muestras.

En la mayoría de los casos estas coincidencias obtenidas fueron con metabolitos producidos por especies de *Streptomyces* aunque también se encontraron asociaciones con metabolitos producidos por otros géneros bacterianos. En el caso de la muestra MAI 2213 OBB, se encontraron dos coincidencias, una corresponde a metabolitos producidos una cianobacteria (*Symploca* sp.) y otra a una especie del género bacteriano *Arenibacter*. En el caso de la muestra 2274 SFM, todas las coincidencias fueron con compuestos reportados producidos por especies de *Streptomyces*. Estos compuestos, fueron localizados en la red molecular previamente obtenida por GNPS para complementar la información de ambos abordajes (Figura 4.17). Tres de los nodos correspondientes a los valores de m/z de los compuestos de la Tabla 4.11 se ubicaron en familias distintas, mientras que los otros tres fueron singletons. Por ejemplo, el nodo con el valor m/z 552,292 coincidió con el de la lemonicina en el NP atlas y en GNPS no tuvo coincidencias, y es uno de los nodos que forma una de las familias “desconocidas” de la red molecular obtenida en GNPS (Figura 4.16). Se realizó una búsqueda bibliográfica para buscar las posibles funciones de estos compuestos, la cuales se indican en la Tabla 4.11. A modo general, la mayoría de los compuestos detectados están reportados por su actividad antimicrobiana y antitumoral.

Tabla 4.11. Coincidencias obtenidas en las muestras con actividad nematocida en el NP atlas.

Muestra	ión precursor muestra (M+H ⁺)	Nro de ID (npaid)	Nombre	ión precursor NPatlas (M+H ⁺)	Fórmula química	Especie de origen	Actividades reportadas y referencia
2274 SFM	334,201	NPA001957	Sin nombrar	334,2013	C ₁₉ H ₂₇ NO ₄	<i>Streptomyces sp. Hd7-21</i>	Antitumoral (Liu et al., 2015)
2274 SFM	334,201	NPA006583	Glaciapirrol A	334,2013	C ₁₉ H ₂₇ NO ₄	<i>Streptomyces sp. NPS008187</i> (sedimentos marinos)	Antitumoral (Macherla et al., 2005)
2274 SFM	334,201	NPA021527	A-503451 B	334,2013	C ₁₉ H ₂₇ NO ₄	<i>Streptomyces sp. SANK 60101</i> (suelo)	Activadores muy potentes de HIF (factores inducibles de hypoxia) (Hirota-Takahata et al., 2016)
2274 SFM	334,201	NPA021528	A-503451 D	334,2013	C ₁₉ H ₂₇ NO ₄	<i>Streptomyces sp. SANK 60101</i> (suelo)	Activadores muy potentes de HIF (factores inducibles de hypoxia) (Hirota-Takahata et al., 2016)
2274 SFM	481,212	NPA007882	Sin nombrar	481,2122	C ₃₀ H ₂₈ N ₂ O ₄	<i>Streptomyces sp. BCC26924</i>	Antimalaria, antituberculosis, citotóxico, antifúngico (Intaraudom et al., 2011)
2274 SFM	552,292	NPA010058	Lemonicina	552,2916	C ₂₇ H ₄₁ N ₃ O ₉	<i>Streptomyces candidus</i>	Antibiótico (He et al., 2000)

2213 OBB	310,193	NPA027332	Jantielamida A	310,1932	C ₁₈ H ₂₈ ClNO	<i>Symploca sp</i> (cianobacteria)	Bloquea los canales de sodio (Nunnery et al., 2012)
2213 OBB	380,197	NPA002459	Sin nombrar	380,1969	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₃	<i>Arenibacter nanhaiticus</i>	Antimicrobiano (Chen et al., 2013)

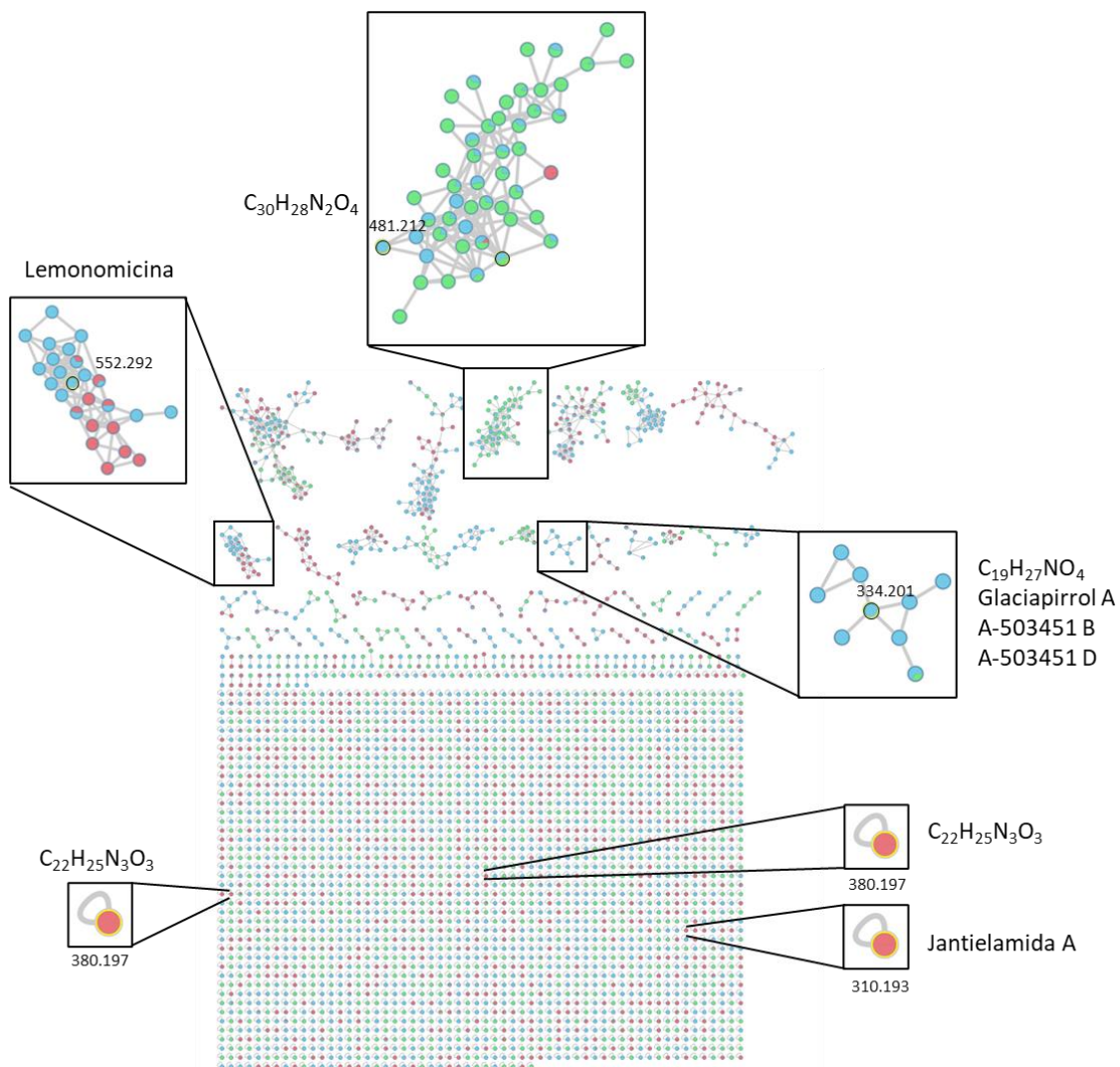


Figura 4.17. Red molecular obtenida con GNPS. Se destacan los nodos de los iones precursores que presentaron coincidencias en la comparación con los valores de M+H de la base de datos del NPAtlas. Se indica junto al nodo el nombre o la estructura de la coincidencia encontrada.

4.4 Discusión

El uso de la información genómica junto con la información química es una buena aproximación en el descubrimiento de productos naturales. A pesar de los avances en las herramientas de análisis y plataformas para estudios metabolómicos y genómicos, el nexo entre estas dos fuentes de información aún es un cuello de botella en la priorización de cepas y descubrimiento de productos naturales (Soldatou et al., 2021). En este capítulo nos centramos en el estudio de 5 cepas de nuestra colección que fueron seleccionadas en base a su actividad nematocida y de promoción de crecimiento vegetal. Se utilizaron diferentes herramientas de análisis genómico y metabolómico para la determinación de compuestos bioactivos y los *clusters* genéticos involucrados en su biosíntesis.

La combinación de diferentes plataformas de secuenciación y herramientas de ensamblaje permitió obtener los genomas completos y de alta calidad para las cinco cepas seleccionadas. En el caso de *Streptomyces*, esto es un proceso muy desafiante debido al mayor tamaño de su genoma en comparación con otras bacterias y la baja fidelidad de la secuenciación cuando se tiene secuencias con un alto contenido en GC y secuencias repetitivas (Lee et al., 2020). Además, es la razón por la cual aproximadamente el 90% de los genomas de *Streptomyces* disponibles en bases de datos están incompletos. En genomas fragmentados que contienen muchos *contigs* pequeños, es probable que un mismo BGC quede distribuido en varios *contigs* lo que dificulta su detección mediante las herramientas bioinformáticas disponibles. De hecho, debido a su organización repetitiva, los genes que codifican policétido sintasas (PKS) y sintetisas no ribosómicas (NRPS) se localizan muy a menudo en los extremos de los *contigs*. La precisión también es importante, ya que cuando hay errores de lectura dentro de un BGC puede ocurrir la omisión o la duplicación de módulos NRPS o PKS, especialmente cuando son muy similares en secuencia. Estos errores también pueden dar lugar a intercambios que interfieren en el verdadero orden de los genes o de los dominios de las proteínas (van der Hooft et al., 2020).

Debido a que Nanopore genera lecturas mucho más largas que Illumina (alrededor de 5.000 pb contra 150 pb) el ensamblaje a partir de las primeras es más eficiente y permite generar un menor número de *contigs*. Sin embargo, la tasa de error de Illumina es menor que la de Nanopore, por lo cual el ensamblaje híbrido es la mejor opción para estos casos (Salvà-Serra et al., 2020). Si bien la secuenciación de las mismas cepas por las tres tecnologías no se realizó por razones económicas, al comparar los resultados de los ensamblajes híbridos con respecto a los obtenidos mediante PacBio, se observan ensamblajes similares (de pocos *contigs*) y con buenos parámetros de calidad y completitud.

Se utilizaron diferentes metodologías para la identificación taxonómica de las cepas con alta coincidencia entre ellas. De las 5 cepas, sólo se logró la identificación de una de ellas, la cepa MAI 2213 como *Streptomyces misionensis* y se establecieron las relaciones taxonómicas más cercanas en las restantes. Este resultado es otra demostración de la complejidad taxonómica que caracteriza al género *Streptomyces* y a la diversidad existente entre las cepas utilizadas.

Los resultados de la predicción de BGCs obtenida por antiSMASH en las cepas seleccionadas permitieron identificar entre 25 y 33 BGCs por cada cepa. Tanto el número como la categorización de estos *clusters* está en concordancia con resultados obtenidos para otras cepas de *Streptomyces* en estudios previos (Vicente et al., 2018). La mayoría de los BGCs predichos tienen muy poca o nula similitud con los ya reportados en MIBiG. Este resultado sugiere la existencia de nuevos BGCs, y sostiene la idea de la gran diversidad de metabolitos que presenta este género que aún no han sido descubiertos.

Una de las estrategias desarrolladas para analizar los BGCs presentes en las cepas seleccionadas, fue enfocarse en aquellos BGCs que presentaron alta similitud de genes con otros reportados en MIBiG (Tabla 4.9). La búsqueda bibliográfica dedicada a estos BGCs demostró que gran parte de ellos conforman las vías de síntesis de metabolitos comúnmente producidos por cepas de *Streptomyces*, incluyendo la geosmina, ectoína, melanina, pigmentos y hopanoides. También se destacan los BGCs asociados a la biosíntesis

de sideróforos, particularmente al grupo de las desferroxiaminas, las cuales están ampliamente distribuidas en los genomas de *Streptomyces* y fueron identificadas en las cinco cepas seleccionadas (Takano et al., 2016; Sathya et al., 2017). Este hallazgo se correlaciona con la actividad de captación del hierro que fue detectada para todas las cepas en el Capítulo 3. También se verificó la expresión de estos BGCs mediante ensayos metabolómicos que lograron detectar la posible presencia de estos compuestos en los extractos de los sobrenadantes de cultivo de estas cepas.

Por otro lado, se encontraron BGCs involucrados en la biosíntesis de metabolitos más específicos y que en base a caracterizaciones previas, podrían estar asociados a las actividades biológicas encontradas en estas cepas. En las cepas MAI 2237 y MAI 2311 se identificó un BGC con alta similitud al *cluster* involucrado en la síntesis de alkylresorcinoles, un grupo de lípidos fenólicos producidos por diversas plantas y que también se han reportado en algunas bacterias incluyendo *Streptomyces* (Zabolotneva et al., 2022). Se han descrito varias actividades biológicas para este tipo de productos naturales, incluyendo su actividad como antimicrobianos, antiparasitarios, antitumorales, antioxidantes, así como reguladores de procesos metabólicos e inmunológicos, entre otras actividades de interés (Stasiuk y Kozubek, 2010; Sampietro et al., 2013; Zabolotneva et al., 2022). En base al amplio espectro de actividades reportadas, este tipo de compuestos podría tener vinculación con la actividad nematocida y antimicrobiana de ambas cepas.

En la cepa MAI 2300, se encontró un BGC con 100% de similitud con la neopolioxina C, la cual tiene actividad antifúngica reportada (Kobinata et al., 1980). Dado que no se encontró dicha actividad en esa cepa (tesis de maestría de Martín Pérez), se postula que puede ser un ejemplo de BGC silencioso, es decir que no se expresó en las condiciones del bioensayo. También se destaca la existencia de BGCs reportados para la biosíntesis de RiPPs, los cuales conforman un gran grupo de productos naturales bioactivos que son una fuente prometedora de productos novedosos (Arnison et al., 2013). Por ejemplo, en las cepas MAI 2274, MAI 2300 y MAI 2311 se encontró el BGC involucrado en la biosíntesis del lantipeptido informatipeptina, y en la cepa MAI 2300 también se encuentra presente el BGC del

lassopéptido citrulassina. Existen escasos reportes de actividad biológica de estos metabolitos y podrían ser buenos candidatos para profundizar en futuros estudios (Mohimani et al., 2014; Tietz et al., 2017; Cheng y Hua, 2020).

Otro BGC identificado en la cepa MAI 2237 presentó un 100% de similitud respecto al *cluster* involucrado en la biosíntesis de antimicinas en *Streptomyces argillaceus* (Becerril et al., 2018). Las antimicinas son una familia de compuestos que actúan inhibiendo la respiración mitocondrial a nivel del complejo III (citocromo C reductasa) de la cadena de transporte de electrones, por lo que resulta un compuesto altamente tóxico que ha sido usado como fungicida, insecticida y acaricida (Van Der Heul et al., 2018). En base a los antecedentes reportados se planteó a este compuesto como posible responsable de la actividad nematocida en la cepa MAI 2237 y se procedió a la construcción de un mutante del tipo *knock-out* que se detalla en el Capítulo 5.

La visualización en forma de redes moleculares facilita los análisis complejos que involucran gran cantidad de datos. En este capítulo, esta estrategia fue adoptada tanto para la visualización de los datos genómicos (con la herramienta BiG-SCAPE), como para los datos metabolómicos (en la plataforma GNPS). En ambos casos, permitió encontrar datos desconocidos *a priori* que se relacionaron con otros datos sí conocidos (bibliotecas o bases de datos) y así establecer similitudes entre grupos de genes o compuestos químicos, respectivamente.

La herramienta BiG-SCAPE permitió agrupar 81 de los 142 BGCs de las 5 cepas analizadas en 26 familias, quedando 61 sin agrupar (*singletons*). La aplicación de este enfoque al conjunto de datos analizados en este capítulo ha dejado en claro que existe un gran número de GCFs de función desconocida para los cuales es muy difícil estimar las estructuras o funciones de sus productos. Este resultado es similar a lo reportado en otros estudios similares, generalmente abarcando un conjunto de datos aún mayor (van der Hooft et al., 2020). Un ejemplo es el de la familia GCF 1976, la cual relacionó BGCs del tipo RiPPs en las 5 cepas de nuestra colección sin incluir ninguno de MIBiG. También se identificaron dos

GCFs categorizadas como sideróforos, pero que no se asocian con ninguna de las estructuras ya reportadas con esta función.

Al comparar la estructura y organización de los BGCs pertenecientes a una misma familia, se observó que los BGCs de las cepas de estudio eran más largos que los BGCs reportados integrantes de la familia, como se muestra para los ejemplos de las familias correspondientes a sideróforos y a las antimicinas (Figuras 4.8 y 4.9). Es importante tener en cuenta que la mayoría de los algoritmos actuales de identificación de BGCs no han sido diseñados para predecir los bordes exactos de los *clusters*. AntiSMASH, por ejemplo, adopta un enfoque codicioso y extiende la región del BGC aguas arriba y aguas abajo de los genes biosintéticos centrales para asegurar la inclusión de todos los genes codificadores de enzimas funcionales importantes (van der Hooft et al., 2020).

La información generada en esta tesis sobre el *pool* de nuevos BGCs o de BGCs relacionados a productos naturales de interés, sienta las bases para continuar caracterizando este reservorio genético para la identificación de nuevos metabolitos microbianos bioactivos. En el caso los RiPPs, se han desarrollado herramientas bioinformáticas diseñadas específicamente para este tipo de compuestos, por ejemplo, RiPPquest, RODEO, entre otros (Mohimani et al., 2014; Tietz et al., 2017). Como perspectiva de esta tesis se propone caracterizar estos BGCs candidatos seleccionados, verificar su expresión en condiciones de cultivo y su rol en las actividades evaluadas mediante estudios funcionales y de ingeniería genética. Además de la red de similitud de secuencias, el análisis filogenético ofrece una técnica adicional para mapear la diversidad biosintética. La herramienta *CORASON* (*CORE Analysis of Syntenic Orthologs to prioritize Natural Product Biosynthetic Gene Clusters*), permite identificar BGCs que comparten un “core” común y reconstruye filogenias multi-locus de esos clusters genéticos para explorar sus relaciones evolutivas (Navarro-Muñoz et al., 2020).

Los avances en técnicas analíticas, especialmente en metabolómica basada en EM, han permitido investigar extractos metabólicos de alta complejidad. Se han reportado

numerosos estudios donde la EM es utilizada para analizar extractos de *Streptomyces* para la búsqueda de nuevas drogas (Leão et al., 2021a; Soldatou et al., 2021). En este Capítulo, se llevó a cabo un análisis metabolómico basado en MS/MS de las 5 cepas cultivadas en 3 medios diferentes. Se construyó así, una red molecular de 15 extractos metabólicos derivados de 5 cepas bacterianas previamente evaluadas en base a algunas actividades biológicas de interés. Los resultados mostraron especificidad del medio de cultivo y la potencial presencia de metabolitos novedosos.

Está comprobado que el medio y las condiciones de cultivo tienen un importante efecto en la biosíntesis de metabolitos en cepas de *Streptomyces*, siendo necesario optimizar estas condiciones para cada metabolito de interés (Kaur y Manhas, 2014; Kaur et al., 2016). El medio de cultivo resulta esencial ya que allí se encuentran los precursores biosintéticos y en el caso de *Streptomyces* comúnmente se recomienda el uso de medios con componentes de origen vegetal para favorecer su producción (Li et al., 2010). En este trabajo se utilizaron los extractos provenientes de tres medios de cultivo: OBB que tiene harina de avena como principal componente; SFM, que tiene harina de soja y manitol; y TSB, que tiene triptona de soja. Se observó una gran predominancia de metabolitos producidos específicamente en cada uno de los medios de cultivo, respecto a los metabolitos producidos en más de un medio. Esto resalta la importancia de evaluar varias condiciones de cultivo para ampliar el espectro de metabolitos producidos.

Si bien la metabolómica tiene como objetivo capturar todos los metabolitos producidos por un organismo, en la práctica esto es imposible debido a la gran cantidad de pasos durante el flujo de trabajo típico de metabolómica no dirigida (*untargeted*) (Aron et al., 2020). Para empezar, la extracción a partir de los sobrenadantes de cultivo es un primer filtro y la polaridad del solvente utilizado tendrá un efecto sobre los metabolitos recuperados. En este trabajo se utilizó acetato de etilo, que es un solvente polar, inmiscible con agua y es muy utilizado por su bajo costo y peligrosidad (Senges et al., 2018; Soldatou et al., 2021). Además, para el análisis MS/MS se debe establecer un rango de valores de relación masa/carga, que dependiendo de la composición química de los metabolitos presentes y

del método de ionización utilizado puede llegar a limitar el análisis. En este trabajo se estableció una ventana amplia de relaciones m/z 50 a 2000 que nos permitió abarcar a los principales tipos de metabolitos producidos. La cantidad y calidad de espectros de masas obtenidos depende también de la capacidad de fragmentación de los metabolitos en las condiciones experimentales. De hecho, algunas clases de compuestos (por ejemplo, policétidos) son más difíciles de romper que otras (por ejemplo, péptidos y sacáridos) debido a la naturaleza de los enlaces que conectan los monómeros subyacentes. Por lo tanto, los ajustes de adquisición de datos de masas pueden dificultar la coincidencia correcta de los espectros experimentales con los espectros de bibliotecas. Además, para detectar un metabolito en el espectrómetro de masas, el mismo debe ionizarse y no todos los metabolitos se ionizan tan fácilmente (van der Hooft et al., 2020).

La plataforma GNPS permitió explorar y analizar el set de datos espectrales obtenidos. Permitted la anotación de compuestos a través de la comparación con bibliotecas y la organización de los compuestos (iones detectados) en familias moleculares a través de la construcción de redes moleculares. La confiabilidad de este procedimiento de emparejamiento depende de muchos factores que incluyen datos experimentales de calidad y contenido espectral dependiente del instrumento y modo de adquisición utilizado (Huber et al., 2021). Además, aunque las bibliotecas espectrales están creciendo continuamente, su contenido está lejos de cubrir todos los productos naturales existentes (Da Silva et al., 2015). Por ejemplo, las bibliotecas espectrales de GNPS actualmente contienen espectros de referencia de MS/MS para aproximadamente el 2,5 % de los productos naturales conocidos (van der Hooft et al., 2020). En este trabajo, las coincidencias encontradas representaron únicamente el 15% del total (455 de 3192 nodos) y este valor es mucho menor si se utilizan parámetros más estrictos. Estos resultados coinciden también con lo reportado en literatura, donde se estima que, en la práctica, menos del 5% de las entidades químicas totales en una muestra pueden anotarse de manera confiable a nivel estructural (Da Silva et al., 2015). La base de datos del NPAtlas constituye otra herramienta de comparación, que sería muy útil incorporar en la misma plataforma.

Como GNPS provee la anotación de los compuestos por comparación con patrones de fragmentación, es posible sugerir una estructura química no solo de los compuestos que hayan tenido coincidencias, sino también de análogos que muestren fragmentos similares en el espectro de masas. De esta manera se pueden detectar nuevos derivados de familias conocidas de compuestos ya que quedan organizadas en familias moleculares junto con otros compuestos de estructura similar (Tangerina et al., 2021). De todas formas, hay que considerar que en GNPS, todas las coincidencias espectrales encontradas son anotaciones putativas hasta que sean validadas experimentalmente (Wang et al., 2016). A modo de ejemplo, en este trabajo se tomó a la familia de antimicinas, como para hipotetizar sobre las posibles estructuras químicas derivadas de la antimicina A1 (anotada en base a una coincidencia encontrada para la cepa MAI 2237). La antimicina A1 se ha reportado como compuesto nematocida, inhibiendo el crecimiento de *C. elegans* (Yamamuro et al., 2011). En la Figura 9 del Anexo IV se muestra la red molecular de esta familia, representada por 16 nodos con valores de m/z que van de 469,161 a 571,248 y se establecen posibles estructuras candidatas para algunos de estos nodos. Esta es otra potencialidad de la plataforma GNPS, a partir de la cual sería posible deducir estructuras de nuevos derivados a partir de un compuesto conocido en una misma familia molecular, en base a la pérdida o ganancia de determinados grupos funcionales (Wang et al., 2016).

Es importante tener en cuenta que los enfoques que dependen de una estructura de red (es decir, la formación de FM a partir de espectros de fragmentación, o la agrupación de BGCs en GCFs) tienen sus limitantes. Brevemente, la elección de los umbrales apropiados para la creación de redes no es trivial, la calidad de la red refleja la calidad de los datos de entrada, y los parámetros seleccionados para definir las familias influyen en el resultado. Para conectar dos metabolitos en función de sus espectros de fragmentación de masas, es importante considerar qué métrica de distancia usar (es decir, sistema de puntuación de similitud espectral) o coseno, así como otros parámetros que fueron considerados en este trabajo (Aron et al., 2020; van der Hooft et al., 2020).

Si bien la minería genómica ha permitido la predicción de estructuras químicas de algunos productos de BGC, estas predicciones siguen siendo propensas a errores, especialmente para monómeros inusuales y modificaciones raras de organismos poco estudiados. Esto se debe al hecho de que los algoritmos disponibles para la predicción de muchas familias de enzimas son limitados, pero la función de las enzimas puede ser muy diversa y puede evolucionar rápida y dinámicamente. La integración con los datos metabolómicos tiene un potencial importante para mejorar las capacidades predictivas actuales, ya que podrían usarse para corregir errores en las predicciones (Hoskisson y Seipke, 2020). Además, los datos metabolómicos se pueden usar para vincular GCFs con moléculas específicas y, por lo tanto, dereplicar y priorizar grupos de genes no solo en función de las características genómicas, sino también en función de la novedad química. Esto también ayudaría a responder preguntas relacionadas con los BGCs “silenciosos” o “crípticos”. Por su parte, la construcción de redes moleculares a través de la infraestructura de GNPS ha sido una herramienta fundamental en el descubrimiento de metabolitos nuevos (Leño et al., 2021b).

El abordaje metabolo-genómico seguido en este trabajo puede ser potencialmente aplicado a otros conjuntos de datos, por ejemplo, con determinada actividad, para acelerar el descubrimiento de nuevos metabolitos (bioactivos) especializados. Recientemente, se han desarrollado herramientas que permiten relacionar datos de los BGCs obtenidos por antiSMASH con datos de MS/MS usando *machine learning*, por ejemplo, NPOMix (Leño et al., 2022).

CAPÍTULO 5
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE
ANTIMICINAS MEDIANTE LA CONSTRUCCIÓN DE
UN MUTANTE *KNOCK-OUT*

5.1 Introducción

Los depsipéptidos de tipo antimicina son una familia de productos naturales aislados de diversas especies de actinomicetos, que comparten un esqueleto estructural común consistente en un anillo macrocíclico con un enlace amida a una unidad de 3-formamidosalicilato. Estos compuestos poseen una gran diversidad estructural debido a diferencias a nivel de los sustituyentes y del tamaño del anillo macrocíclico (9, 12, 15 o 18 miembros) (Figura 5.1). Las antimicinas se aislaron por primera vez de la bacteria del suelo *Streptomyces* sp. NRRL 2288, en 1949 por su actividad antifúngica (Dunshiee et al., 1949), y luego adquirieron gran interés por sus potentes y diversas actividades biológicas. En particular, se ha demostrado que las antimicinas presentan actividad antifúngica, insecticida, nematocida y piscicida debido a su capacidad de inhibir la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Hosotani et al., 2005; Rieske J. S, 1967). Más recientemente, varias clases de antimicinas también han demostrado tener prometedoras actividades anticancerígenas y antiinflamatorias (Pettit et al., 2007; Strangman et al., 2009). Al principio, se creía que la antimicina era un único compuesto (Dunshiee et al., 1949), pero trabajos posteriores demostraron que podía separarse en cuatro componentes activos relacionados, las antimicinas A1-A4 (Figura 5.1, estructuras 1-8) (Hamilton et al., 1969). Un análisis más detallado de la mezcla de antimicina A reveló posteriormente la presencia de otros dos componentes menores, antimicinas A5 (9, 10) y A6 (11, 12), y posteriores análisis indicaron que cada una de las antimicinas A1-A4 es una mezcla de dos isómeros (Kluepfel et al., 1969).

El interés científico por estos compuestos se ha centrado principalmente en su acción como potentes inhibidores de la respiración aeróbica (Liu et al., 2016). Las potentes y diversas actividades biológicas de las antimicinas han dado lugar a numerosos estudios sobre el modo de acción de esta clase de productos naturales. Las antimicinas actúan inhibiendo específicamente la cadena de transporte mitocondrial uniéndose al sitio de reducción de quinona Q_i del complejo del citocromo bc_1 (complejo III) que bloquea el flujo de electrones

a la ubiquinona (Huang et al., 2005). El grupo 3-formamidosalicilato de las antimicinas ha demostrado ser esencial para esta especificidad de unión (Miyoshi et al., 1995).

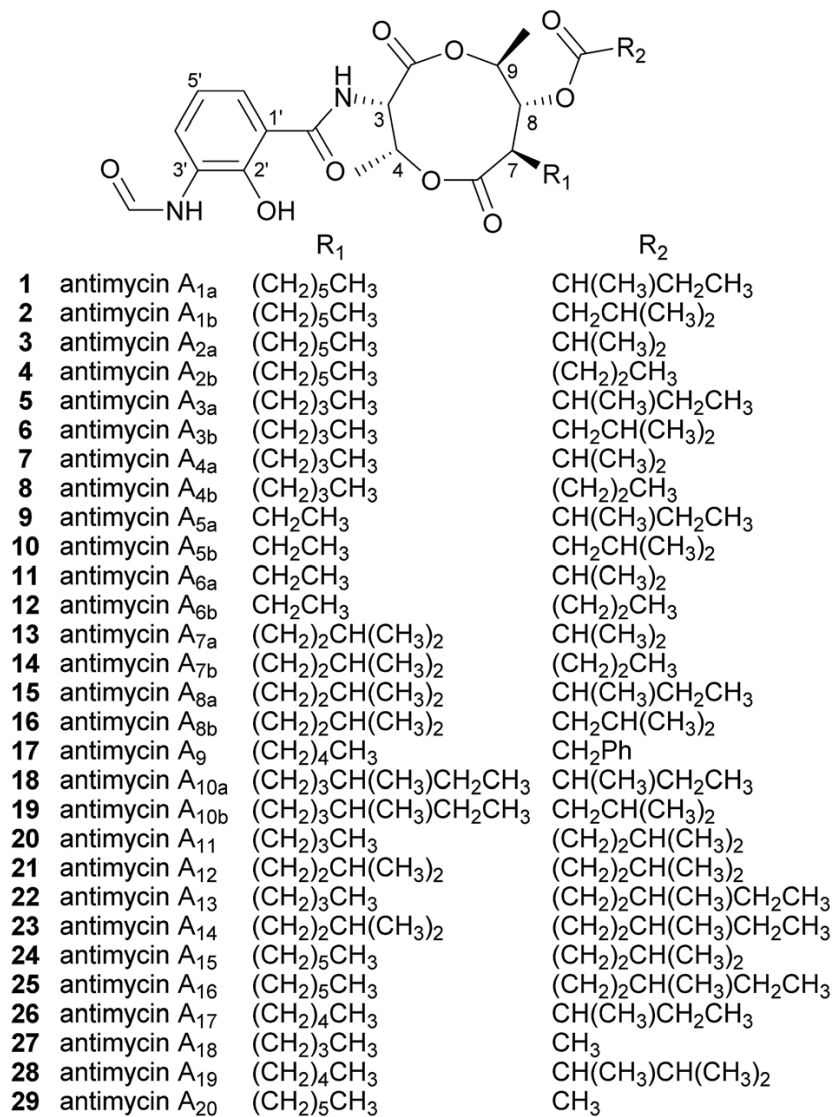


Figura 5.1. Estructura de las antimicinas. Tomado de Liu et al., 2016.

Las antimicinas se han utilizado ampliamente en la gestión pesquera, especialmente para controlar la población de peces, siendo el ingrediente activo del piscicida comercial Fintrol. En cuanto a su acción nematocida, en el trabajo de Yamamuro et al. (2011), donde se analizaron unas 9 mil muestras en busca de pequeñas moléculas que afectaran al fenotipo de *Caenorhabditis elegans*, se determinó que la antimicina A elimina por completo a los

gusanos a una concentración de 25-100 μM . En el trabajo de Shiomi et al. (2005) también se demostraron potentes actividades nematocidas contra *C. elegans* e insecticidas contra *Artemia salina*.

El BGC de la antimicina se identificó por primera vez en *Streptomyces albus* S4, y luego se observó que *clusters* homólogos estaban presentes en muchas otras especies de actinomicetos (Seipke et al., 2011b, 2011a). Se trata de un BGC de aproximadamente 26 Kb que abarca un módulo híbrido NRPS-PKS (Joynt y Seipke, 2018). Se han identificado tres formas diferentes: forma corta (forma S), con 15 genes, forma intermedia (forma I), con 16 genes y la forma larga (forma L), con 17 genes (Figura 5.2). La biosíntesis de las antimicinas comienza con el catabolismo del triptófano a antranilato, que es catalizado por tres enzimas: AntN, AntO y AntP. A continuación, el antranilato es activado por un homólogo de la acil-CoA ligasa, AntF, y se carga en la proteína acyl carrier protein (ACP), llamada AntG. Posteriormente, la antraniloil-S-AntG resultante se convierte en 3-aminosaliciloil-S-AntG por la oxigenasa multicomponente AnthIJKL. Luego, AntO cataliza la *N*-formilación de la fracción 3-aminosalicilato, y la 3-formamidosaliciloil-S-AntG resultante se presenta a la NRPS, AntC. AntC es una NRPS dimodular con una organización de dominios de C1-A1-T1-C2-A2-KR-T2 (C, condensación; A, adenilación; T, tiolación; KR, cetoreducción). El dominio A1 se activa y carga treonina en T1, que se condensa con 3-formamidosalicilato por C1, y el dominio A2 se activa y carga piruvato en T2, que se reduce estereoselectivamente por el dominio KR, y luego es condensado con treonina por C2. Luego, interviene la PKS AntD con una organización de dominios KS-AT-ACP-TE (KS, cetosintasa; AT, aciltransferasa; TE, tioesterasa). El dominio AT transfiere un acilo 2-carboxilado de CoA a la ACP, y selecciona unidades extensoras atípicas como butilmalonil-CoA, que se genera a partir de la carboxilación reductora de 2E-hexenoil-CoA por la enzima AntE. En el siguiente paso, el dominio KS cataliza la condensación descarboxilativa entre el dominio aminoacil-S-T2 de AntC y el dominio 2-carboxi-acil-S-ACP de AntD. Posteriormente, y tras la reducción estereoselectiva de la β -cetona por la enzima AntM, AntD-TE cataliza la ciclización regiospecífica de la macrolactona y libera el producto de nueve miembros. Por último, AntB,

una aciltransferasa promiscua, cataliza la transesterificación en el grupo hidroxilo C8 con 2-metilbutil-, isovaleril-, isobutil-, o butil-CoA (Liu et al., 2016, Figura 5.2). Esta vía se ha demostrado mediante experimentos de disrupción génica, expresión heteróloga del *cluster* genético, y análisis bioquímicos. En particular, la inactivación de *antC* y *antD* elimina por completo la producción de antimicinas, por lo que resultan genes esenciales en la vía metabólica (Yan et al., 2012; Liu et al., 2016; Joynt y Seipke, 2018).

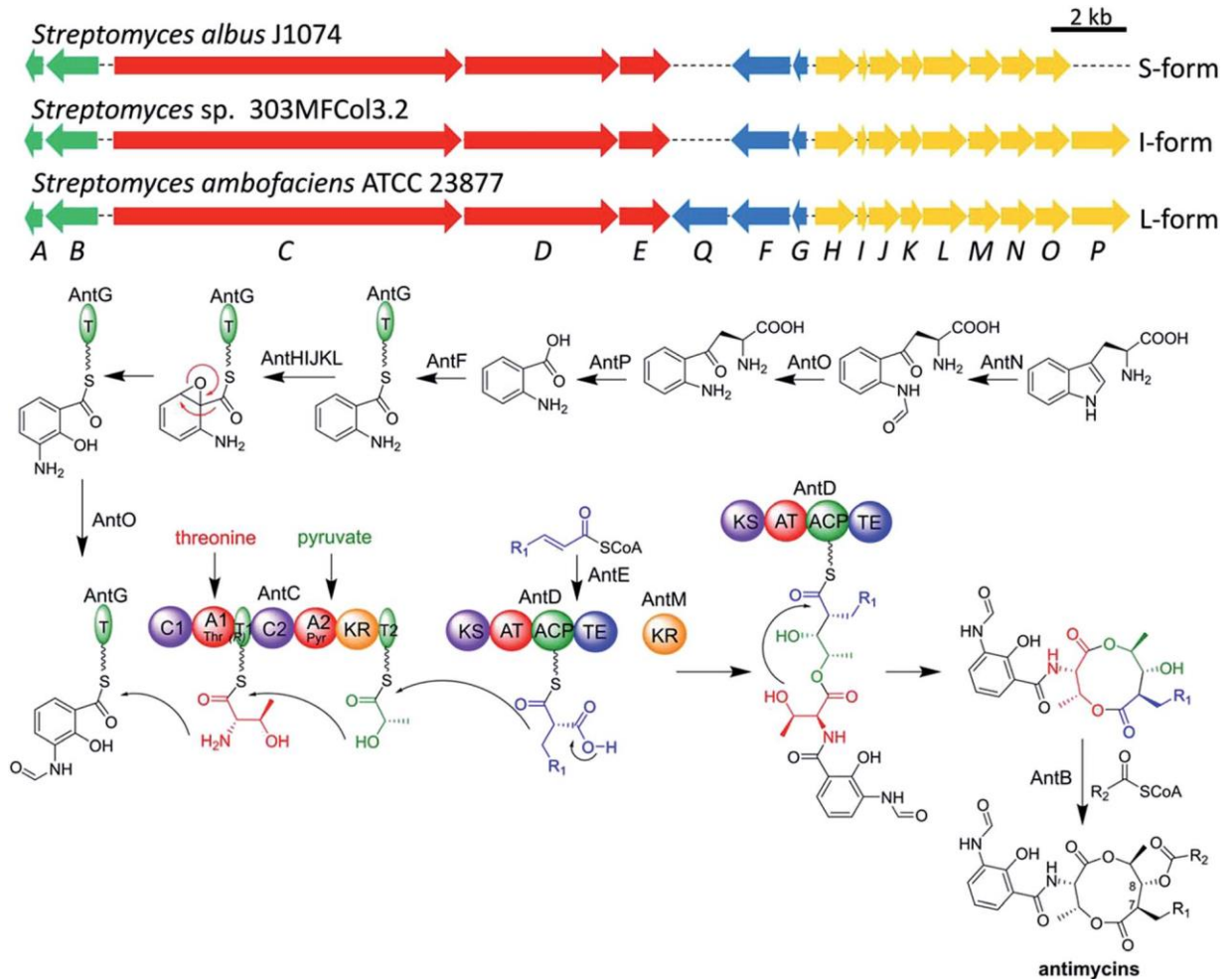


Figura 5.2. BGC y vía biosintética de las antimicinas. Los grupos de genes están organizados como cuatro operones marcados en colores, *antAB* (verde), *antCDE* (rojo), *antFG(Q)* (azul), *antHIJKLMNO(P)* (amarillo). El gen *antA* codifica al factor sigma de la ARN polimerasa de función extracitoplasmática (ECF) que controla la expresión de *antFG* y *antHIJKLMNO*. Adaptado de Liu et al, 2016.

Resultados previos de minería genómica y metabolómica obtenidos en este trabajo, permitieron la identificación del BGC de la antimicina en el genoma de la cepa MAI 2237, así como la presencia de varios análogos de esta familia en el sobrenadante de cultivo de esta cepa en medio SFM (Anexo V). En base a los reportes sobre la actividad biológica de estos compuestos, en este capítulo se estudió el potencial rol de las antimicinas como responsables de la actividad nematocida observada para la cepa MAI 2237. Para ello, se construyó un mutante *knock out* utilizando la herramienta de edición génica CRISPR-Cas9 y se evaluó su actividad nematocida frente a *C. elegans* en comparación con la cepa salvaje.

Los objetivos específicos de este capítulo fueron entonces:

1. Implementar la herramienta CRISPR-Cas9 para la generación de mutantes *knock out* en cepas de *Streptomyces*.
2. Construir un mutante de la cepa MAI 2237 mediante delección de un gen esencial de la vía de biosíntesis de las antimicinas (*antC*).
3. Verificar si la cepa alterada revierte el fenotipo de actividad nematocida de la cepa MAI 2237.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Búsqueda de antimicinas en la cepa MAI 2237.

La metodología utilizada para la identificación del *cluster* involucrado en la biosíntesis de antimicinas y verificación de su producción se detalla en el Capítulo 4. Brevemente, el genoma de la cepa *Streptomyces sp.* MAI 2237 fue analizado mediante la herramienta AntiSMASH (versión 6.1.0) para la búsqueda de BGCs. Se analizó la estructura del BGC encontrado en la cepa MAI 2237 y se comparó con el BGC0001455 de *S. argillaceus* evaluando la presencia, organización y homología de los genes presentes. Se evaluó la producción de antimicinas por parte de la cepa MAI 2237 en los extractos orgánicos obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) según se detalla en el Capítulo 4. Se buscaron específicamente las antimicinas A₁, A₂, A₃, y A₄ en todos los extractos de la cepa MAI 2237, utilizando el software Compass Data Analysis.

5.2.2 Construcción del mutante de *Streptomyces* MAI 2237 $\Delta antC$ utilizando la metodología CRISPR-Cas9

El mutante de antimicina de la cepa MAI 2237 fue construido durante una pasantía de investigación en el laboratorio del Dr. Ryan Seipke (Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Reino Unido). Para la construcción del mutante del tipo *knock-out* se seleccionó la estrategia CRISPR-Cas9, diseñada para realizar un corte en el gen *antC*, el cual es esencial para producir el metabolito (Yan et al., 2012; Liu et al., 2016). La estrategia utilizada se llevó a cabo siguiendo la metodología detallada en Cobb et al. (2015), en la cual primero se construye el plásmido con todos los elementos necesarios para realizar la edición genética deseada, y posteriormente se lo transfiere mediante conjugación a la cepa de *Streptomyces* a modificar. La construcción del plásmido abarcó dos etapas: i) incorporación del RNA guía (sgRNA) diseñado a partir del gen *antC* (blanco donde se realiza el corte mediante la enzima Cas9), y ii) inserción de los brazos homólogos mediante HDR (*Homologous Direct Repair*). Esta estrategia implicó el uso del plásmido *pCRISPOmyces-2* (Figura 5.3) (Cobb et al., 2015)

que presenta las siguientes características: promotores fuertes y terminadores de los fagos λ y T7 para la expresión de los elementos CRISPR-Cas9 incluyendo el gen que codifica para la enzima Cas9 con optimización de codones para su expresión en *Streptomyces*, el *cassette lacZ* flanqueado por sitios únicos de restricción *BbsI* para el ensamblaje del tipo *Golden Gate* que permite incorporar los espaciadores diseñados en el plásmido (ARN guía), un sitio único de restricción mediante *XbaI* que permite linealizar el plásmido para incorporar elementos adicionales como los brazos para la recombinación homóloga (HDR) en la cepa de *Streptomyces* a modificar mediante ensamblaje del tipo *Gibson* (o ligación tradicional), el gen *aac(3)-IV (ApmR)* de resistencia al antibiótico apramicina (Apr) para la selección tanto en *E. coli* como en *Streptomyces*, el origen *colE1* que permite la replicación en *E. coli*, el origen de transferencia (RP4) que permite la transferencia por conjugación del plásmido pCRISPomyces de *E. coli* al huésped de *Streptomyces*, y finalmente, la región *rep* de *pSG521* sensible a temperatura (37 °C) que permite el curado del plásmido luego de la edición genómica deseada. Todas las secuencias, *primers*, plásmidos y cepas utilizadas en este capítulo de detallan en las Tablas 5.1 y 5.2.

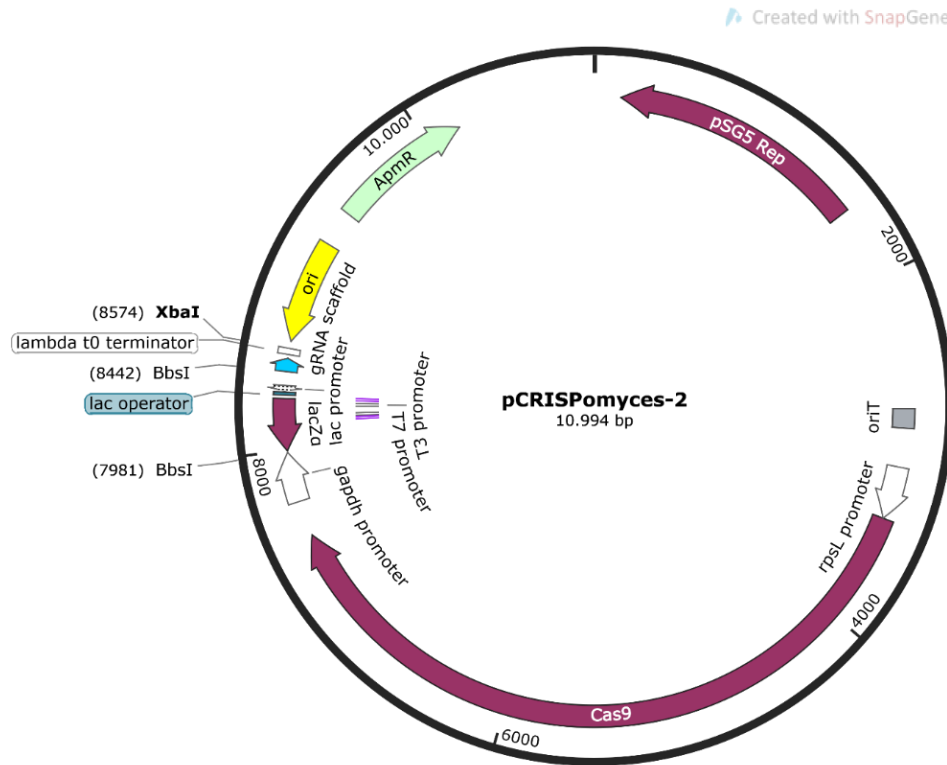


Figura 5.3. Plásmido pCRISPomyces-2 (Cobb et al., 2015) utilizado para la edición genómica en *Streptomyces* MAI 2237. Figura realizada en SnapGene v. 6.0.3.

Tabla 5.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este capítulo.

Nombre	Descripción	Referencia
Plásmidos		
pUZ8002	Confiere las funciones de transferencia para la movilización de vectores que contienen <i>oriT</i> desde <i>E. coli</i> a <i>Streptomyces</i> (Kan ^R)	Kieser et al., 2000
pSET152	Vector que permite integrar ADN exógeno en genomas de <i>Streptomyces</i> por acción de una integrasa. En este trabajo sólo se utilizó con el fin de evaluar la capacidad de conjugación de la cepa de <i>Streptomyces</i> MAI 2237.	Flett et al., 1997

pCRISPomyces-2	Vector diseñado para realizar edición genómica mediante CRISPR-Cas en cepas de <i>Streptomyces</i> .	Cobb et al., 2015
pCRISPomyces-2-sg18	Vector derivado de <i>pCRISPomyces-2</i> que contiene el ARN guía 18 diseñado para cortar el gen <i>antC</i> de <i>Streptomyces</i> MAI 2237	Este trabajo
pCRISPomyces-2-sg22	Vector derivado de <i>pCRISPomyces-2</i> que contiene el ARN guía 22 diseñado para cortar el gen <i>antC</i> de <i>Streptomyces</i> MAI 2237	Este trabajo
pCRISPomyces-2-sg18-arms	Vector derivado de <i>pCRISPomyces-2-sg18</i> que contiene los brazos homólogos adyacentes al gen <i>antC</i> para la recombinación homóloga en <i>Streptomyces</i> MAI 2237	Este trabajo
pCRISPomyces-2-sg22-arms	Vector derivado de <i>pCRISPomyces-2-sg22</i> que contiene los brazos homólogos adyacentes al gen <i>antC</i> para la recombinación homóloga en <i>Streptomyces</i> MAI 2237	Este trabajo
Cepas de <i>E. coli</i>		
<i>XL10 gold</i>	Hospedero de clonado general. Guarda muchas copias del plásmido. Similares a las DH5 α de NEB pero permite el clonado de plásmidos grandes.	Agilent
ET12567	Se utiliza para conjugaciones <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> , contiene al plásmido pUZ8002. No metila el ADN a ser transferido a <i>Streptomyces spp.</i>	MacNeil et al., 1992
Cepas de <i>Streptomyces</i>		
MAI2237	Cepa productora de antimicinas (cepa <i>wild type</i>)	Este trabajo
MAI2237 $\Delta antC$	Derivada de MAI 2237 sin la funcionalidad del gen <i>antC</i> (cepa mutante)	Este trabajo

Tabla 5.2. Lista de *primers* diseñados utilizados en este capítulo

Nombre	Secuencia	Ta °C	Función
sgRNA18_F	ACGCAGAAGTCGAAGGCGTAGGAG	60,8	Formación del protoespaciador mediante <i>annealing</i> que será usado como ARN guía 18 (dirigirá el corte por Cas9)
sgRNA18_R	AAACCTCCTACGCCTTCGACTTCT	57,4	
sgRNA22_F	ACGCGTTTCTCGCCGTCCAGGAGG	64,2	Formación del protoespaciador mediante <i>annealing</i> que será usado como ARN guía 22 (dirigirá el corte por Cas9)
sgRNA22_R	AAACCCTCCTGGACGGCGAGAAAC	60,8	
pF_left-arm	TGCCGCCGGCGTTTTTATCCGGCAGATGCGGGCCACGT	74,7	Amplificación del brazo izquierdo del gen <i>antC</i> para ser usado como ADN de reparación del corte por Cas9
pR_left-arm	AGCACAACCCTCACGTGGCAAGCCGAAGTGTCGGCCGG	75,8	
pF_right-arm	TGCCACGTGAGGGTTGTGCTCAACCCCGCAGCACACGCCG	75,8	Amplificación del brazo derecho del gen <i>antC</i> para ser usado como ADN de reparación del corte por Cas9
pR2_right-arm	TTACGGTTCCTGGCCTCTAGCGGCGGCGACGCCGGTGGTG	76,8	
RFS_827	ACGTCACCGTCCTCAAC	49,5	Amplificación de una región del gen <i>antC</i> (producto de 1215 pb)
RFS_828	ACGAGCGGGATGTTGTAGG	53,2	
RFS_115 (ApraF)	TCGATGGGCAGGTA CTCTC	53,8	Amplificación del gen de resistencia a Apramicina <i>aac3(IV)</i>
RFS_116 (ApraR)	ACCGACTGGACCTTCCTCT	53,8	
pF_LA2237_2	CGGGTGATGGACCGGCAGATGC	62,3	Chequeo de la edición genética en la cepa mutante de <i>Streptomyces</i> MAI2237
pR_RA2237_2	TCCTCCACCGCGGCGGCAC	64,1	

5.2.2.1 Evaluación de la capacidad de conjugación y de la sensibilidad a antibióticos de MAI 2237.

Debido a que el comportamiento de las distintas cepas de *Streptomyces* es muy variable frente a la conjugación bacteriana, antes de realizar la edición génica mediante el sistema CRISPR-Cas9 fue necesario chequear que la cepa MAI 2237 fuera capaz de adquirir ADN extraño mediante conjugación. Para ello, se llevó a cabo el protocolo de conjugación que se detalla en la sección 5.2.2.8 utilizando el plásmido pSET152 (Tabla 5.1) como vector de prueba. Asimismo, se evaluaron dos relaciones donador:aceptor para la conjugación (relación donador *E. coli* ET12567: aceptor *Streptomyces* MAI 2237) 10:1 (500 μ l:50 μ l) y 10:3 (500 μ l:165 μ l). Como control positivo de conjugación se utilizó la cepa de *Streptomyces albus* J1074 evaluando las mismas relaciones. También se evaluó la sensibilidad de la cepa MAI 2237 frente a los antibióticos utilizados en el sistema CRISPR-Cas: 25 μ g/mL de ácido nalidíxico (inhibe el crecimiento de *E. coli* durante la conjugación) y 50 μ g/mL de apramicina (permite seleccionar las cepas de *Streptomyces* que incorporan el vector). La cepa de *Streptomyces* debe tener el fenotipo sensible a apramicina (*Apr*^S) y resistente a ácido nalidíxico (*Nal*^R) para poder utilizar este sistema CRISPR-Cas.

5.2.2.2 Selección del proto-espaciador dentro del gen *antC* y diseño del ARN guía

En primer lugar, se diseñó el proto-espaciador de 20 nucleótidos dentro del gen *antC*, donde estará dirigido el corte con la enzima Cas9. Dicho proto-espaciador se buscó de manera tal que cumpla con las siguientes condiciones: i) la secuencia 3' adyacente al mismo (secuencia PAM) debe ser NGG (siendo N cualquier nucleótido), ii) las últimas 4 bases del proto-espaciador deben ser purinas (R), iii) los últimos 12 nucleótidos del proto-espaciador más los 3 nucleótidos del PAM (15 en total) deben ser únicos en el genoma a editar, iv) no debe contener un sitio de corte con la enzima *Xba*I y, v) estas características deben buscarse en la hebra no-codificante. Para ello, utilizando el programa Geneious se buscó el código CCNYYYY en la hebra codificante del gen *antC* (*ctg5*) y se seleccionaron 35 posibles proto-espaciadores de 15 nucleótidos (3 del PAM más 12 nucleótidos). Como el proto-espaciador

debe ser una secuencia única en el genoma de *Streptomyces* MAI2237 para que la proteína Cas9 realice el corte específicamente en el lugar correcto, se realizó un Blastn de los 35 proto-espaciadores en dicho genoma utilizando el programa Blastn 2.6.0 (Zhang et al., 2000). En base a dicha búsqueda, se seleccionaron dos proto-espaciadores (18 y 22) que se extendieron con 5 nucleótidos adicionales para completar el tamaño a 20 nucleótidos (Figura 5.4). Todos los pasos siguientes fueron llevados a cabo con ambos protoespaciadores. Posteriormente, se diseñaron los *primers* de 24 nucleótidos para formar el ARN guía (mediante hibridación) que será luego insertado en el plásmido. Para ello, a cada proto-espaciador de 20 nucleótidos se le adicionaron los extremos cohesivos ACGC en el extremo 5' del *primer Forward* y AAAC en el extremo 5' del *primer Reverse*. Los *primers* se resuspendieron en agua miliQ a una concentración de 100 μ M. Luego, se realizó la hibridación agregando 5 μ L de cada primer (*Fwd* y *Rev*) en 90 μ L de agua miliQ en un tubo de PCR y se colocó en un termociclador a 95 °C por 5 min y luego una rampa hasta 4 °C de a 0,1 °C por segundo. Como resultado se obtuvieron los insertos, es decir los *primers* de los proto-espaciadores hibridados, dando lugar a los denominados ARNs guía (sgRNA18 y sgRNA22) de doble hebra.



Figura 5.4. Proto-espaciadores seleccionados (sgRNA_18 y sgRNA_22) dentro del gen *antC* de *Streptomyces* MAI 2237.

5.2.2.3 Introducción del ARN guía (sgRNA) mediante ensamblaje *Golden Gate* y transformación en *E.coli*.

La inserción del ARN guía dentro del plásmido pCRISPomyces-2 se llevó a cabo mediante el ensamblaje del tipo *Golden Gate* (Figura 5.5A). Para ello, en un tubo de PCR se preparó la siguiente mezcla: 1 μL (100ng) del plásmido pCRISPomyces-2, 0,3 μL del inserto (dilución al décimo), 1 μL (400 U) de ligasa T4 (*New England Biolabs*, NEB), 2 μL del buffer de la ligasa, 1 μL de *BbsI* (NEB) y el restante volumen de agua miliQ para un volumen final de 20 μL . Se utilizó el siguiente programa *Golden Gate* en el termociclador: 10 ciclos de digestión-ligación de 37 °C, 10 min y 16 °C, 10 min; seguidos de 50 °C, 5 min y 65 °C, 20 min.

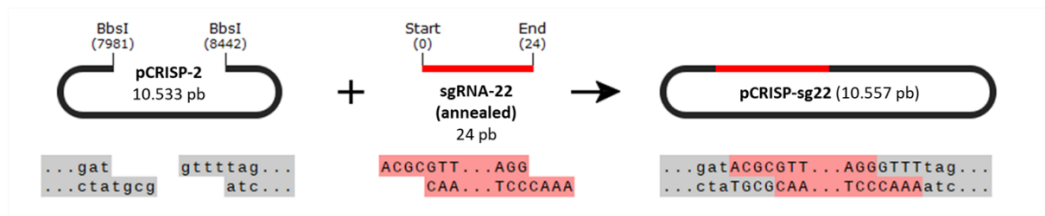
Posteriormente se transformaron 10 μL de cada reacción en células competentes de *E. coli XL10-gold* previamente preparadas (ver sección 5.2.2.4). La transformación se realizó por choque térmico siguiendo el protocolo del fabricante (*NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit, E5520S, NEB*). Finalmente, se plaquearon 100 μL del cultivo en placas del medio selectivo LB con IPTG (0,2 mM), X-Gal (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Apr (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se incubaron las placas a 37 °C (durante la noche) y luego se seleccionaron las colonias blancas, se sub-cultivaron en LB con Apr para recuperar el plásmido obtenido mediante miniprep (pCRISPR2-sg18 y pCRISPR2-sg22, Figura 5.5B) y se guardaron los transformantes a -70 °C (*Ec/pCRISPR-sg18* o *sg22*). Las miniprep se prepararon según protocolo del fabricante (*Monarch T1010, NEB*).

5.2.2.4 Preparación de células químicamente competentes de *E. coli (XL10-gold* o *ET 12567)*

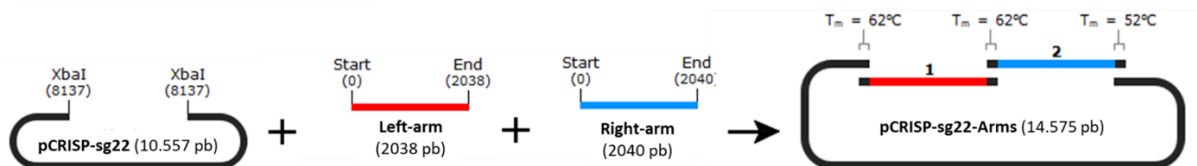
Las células competentes se prepararon según protocolo del Laboratorio del Dr. Seipke. Primero se preparó un cultivo *E. coli* en 10 mL de LB o LB con kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (para *ET12567*), y se incubó a 37 °C durante la noche. Luego se inocularon 200 μL del cultivo en un matraz con 50 mL del mismo medio y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$ (3 hs aprox.). Se enfrió en hielo por 20 min, luego se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C durante 10 min, se re-suspendieron las células en 20 mL de CaCl_2 0,1 M (frío) y se dejó en hielo 20 min. Se volvió a centrifugar a 4000 rpm a 4 °C durante 10 min y finalmente se

re-suspendieron las células en 2,5 mL de una solución con CaCl₂ 0,1 M y glicerol 15%. Se repartió en tubos Eppendorf en alícuotas de 50 µL, se congelaron en hielo seco y se guardaron en freezer a -80 °C.

A 1. Ensamblaje *Golden Gate*



2. Ensamblaje *Gibson*



B

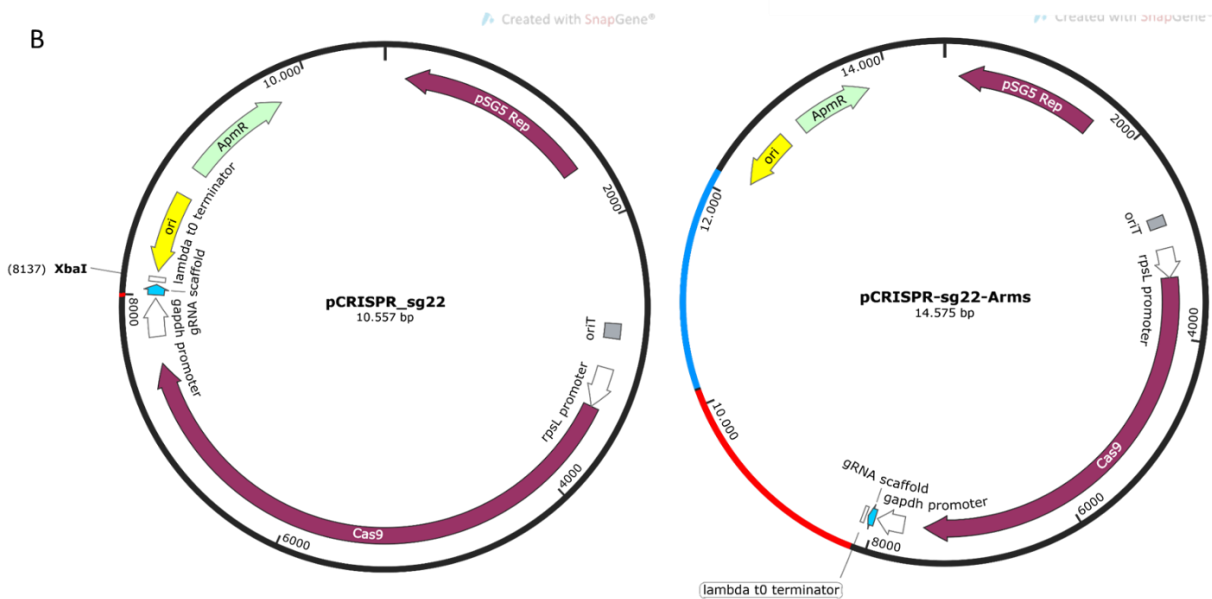


Figura 5.5. (A) Tipos de ensamblaje utilizados en este trabajo para la construcción del mutante por la metodología CRISPR-Cas. (B) Mapas de los plásmidos obtenidos en este trabajo (creado en SnapGene v. 6.0.3). Se realizaron las construcciones análogas con el sgRNA_18.

5.2.2.5 Diseño e introducción de los brazos homólogos en el plásmido en construcción

Se diseñaron los brazos homólogos derecho e izquierdo (a los que llamamos *Right-arm* y *Left-arm*) para agregar al plásmido pCRISPR-2-sg18 (o sg22) a partir de los extremos del gen *antC* de la cepa MAI2237. Dichos brazos (de 2000 pb cada uno) fueron diseñados justo antes del comienzo (*upstream*) y justo al final (*downstream*) del gen *antC*. Los mismos se obtuvieron por PCR a partir del ADN genómico de la cepa *Streptomyces* MAI2237. Los *primers* para amplificar dichos brazos fueron diseñados de manera tal que exista una superposición de 20 nucleótidos entre los extremos 3' del brazo izquierdo y 5' del brazo derecho. Además, se incorporó una secuencia adicional de 20 nucleótidos complementaria a la secuencia del plásmido pCRISP-2 a nivel del sitio de corte *XbaI*, en los extremos 5' del primer Fwd del brazo izquierdo (*pF_Left-arm*) y 3' del primer Rev del brazo derecho (*pR_Right-arm*). La temperatura de hibridación de los cuatro *primers* se calculó únicamente con la parte de 20 nucleótidos que hibrida al ADN de *Streptomyces* MAI 2237.

Se llevó a cabo la PCR de ambos brazos utilizando la ADN polimerasa *High Fidelity* Q5 (MO491S, NEB) en un volumen final de 25 µL conteniendo: 1x de buffer de reacción Q5, 400 µM de dNTPs, DMSO (0,75 µL), 0,56 µM de cada primer, 1x del potenciador de Q5, 0,02 U de la polimerasa Q5, y 100 ng del ADN molde (MAI 2237) y el restante volumen de agua miliQ. Se tomó como referencia la temperatura de hibridación calculada utilizando la calculadora de NEB (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>) indicando los *primers* a utilizar, y la misma se optimizó evaluando un rango de temperaturas de hibridación de 62 a 72°C. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: 98 °C, 30 s; seguido de 30 ciclos de 98 °C, 10 s; 62-72 °C, 30 s; 72 °C, 90 s; y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se verificaron en gel de agarosa 1% conteniendo 0,5x *SYBR Safe ADN Gel Stain* (Invitrogen). Se determinó el tamaño comparando con un marcador de peso molecular de 10-0,1 kb (NEB). Los productos de 2 kb obtenidos fueron purificados utilizando el kit de purificación *QIAquick Gel Extraction Kit* (28704, *Qiagen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificados se cuantificaron en Nanodrop para luego calcular las cantidades a utilizar en el ensamblaje de tipo Gibson.

Por otro lado, se realizó la digestión del plásmido (para linealizarlo) conteniendo el ARN guía (pCRISPR2-sg18 o pCRISPR2-sg22) con *Xba*I (NEB, RO145S) según protocolo del fabricante. A 43 μ L del plásmido (1 μ g) se agregaron 2 μ L de la enzima *Xba*I y 5 μ L de *Cut Smart Buffer* (vol final 50 μ L) y se incubó durante 2 hs a 37°C. Posteriormente se realizó la desfosforilación del plásmido para prevenir la re-ligación. Para ello, se agregó 1 μ L de *Alkaline Phosphatase Calf Intestinal* (CIP; MO290S, NEB), 1 μ L de *Cut Smart Buffer* y 8 μ L de agua miliQ, y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, el plásmido digerido y desfosforilado se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol según el protocolo del laboratorio del Dr. Ryan Seipke. Brevemente, se agregó un volumen igual de una solución de fenol/cloroformo, y se agitó vigorosamente por 1 min. Se centrifugó a 16000 g por 10 min, y se transfirió cuidadosamente la fase superior a un tubo limpio. Para precipitar el ADN, se agregó un décimo del volumen de acetato de sodio (3M, pH 5.3) y 2,5x del volumen total de etanol 100%. Luego se agregó 1 μ L de ARNt de levadura (como carrier para facilitar la precipitación del ADN), se mezcló y se dejó en freezer por 30 min. Se centrifugó a 16000 g por 1 min, se descartó el sobrenadante rápidamente y se lavó el pellet con 500 μ L de etanol 70%. Se centrifugó nuevamente y se removió el etanol cuidadosamente para no distorsionar el ADN. Se dejó secar el ADN por unos minutos y se re-suspendió en 30 μ L de agua miliQ. Finalmente, se midió la concentración de plásmido obtenido (linealizado, desfosforilado y purificado) mediante Nanodrop y se verificó su integridad en gel de agarosa 1% conteniendo 0,5x *SYBR Safe ADN Gel Stain* (invitrogen).

Para insertar los brazos homólogos en el vector se realizó el ensamblaje Gibson colocando en un tubo las cantidades necesarias correspondientes a 0,05 pmol del vector (340 ng), 0,1 pmol (100 ng) de cada brazo y la *mix NEBuilder 2x* en un volumen final de 20 μ L y se incubó a 50 °C durante una hora (Figura 5.5). Los productos obtenidos (10 μ L) fueron utilizados para realizar la transformación en *E. coli XL10-gold* competentes mediante choque térmico siguiendo el protocolo del fabricante (*NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit, E5520S, NEB*). Finalmente, se sembraron alícuotas de 900 μ L y 100 μ L en placas de LB con Apr y se

incubaron a 37 °C durante la noche. También se sembró un control de células sin transformar, y un control del plásmido sin los insertos (sin los brazos homólogos).

5.2.2.6 Confirmación de la construcción del plásmido pCRISPOmyces completo

Una vez obtenidos los transformantes se seleccionaron tres colonias de cada uno para verificar el éxito de la inserción. Se obtuvieron los plásmidos (pCRISPR-sg18-Arms o pCRISPR-sg22-Arms) mediante miniprep según protocolo del fabricante (*Monarch T1010*, NEB) y se confirmó por PCR utilizando los *primers* previamente diseñados *pF_left-arm* y *pR2_right-arm*. Se llevó a cabo la PCR utilizando la enzima *GoTaq G2 ADN polimerasa* (Promega) en un volumen final de 20 µL de la siguiente manera: 1x *GoTaq green buffer*, 800 µM de dNTPs, 0,5 µM de cada primer, 1 µL de DMSO, 1 µL de ADN plasmídico y el volumen restante de agua m_q. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: 95 °C, 2 min; seguido de 35 ciclos de 95 °C, 30 s; 72 °C, 30 s; 72 °C, 90 s; y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% conteniendo 0,5x *SYBR Safe ADN Gel Stain* (Invitrogen) y por secuenciación. Se incluyó un blanco de reacción (sin ADN) y un marcador de peso molecular 0,1-10 kb (Quick-Load Purple 2-log DNA Ladder, N0550S, NEB).

5.2.2.7 Transformación en células de *E. coli* conjugativas ET12567/pUZ8002

Se realizó la transformación de ambos plásmidos completos (pCRISPR-sg18-Arms y pCRISPR-sg22-Arms) en células de *E. coli* competentes ET12567 (pUZ8002) previamente preparadas (sección 2.2.4). Esta cepa de *E. coli* posee un plásmido de conjugación (pUZ8002) que permite que se transfiera el material genético hacia *Streptomyces* y tiene además un gen de resistencia a kanamicina. La cepa ET12567 tiene además resistencia a cloranfenicol (gen de resistencia en el cromosoma). La transformación se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante (NEB), y el cultivo obtenido se plaqueó en placas de LB conteniendo kanamicina (50 µg/mL) y apramicina (50 µg/mL). También se sembró un control de las células competentes ET12567:pUZ8002 sin transformar en LB con kanamicina (50 µg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C durante 36 hs. Los transformantes obtenidos se

subcultivaron a LB con Apramicina (50 µg/mL) y Kanamicina (50 µg/mL) y se conservaron en glicerol 10% a -80 °C (ET/pCRISP2-sg18-Arms y ET/pCRISP2-sg22-Arms).

5.2.2.8 Conjugación entre *E. coli* ET12567 (pUZ8002) y *Streptomyces* MAI 2237

Se llevó a cabo la conjugación entre las células de *E. coli* ET12567 conteniendo el plásmido pCRISPR completo y la cepa de *Streptomyces* MAI 2237. Para ello, se inició un cultivo a partir de una colonia de la cepa de ET/pCRISPR2-sg18-Arms (y ET/pCRISPR2-sg22-Arms) en medio LB conteniendo Kan (50 µg/mL), para mantener el plásmido pUZ8002 y Apr (50 µg/mL), para conservar el plásmido a ser transferido, y se incubó con agitación a 37 °C durante la noche. Luego se inició un subcultivo, inoculando 100 µL del cultivo ON en un tubo conteniendo 10 mL de LB conteniendo los antibióticos mencionados anteriormente y se incubó a 37 °C con agitación (150 rpm) hasta obtener una DO_{600nm} entre 0,6 y 1,0 (6 hs aprox.). Se centrifugó a 4.000 g por 5 min, se descartó el sobrenadante y el pellet de células se lavó dos veces con LB para remover los antibióticos que podrían inhibir a *Streptomyces* y se resuspendió en 1 mL de LB. Por otro lado, se preparó 1 mL de una suspensión de esporas de la cepa de *Streptomyces* MAI 2237 a partir de una placa crecida tipo manto durante 7 días en medio SFM. Posteriormente se realizó la conjugación entre ambas cepas colocándolas en un tubo eppendorf en una relación donador: aceptor de 10:1 (500 µL de la ET y 50 µL de la cepa de *Streptomyces*). El contenido del tubo se sembró en una placa de SFM y se incubó a 30 °C. Luego de 24 hs, se cubrió la placa con una solución de antibióticos de manera tal que la concentración final en la placa sea 25 µg/mL de ácido nalidíxico (actúa selectivamente sobre *E. coli*) y 50 µg/mL de apramicina (para seleccionar los exconjugantes). Se dejaron secar las placas y se continuó la incubación a 30 °C hasta la aparición de los exconjugantes de *Streptomyces* (8 días aprox.). Los exconjugantes seleccionados son aquellos en los que la enzima Cas9 haya realizado el corte correspondiente en el gen *antC* y en los que la secuencia formada por los brazos homólogos haya realizado la reparación del corte mediante doble recombinación homóloga (Figura 5.6). Los exconjugantes obtenidos se reaislaron a placas de SFM con ácido nalidíxico y apramicina y se incubaron a 30 °C. Como controles se sembraron dos placas de SFM con 100 µL de cada una de las suspensiones de esporas de

Streptomyces, una de ellas como control positivo (no se cubrió con antibióticos) y la otra se cubrió con los antibióticos como control negativo.

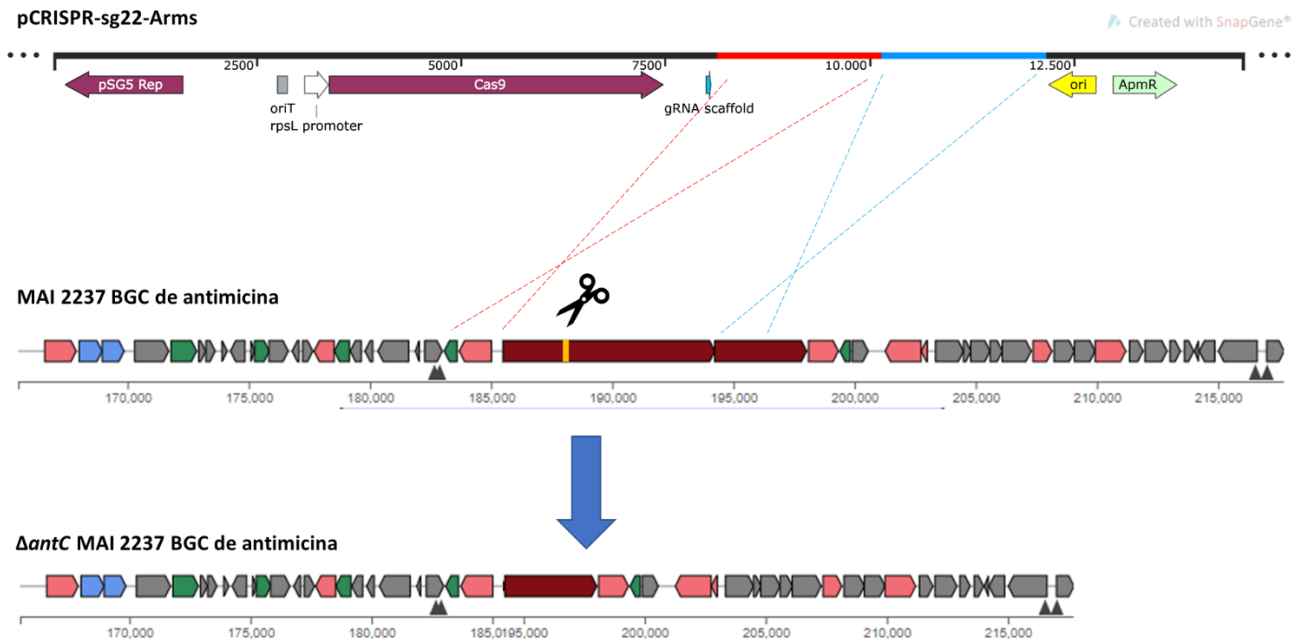


Figura 5.6. Esquema de la estrategia de generación del mutante *knock out* de *Streptomyces* MAI 2237 $\Delta antC$ mediante recombinación homóloga de los brazos para la reparación del corte con la enzima Cas9.

5.2.2.9 Chequeo de la edición génica en *Streptomyces* MAI 2237 y de ausencia del gen *antC*

Se realizó la extracción de ADN genómico de los exconjugantes obtenidos mediante el protocolo detallado en el Capítulo 3 y se verificó en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se diseñaron *primers* para chequear la edición correcta en el genoma de la cepa mutante MAI2237 $\Delta antC$. Dichos *primers* se diseñaron de manera tal que cubriesen parte del genoma de la cepa mutante y parte de cada uno de los brazos homólogos que repararon el corte realizado por Cas9. Estos sets de *primers* fueron nombrados pF_LA2237_2 y pR_RA2237_2 (Tabla 5.2), y su producto de amplificación es de 4 kb ya que incluye los dos brazos contiguos. Paralelamente, se diseñaron *primers* dirigidos al gen *antC* (RFS_827 y RFS_828) (Tabla 5.2), que fueron utilizados para chequear la ausencia de dicho gen en los

exconjugantes. El tamaño del producto de esta amplificación en la cepa salvaje es de 1215 pb. A su vez también se verificó la presencia o ausencia del gen de apramicina (*Apr*) en los conjugantes, utilizando los *primers ApraF* y *ApraR* previamente diseñados (tamaño del producto 663 pb).

Para la amplificación de los genes *antC* y *Apr* se utilizó la enzima Taq polimerasa de NEB y se preparó la reacción de la siguiente manera: 1x buffer, 0,2 μ M de cada *primer*, 200 μ M de dNTPs, 1 μ L de DMSO, 1,25 U de Taq polimerasa y 1 μ L del ADN en un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de ciclado en ambos casos fueron: una desnaturalización inicial de 95 °C, 30 s; seguida de 35 ciclos de 95 °C, 30 s; 52 °C, 30 s; 68 °C, 90 s; y finalmente una extensión de 68 °C, 5 min. En el caso de la amplificación mediante los *primers* diseñados para verificar la edición correcta del genoma se utilizaron condiciones específicas debido a que el tamaño del producto a amplificar es muy grande (4 kb). Para llevar a cabo esta reacción se utilizó la enzima Taq polimerasa *High Fidelity* (Thermo) y las siguientes condiciones: 1x buffer, 0,4 μ M de cada *primer*, 200 μ M de dNTPs, 1 μ L de DMSO, 1,25 U de Taq polimerasa y 1 μ L del ADN en un volumen final de 25 μ L. En este caso el ciclado se programó en modo *LongRange* de la siguiente manera: una desnaturalización inicial de 95 °C, 30 s; seguido por 10 ciclos de 95 °C, 10 s; 70 °C, 30 s; 72 °C, 3 min 40 s; y a partir del ciclo 11 se agregan 5 s a la etapa de extensión por cada ciclo hasta completar 25 ciclos; y finalmente una extensión de 72 °C, 3 min. Para todas estas amplificaciones se utilizaron como muestras el ADN genómico de la cepa salvaje (MAI 2237), tres réplicas del ADN genómico de la cepa mutante (nombrado exconjugante5 o excon5) y algún derivado del plásmido pCRISP-2 en caso de corresponder.

5.2.2.10 Curado del plásmido pCRISPomyces completo de la cepa de *Streptomyces* MAI 2237 modificada.

El procedimiento para curar el plásmido pCRISPR completo implicó varias etapas de pasajes a 37 °C de la cepa mutante, dado que el plásmido presenta el gen de sensibilidad a temperatura y esto estimularía su expulsión. Este proceso se realizó en placas de SFM

inoculando la cepa mutante (excon5) con hisopo estéril cubriendo toda la placa tipo “lawn” e incubándolas el tiempo necesario hasta que esporule. Este paso se repitió 2 veces, llamándolos “pasaje1” y “pasaje2”.

Luego de estos pasajes a 37 °C, debe hacerse un *screening* exhaustivo de las colonias que crecen para localizar aquellas que se hayan curado del plásmido. Para ello, se lavó la placa obtenida del segundo pasaje con 2 mL de agua estéril, se realizaron diluciones al décimo, y se sembraron en placas de SFM que se incubaron a 30 °C. Una vez crecidas las colonias, se seleccionaron aquellas placas con aproximadamente 100 colonias y fueron utilizadas para realizar el *screening* mediante replica en placa (*replica plating*, Figura 5.7). Para ello, a partir de dicha placa madre, se realizó un sello con una tela de terciopelo y se sembró simultáneamente en una placa de SFM y otra de SFM con apramicina y se incubaron a 30 °C, 3 días. Posteriormente, se buscaron las colonias que no crecieron en SFM con Apr y que sí crecieron en SFM (sin antibiótico). Aquellas colonias que cumplieron con dicha condición se reaislaron nuevamente en medio SFM con y sin Apr y se incubaron a 30 °C.

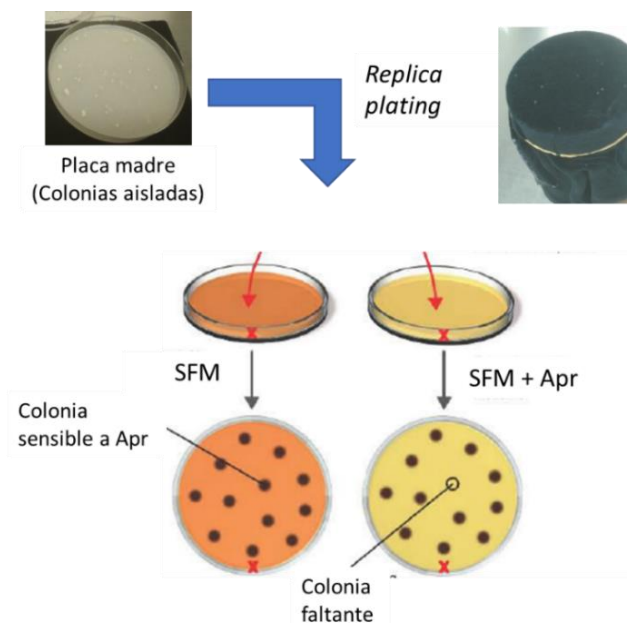


Figura 5.7. *Screening* de colonias sensibles a apramicina mediante *replica plating* para la curación del plásmido pCRISPR.

5.2.3 Evaluación de la actividad nematocida frente a *C. elegans* en la cepa *Streptomyces* MAI 2237 y el mutante $\Delta antC$

Para evaluar el fenotipo de la cepa mutante (excon5) se llevaron a cabo dos experimentos. En primer lugar, se utilizaron las condiciones de cultivo del *screening* del capítulo 3. La cepa salvaje MAI2237 y tres réplicas del excon5 fueron inoculadas en tubos de 10 mL de SCN e incubadas durante 7 días a 180 rpm. En una segunda instancia la actividad de ambas cepas se evaluó también a partir de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivo en medio SFM, siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 3. En este ensayo, a partir de los sobrenadantes obtenidos, se separó una alícuota de 1 mL para liofilizar y el volumen restante fue utilizado en la extracción orgánica. En ambos casos, el ensayo de bioactividad con los gusanos fue realizado como se detalla en el Capítulo 3 y se evaluaron los resultados en la lupa a las 24 y 48 hs, utilizando los controles correspondientes.

5.3 Resultados

5.3.1 Análisis del BGC de antimicina de la cepa MAI 2237 y verificación de su expresión.

En la región denominada 13.3 del genoma de la cepa MAI2237 se identificó un BGC con una similitud del 100% de los genes frente al BGC de la antimicina (BGC0001455) de *Streptomyces argillaceus* (Figura 5.8). Dicho BGC abarca una región de 52.249 nucleótidos y se clasificó dentro del tipo híbridos NRPS-PKS debido a que presenta ambos tipos de genes. Este BGC está compuesto por dos genes “core”, los cuales resultan esenciales para la biosíntesis de este metabolito, así como genes adicionales, de transporte y regulatorios como se observa en la Figura 5.8B. En dicha Figura se observa la comparativa de este BGC (“query”) con el correspondiente BGC de la antimicina descrito en la cepa de referencia. Los genes *core* presentaron homología con los genes *antC* que codifica para una sintasa de péptidos no ribosomales (NRPS) y *antD* que codifica para una poliquétido sintasa de tipo I (PKS I) del BGC0001455. Los resultados obtenidos al realizar el BlastP entre *antC* y su homólogo en la región 13.3 fue de un 82% de identidad y una cobertura del 100%. Por su parte, la comparación entre el gen *antD* y su homólogo reveló un 81% de identidad de secuencia y una cobertura del 100%. También se puede observar la presencia de dos genes entre *antE* y *antF* en el BGC de la cepa MAI 2237 que no se encuentran presentes en el BGC de referencia. Los resultados obtenidos al realizar BlastP con estos genes, muestran similitud con un regulador transcripcional de la familia MarR de *Streptomyces* (98,5 % identidad de secuencia con una cobertura del 97 %) y el otro codifica para una metalo-hidrolasa también identificada en *Streptomyces* (98,2 % de identidad de secuencia con una cobertura del 100 %).

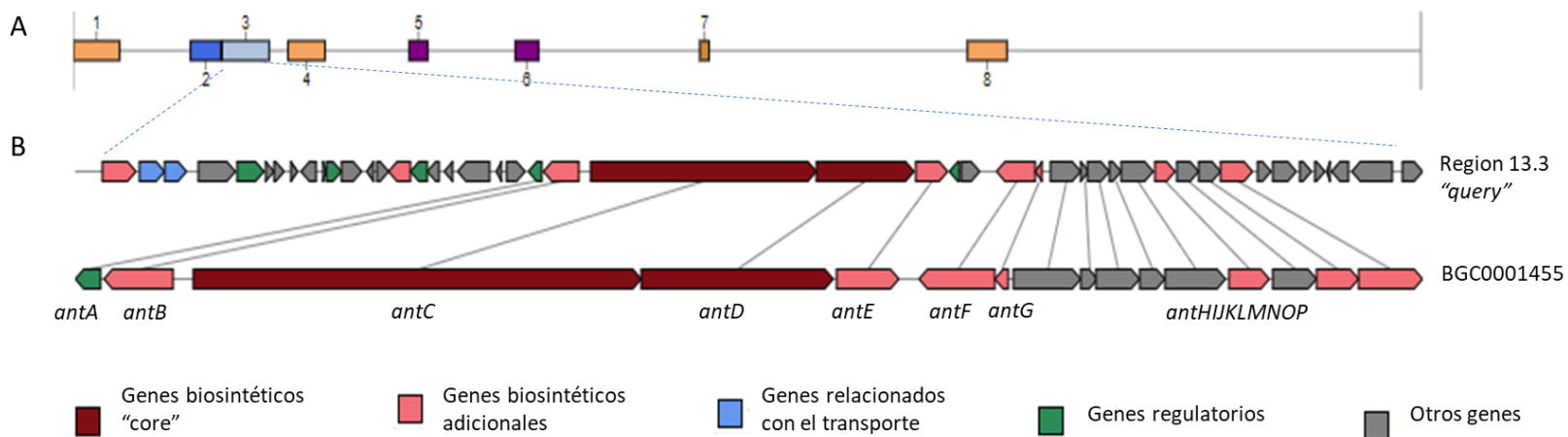


Figura 5.8. BGC de antimicina de la cepa de *Streptomyces* MAI 2237. (A) Esquema del *contig* 13, donde se muestra la ubicación de varios BGCs detectados por AntiSMASH, el rectángulo celeste (3) representa el BGC de antimicina. En (B) se observa en detalle dicho BGC y su comparación por homología en la secuencia (indicada con flechas grises) con el BGC 0001455 de antimicina de la cepa de *S. argillaceus*. Los colores representan los distintos tipos de genes como se indica en la figura.

A partir del análisis metabolómico realizado mediante LC-MS/MS (Capítulo 4), se realizó específicamente la búsqueda de los cuatro tipos de antimicinas más comunes en el software del equipo utilizado (Compass Data Analysis) cuyas fórmulas químicas son: $C_{25}H_{34}N_2O_9$, $C_{26}H_{36}N_2O_9$, $C_{27}H_{38}N_2O_9$ y $C_{28}H_{40}N_2O_9$. Se determinó la presencia de dichas antimicinas únicamente en el extracto de la cepa MAI 2237 en medio SFM con un tiempo de retención de entre 6,25 y 6,74 min. En la Figura 5.9 se muestra (arriba) el cromatograma obtenido para todos los compuestos detectados en esa muestra, y los cromatogramas extraídos del ión precursor $M+H$ (EIC, *Extracted Ion Chromatogram*) correspondientes a dichas estructuras. El detalle de los espectros de masas obtenidos para estos compuestos se muestra en el anexo V.

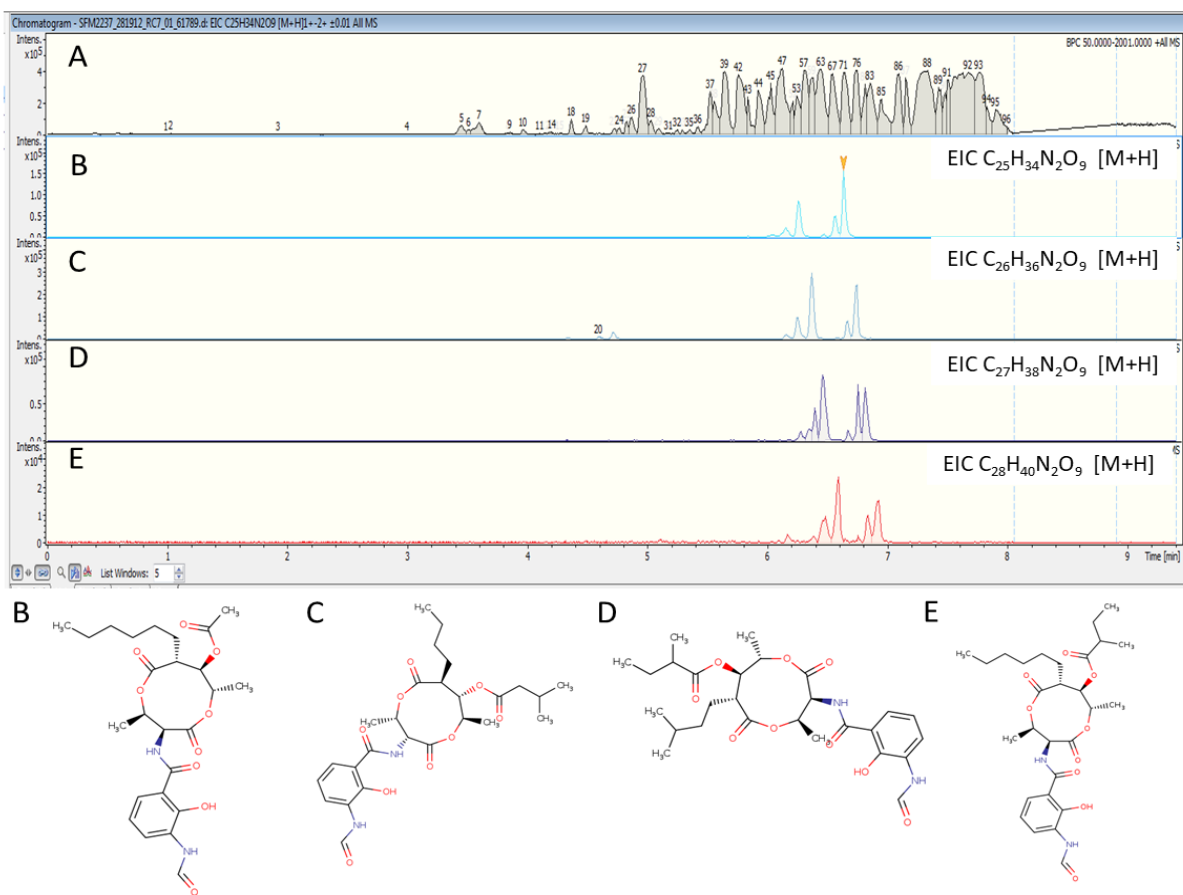


Figura 5.9. (A) Cromatograma obtenido mediante LC-MS/MS para la muestra correspondiente al extracto de la cepa MAI 2237 en medio SFM. (B, C, D y E) Cromatogramas extraídos del ión precursor

M+H (EIC) para las estructuras de las antimicinas $C_{25}H_{34}N_2O_9$, $C_{26}H_{36}N_2O_9$, $C_{27}H_{38}N_2O_9$ y $C_{28}H_{40}N_2O_9$, respectivamente mostradas en la parte inferior de la imagen.

5.3.2 Evaluación de la capacidad de conjugación y sensibilidad a antibióticos de la cepa a modificar

La cepa MAI 2237 demostró ser capaz de conjugarse debido a que se observó la presencia de exconjugantes de *Streptomyces* en las placas utilizadas para tal fin luego de 6 días de incubación. Ambos ratios evaluados de donador:aceptor dieron buenos resultados, pero se observó un mayor número de colonias en el ratio 10:1 (Figura 5.10A), por lo cual esta condición fue seleccionada para posteriores conjugaciones. En el control de conjugación utilizando *S. albus* como aceptor, los exconjugantes se observaron en el borde de la placa luego de 3 días de incubación. A su vez, la cepa MAI 2237 mostró ser sensible a apramicina y resistente al ácido nalidíxico (Apr^S , Nal^R), verificando así el fenotipo deseado para realizar el mutante utilizando el plásmido pCRISP-2 (Figura 5.10B).

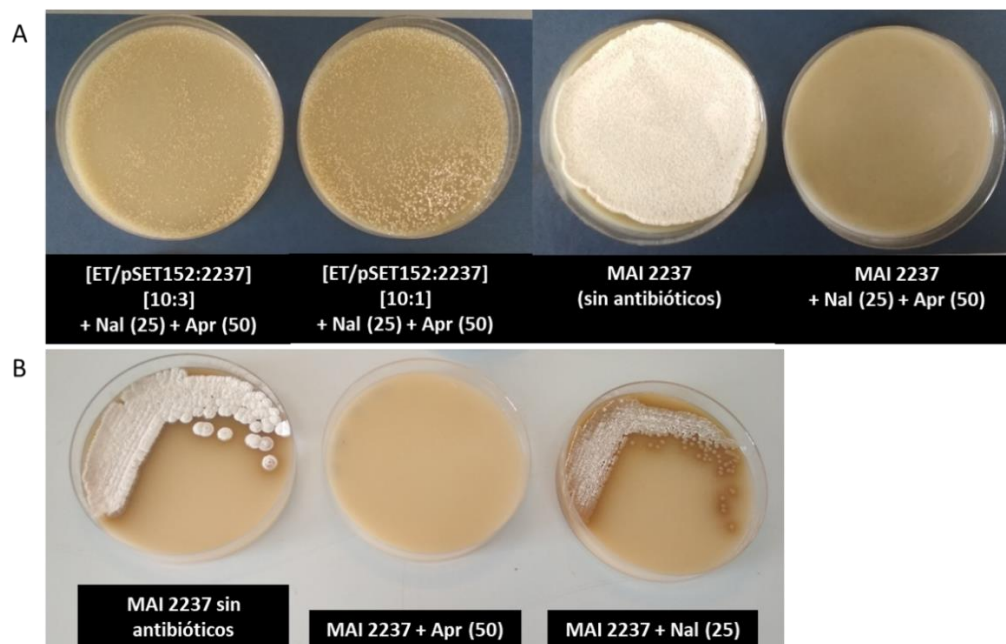


Figura 5.10. Evaluación de la capacidad de conjugación (A) y de la sensibilidad a antibióticos (B) de la cepa a modificar *Streptomyces* MAI 2237.

5.3.3 Construcción del plásmido pCRISPR con los elementos necesarios para realizar la edición genética.

El primer paso para la construcción del plásmido fue incorporar el ARN guía seleccionado dentro del plásmido pCRISPR-2 mediante ensamblaje tipo *Golden Gate* y posteriormente transformar células *XL-gold* de *E. coli* para seleccionar aquellas que incorporaron el vector con el inserto (sgARN). Este paso se llevó a cabo tanto utilizando el sgARN-18 y el sgARN-22, y en ambos casos se obtuvieron colonias blancas (6 y 2 colonias respectivamente) (Figura 5.11A). Para verificar su coloración, una colonia blanca con cada plásmido obtenido (pCRISPR-sg18 y pCRISPR-sg22) junto con una colonia azul, fueron re-aisladas en medio LB con apramicina, X-Gal y IPTG (Figura 5.11B). Estas cepas fueron guardadas en glicerol 10% para su uso posterior.

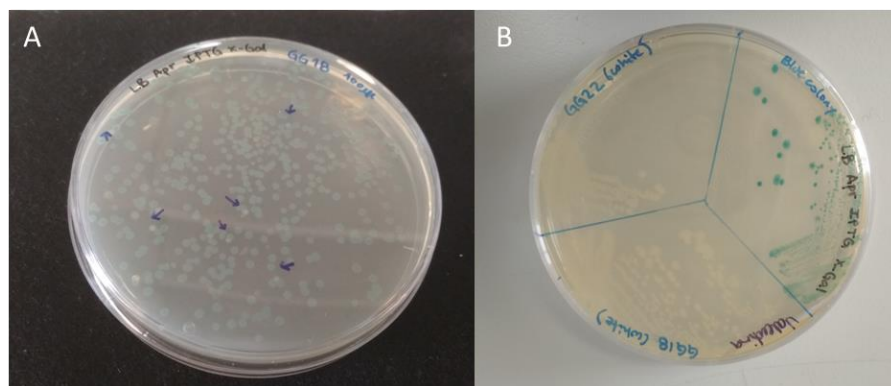


Figura 5.11. Resultados del ensamblaje *Golden Gate* y transformación en *E. coli* XL-gold en placas de LB conteniendo apramicina, X-Gal e IPTG. A. Placa resultante de la transformación con el plásmido pCRISPR-sg18 donde se observan mayoría de colonias azules (sin inserto) y 6 colonias blancas (con inserto) indicadas con flechas. B. Re-aislamiento de las colonias blancas obtenidas en la transformación con pCRISPR-sg18 y pCRISPR-sg22, y una colonia azul.

La amplificación de los brazos homólogos (*Left-arm* y *Right-arm*) a partir del genoma de *Streptomyces* MAI 2237, implicó una previa optimización de la PCR, donde se evaluó un rango de temperatura de hibridación de 62 a 72 °C. Las condiciones óptimas para la amplificación de dichos brazos fueron: una desnaturalización inicial de 98 °C, 30 s; seguida

de 30 ciclos de 98 °C, 10 s; 72 °C, 30 s; 72 °C, 90 s; y finalmente una extensión de 72 °C, 2 min. En la Figura 5.12A se muestran los resultados de dicha optimización, donde se observa que a la temperatura de 72 °C se observa una banda intensa de 2 kb, la cual fue posteriormente purificada (para ambos brazos). Se obtuvieron 17,2 y 31,4 ng/μL de los productos purificados de los brazos derecho e izquierdo respectivamente, lo cual fue insuficiente para realizar el ensamblaje tipo Gibson y fue necesario repetir la PCR y purificar nuevamente, obteniéndose 88,7 y 31,9 ng/μL respectivamente. A su vez, se verificó en gel la pureza de los plásmidos pCRISPR-sg18 y pCRISPR-sg22 (linearizados, desfosforilados y purificados) como se observa en la Figura 5.12B y se midieron en Nanodrop obteniéndose 251 y 115 ng/μL del pCRISPR-sg18 y pCRISPR-sg22, respectivamente.

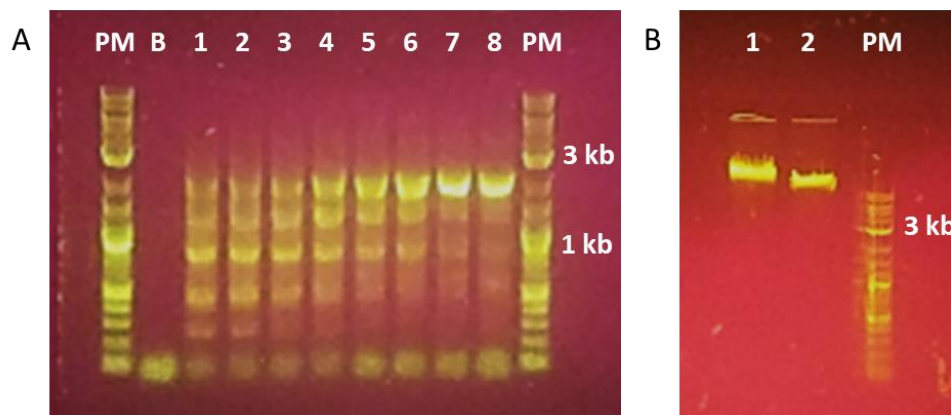


Figura 5.12. Geles de agarosa 1%. (A) Optimización de la temperatura de hibridación para la amplificación de los brazos homólogos, con el brazo derecho (*Right-arm*) como ejemplo. PM- marcador de peso molecular (se indican los tamaños de las bandas más intensas), B- blanco de reacción; 1: 62°C; 2: 62,7 °C, 3: 64 °C; 4: 65,8 °C; 5- 68,0 °C; 6- 70,1 °C; 7- 71,8 °C; 8- 72,0 °C. (B) Chequeo de la integridad de los plásmidos pCRISPR-sg18 (1) y pCRISPR-sg22 (2). PM: Marcador de peso molecular.

Una vez realizado el ensamblaje tipo Gibson a partir de estos productos, se realizó la transformación correspondiente. Los resultados de dicha transformación fueron positivos dando lugar a 81 colonias para el protoespaciador 18 y 40 colonias para el protoespaciador 22 (Figura 5.13). También se observó un número mayor de colonias en ambos casos, al

sembrar las células transformadas con el vector sin el inserto. No se observaron colonias en el control sembrado con células sin transformar.

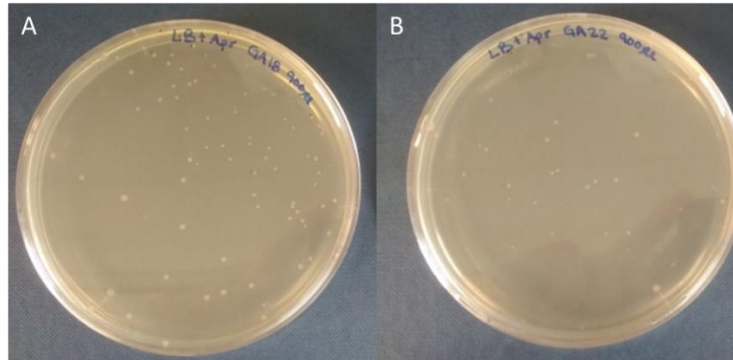


Figura 5.13. Resultados de la transformación posterior al ensamblaje tipo Gibson en placas de LB con apramicina. (A) Colonias transformadas con el plásmido pCRISPR-sg18-Arms y (B) con el plásmido pCRISPR-sg22-Arms.

Se seleccionaron tres transformantes de cada uno para realizar los chequeos siguientes y confirmar la construcción del plásmido pCRISPR completo. A partir de cada una de estas colonias, se obtuvieron los plásmidos correspondientes pCRISPR-sg18-Arms (T4, T5 y T6) y pCRISPR-sg22-Arms (T1, T2 y T3) mediante miniprep. La concentración de plásmidos obtenida medida en Nanodrop fue de 152, 204 y 182 ng/ μ L para T1, T2 y T3 respectivamente y de 533, 469 y 501 ng/ μ L para T4, T5 y T6 respectivamente. Estas muestras fueron utilizadas en la PCR para la confirmación de la construcción del plásmido pCRISPR completo utilizando los *primers* *pF_left-arm* y *pR2_right-arm*. Como se puede observar en la Figura 5.14, se observó una banda de 4 kb para los 6 plásmidos obtenidos a partir de los 6 transformantes. Estos resultados confirman la correcta construcción de los dos plásmidos. Estos plásmidos (pCRISPR-sg18-Arms y pCRISPR-sg22-Arms), se guardaron en células de *E. coli* competentes ET12567 para la conjugación.

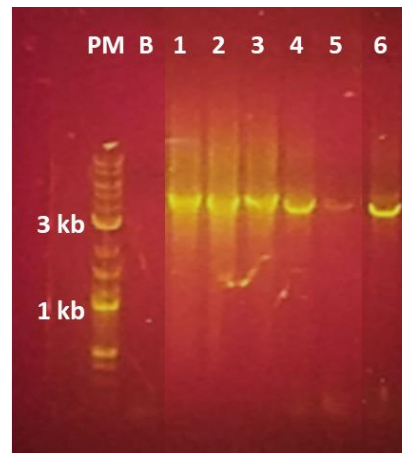


Figura 5.14. Gel de agarosa 1% para la confirmación de la construcción de los dos plásmidos pCRISPR completos mediante PCR. PM, marcador de peso molecular; B, blanco de reacción; 1-3, productos obtenidos a partir del plásmido pCRISPR-sg22-Arms; 4-6, productos obtenidos a partir del plásmido pCRISPR-sg18-Arms.

5.3.4 Conjugación y edición genómica de MAI 2237

Los resultados de la conjugación se observaron a los 8 días de incubación al observarse un exconjugante a partir de ET/pCRISPR-sg18-Arms (excon1) y 6 ex conjugantes a partir de ET/pCRISPR-sg22-Arms (excon2 a excon7). En la Figura 5.15 se observan algunos de estos exconjugantes a modo de ejemplo. Estas cepas se reaislaron y guardaron en freezer a -70°C , y se extrajo su ADN genómico para los posteriores chequeos mediante PCR.

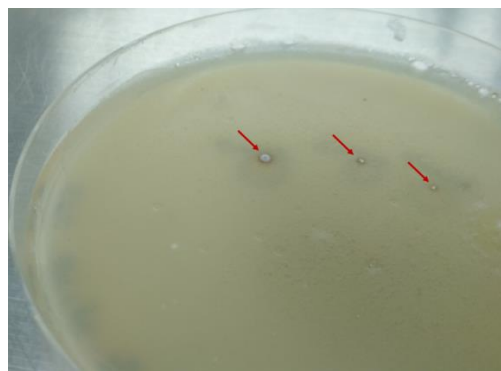


Figura 5.15. Placa de SFM con ácido nalidíxico y apramicina resultante de la conjugación ET/pCRISPR-sg22-Arms: MAI 2237. Las flechas indican colonias de exconjugantes.

En la Figura 5.16 se muestran los resultados del gel obtenido a partir de las PCR de chequeo de la edición genómica. En primer lugar, la PCR donde se amplificó el gen *antC*, sólo dió la banda correspondiente de 1215 pb en la cepa MAI 2237 *wild type* y en ninguna muestra de ADN_g de ninguno de los 7 exconjugantes. Esto demuestra la ausencia del gen de antimicinas *antC* en los 7 exconjugantes obtenidos. Posteriormente, el chequeo de presencia del gen de Apr del plásmido pCRISPR completo no funcionó para los exconjugantes que supuestamente lo tienen, pero esto puede deberse a la ausencia de ADN plasmídico en el ADN utilizado. Esta reacción sí funcionó cuando se utilizó el plásmido pCRISPR-sg22-Arms puro como muestra, obteniéndose el producto esperado de 663 pb.

Para simplificar los análisis se seleccionó el exconjugante5, para el chequeo de la edición genómica (EG) correcta y el curado del plásmido. Con respecto al chequeo de la edición genómica, la misma se realizó mediante los *primers* pF_LA2237_2 y pR_RA2237_2 y se obtuvo el producto de 4 kb deseado a partir de tres muestras de ADN_g del excon5, a pesar de que también se observaron bandas inespecíficas de otros tamaños. La cepa MAI 2237 salvaje no presentó dicha banda de 4 kb y también presentó las bandas inespecíficas, lo que corrobora la edición genómica correcta en la cepa mutante.

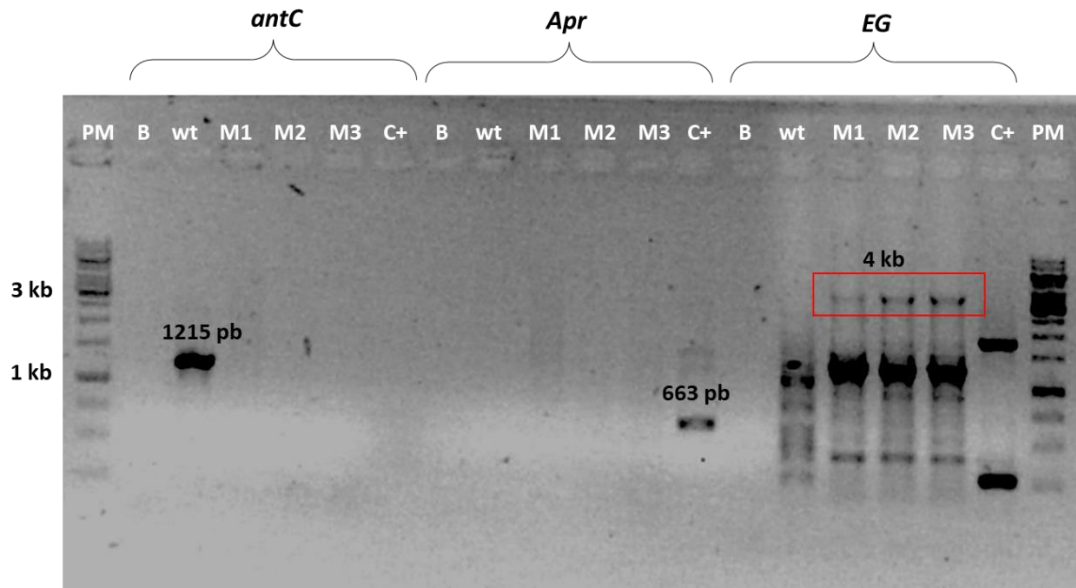


Figura 5.16. Gel de agarosa 1% de los productos de PCR para el chequeo del mutante MAI 2237 $\Delta antC$. Arriba se indica el nombre de la PCR correspondiente y junto a algunas bandas se indica su tamaño. EG: Edición genómica, la banda correspondiente se indica en el recuadro rojo. PM: Marcador de peso molecular; B: Blanco sin ADN; wt: cepa MAI 2237 salvaje; M1, M2, M3: réplicas de ADN del mutante (excon5); C+: plásmido pCRISP-sg22-A.

5.3.5 Curado del plásmido

Se siguió el procedimiento para el curado del plásmido pCRISPR a partir del mutante (excon5). El *screening* de los clones que perdieron el plásmido mediante la metodología de *replica plating* permitió encontrar 6 clones sensibles a Apr. Estos clones se re-aislaron en medio SFM con y sin antibiótico, pero no se logró verificar el fenotipo esperado (Apr^S). De todas formas, se continuó trabajando con uno de estos clones sobre los cuales se verificó la delección del gen *antC* (MAI 2237 $\Delta antC$) en los ensayos de actividad nematocida frente a *C. elegans*.

5.3.6 Evaluación de la actividad nematocida de la cepa MAI 2237 $\Delta antC$

En este ensayo donde se evaluaron las cepas salvaje y mutante, no se observaron diferencias claras de actividad entre las mismas en la lupa ni a las 24 ni a las 48 hs. Este

resultado se observó tanto en los sobrenadantes de SCN, de SFM y en los extractos orgánicos. En la muestra de la cepa salvaje y las tres réplicas de la mutante se observaron los gusanos totalmente paralizados e incluso en algunos que llegaron a producir larvas, las mismas también se encontraban muertas.

5.4 Discusión

Existen varios reportes de las antimicinas como compuestos con una potente actividad frente a diversos organismos incluyendo nemátodos, hongos, bacterias y peces (Hosotani et al., 2005; Shiomi et al., 2005; Yamamuro et al., 2011). El principal mecanismo de acción de este tipo de compuestos es el bloqueo de la cadena respiratoria, específicamente actuando a nivel del complejo III (citocromo C reductasa), inhibiendo así la respiración mitocondrial. Su ruta biosintética en actinobacterias se encuentra descrita (Liu et al., 2016; Joynt y Seipke, 2018). Sin embargo, se trata de una familia de compuestos, con numerosos derivados que varían en el tamaño y sustituyentes del anillo macrocíclico de su estructura química principal, dando lugar a la idea de que existan nuevos derivados no identificados y con nuevas propiedades. En este capítulo, se desarrolló una estrategia para establecer si la antimicina era responsable de la actividad nematocida de la cepa MAI 2237.

Comparando el BGC encontrado en la cepa MAI 2237 con el BGC de la antimicina reportado, se verificó coincidencia en el 100% de los genes y más del 80% de identidad de secuencia en los dos genes centrales de su biosíntesis *antC* y *antD*. A pesar de esto, cabe mencionar que el BGC encontrado en la cepa MAI 2237 tiene el doble de tamaño (52 kb) que el de antimicina reportado en MIBiG (BGC 1455), que tiene aprox. 26 kb. Los genes adicionales corresponden a varios genes regulatorios y a otro tipo de genes, y se encuentran en su mayoría ubicados en los extremos del BGC. Si efectivamente estos genes forman parte del *cluster*, nos podría estar indicando alguna novedad en esta ruta biosintética. También hay dos genes regulatorios, ubicados entre *antE* y *antF* que podrían implicar alguna diferencia respecto a la ruta biosintética reportada originalmente (Liu et al., 2016). Particularmente, los genes de la familia MarR (*Multiple antibiotic resistance regulator*) son un grupo de reguladores transcripcionales ampliamente distribuidos en bacterias y arqueas, incluyendo *Streptomyces*. Son genes que no han sido muy caracterizados, pero recientemente se encontró que uno de ellos presente en una cepa de *S. avermitilis* es un activador de la biosíntesis de avermectinas (Guo et al., 2018). Por su parte, la producción de antimicinas en la cepa MAI 2237 se verificó en las condiciones de incubación evaluadas (particularmente

en el medio SFM) por lo que se postuló como un buen candidato para explicar la actividad observada.

En esta tesis se incursionó en el uso de la técnica de edición genómica basada en el sistema CRISPR-Cas9 como alternativa novedosa para la modificación genética de cepas de *Streptomyces* y generación de mutantes *knock out*. En comparación con otros organismos modelo como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, las cepas de *Streptomyces* tienen poca capacidad de manipulación genética y, muchas veces, son resistentes a la edición del genoma (Cobb et al., 2015). Normalmente, para la interrupción génica en *Streptomyces*, pueden emplearse varias estrategias, como la recombinación homóloga simple de un plásmido suicida, o la integración por doble recombinación homóloga (Lapaz, 2019). Sin embargo, estos procesos conllevan múltiples pasos y suelen requerir mucho tiempo y trabajo (Cobb et al., 2015; Tao et al., 2018). Además, el número limitado de marcadores seleccionables y plásmidos adecuados en *Streptomyces* limita la reutilización de estos enfoques debido a que muchas cepas son resistentes a los antibióticos comúnmente utilizados.

En los últimos años, la edición del genoma mediada por DSB (*double strand brake*) se ha conseguido a través del sistema CRISPR-Cas de tipo II de *Streptococcus pyogenes* (Mali, 2013). El sistema CRISPR-Cas fue descrito originalmente en bacterias como sistema inmune que actúa reconociendo de manera específica el material genético de los virus que las intentan infectar, atacándolo mediante cortes en su ADN y destruyéndolo (Barrangou et al., 2007). Sin embargo, lo que ha hecho realmente famoso a este sistema, ha sido su aplicación como herramienta de edición génica, mediante la cual es posible realizar la eliminación funcional de genes o la introducción de mutaciones para estudiar sus efectos. Dado que el sistema CRISPR-Cas ha mostrado gran especificidad y precisión en la selección de secuencias, se ha convertido en una excelente opción para la edición precisa del genoma (Jinek et al., 2012). La aplicación del sistema CRISPR-Cas9 para la edición genómica en *Streptomyces* fue introducida en 2015 por Cobb y colaboradores, y desde entonces se ha utilizado en más de una veintena de trabajos para editar BGCs durante el descubrimiento o

caracterización de productos naturales (Tao et al., 2018) o para la inactivación de BGCs (Culp et al., 2019). Además, este sistema ha sido ampliamente utilizado en el laboratorio del Dr. Ryan Seipke utilizando el plásmido pCRISPomyces-2, siendo exitoso en todos los casos.

En este trabajo se verificó que la cepa MAI 2237 era capaz de hacer conjugación y que poseía el fenotipo deseado para utilizar el plásmido pCRISPomyces-2 previo a realizar el mutante. Aunque la conjugación requiere más esfuerzo experimental que la transformación, es una técnica de transferencia de ADN muy efectiva y ampliamente utilizada en *Streptomyces* debido a su resistencia natural a la electroporación y a la capacidad de transferir grandes fragmentos de ADN. En los casos donde se han reportado fallas del sistema CRISPR en *Streptomyces*, se debe principalmente a la imposibilidad de obtener exconjugantes (Culp et al., 2019). En el proceso global de la realización del mutante mediante la estrategia de CRISPR-Cas, resulta fundamental la selección del protoespaciador y el diseño correcto de los ARN guías (y de los *primers*), debido a la especificidad y precisión que presenta la técnica. El corte que realiza la Cas9 por DSB es sumamente preciso y si la Cas9 corta en otra región del genoma la edición fracasaría. Este es un riesgo que presenta la técnica, y por este motivo suelen diseñarse más de un ARN guía. En este trabajo, se diseñaron dos ARNs guía y ambos lograron generar clones promisorios. También resultó fundamental la verificación de cada uno de los pasos para la construcción del plásmido completo. Finalmente, se verificó la edición correcta del genoma de la cepa MAI 2237 $\Delta antC$ y que el gen esencial para la síntesis de antimicinas estaba ausente. Uno de los mayores problemas encontrados en la construcción del mutante mediante esta metodología fue el paso final de curado del plásmido completo mediante los pasajes a 37 °C. El plásmido completo tiene un tamaño considerable (14,5 kb), por lo cual no es sencillo para la bacteria eliminarlo. Además, la utilización de este sistema en otras cepas ha generado controversias a la hora del curado del plásmido (M. Elliot, comunicación personal). Si bien los intentos para lograrlo fueron muchísimos, así como los chequeos de temperatura de incubación, etc; esta es una etapa bastante tediosa ya que la cepa modificada es de crecimiento muy lento y tarda más de 10 días en esporular al incubarla a una temperatura que no es la óptima. También se postula

que el antibiótico utilizado haya perdido actividad y que esto hubiese causado el problema. De todas formas, y debido a que el mutante fue realizado con el único fin de evaluar fenotipo, se decidió utilizar la cepa obtenida ya que se pudo verificar la correcta delección del gen *antC*. La eliminación del plásmido se realiza con el objetivo de eliminar la enzima Cas9 de la cepa, ya que el hecho de tener la enzima activa podría generar algún corte no deseado en posteriores cultivos de la cepa.

Finalmente, cuando se evaluó la actividad nematocida en el ensayo con gusanos con la cepa MAI 2237 $\Delta antC$ no se observaron diferencias fenotípicas claras respecto a la cepa MAI 2237 salvaje (*wild type*). Este resultado sugiere que las antimicinas podrían contribuir, pero no serían esenciales para la actividad nematocida frente a *C. elegans*. Sin embargo, para poder confirmar esto sería recomendable repetir el ensayo de actividad nematocida asegurando una mejor disolución de los compuestos presentes en los sobrenadantes y extractos ya que son factores que pueden afectar de forma aleatoria la movilidad de los gusanos.

Si bien la actividad nematocida de las antimicinas ha sido reportada, en este trabajo no se evaluó el compuesto puro sino en una mezcla compleja. Además, el BGC de la antimicina no se encontró en las otras cuatro cepas secuenciadas que también tuvieron actividad. Asimismo, se realizó la búsqueda del gen *antC* en las restantes 17 cepas que también tuvieron actividad nematocida en los sobrenadantes (Capítulo 3), y el mismo se encontró únicamente en las cepas MAI 2305 y MAI 2312. Estos resultados, nos permiten concluir que la cepa MAI 2237 produce otros metabolitos que contribuyen a la actividad nematocida frente a *C. elegans*.

En un artículo reciente, los autores demostraron que la inactivación de determinados BGCs de antibióticos comunes como la estreptomicina, dieron lugar al descubrimiento de nuevas variantes de otros antibióticos como la tiolactomicina, amicitina, y fenantroviridina (Culp et al., 2019). Los autores observaron muchas diferencias fenotípicas entre las cepas mutadas y las salvajes (incluyendo tasa de crecimiento, esporulación y pigmentación), sugiriendo un recableado de las vías transcripcionales y/o de suministro de precursores que

regulan el metabolismo secundario en actinomicetos. El recableado transcripcional en cepas manipuladas puede ser el resultado de la acumulación de intermediarios biosintéticos que pueden interactuar con factores de transcripción para activar la expresión de otras enzimas o la interacción con otras vías biosintéticas. Junto con la liberación de precursores, estos mecanismos dan lugar a cambios en el perfil metabólico para poder permitir luego la identificación de compuestos no detectables en cepas del tipo silvestre.

Como perspectiva de este trabajo, se plantea la evaluación de los perfiles metabólicos de los sobrenadantes o extractos de la cepa salvaje y mutante mediante los abordajes metabolómicos utilizados en esta tesis, EM y RMN. Este análisis nos permitiría verificar si las antimicinas efectivamente no son producidas por la cepa MAI 2237 $\Delta antC$ por causa de la deleción del gen *antC*, y si la inactivación de este BGC da lugar a otras alteraciones en las vías biosintéticas expresadas en esta cepa. Por otro lado, para terminar de dilucidar los metabolitos asociados con la actividad nematocida, se podría realizar un fraccionamiento bioguiado a partir del sobrenadante de la cepa MAI 2237, evaluando los perfiles metabólicos de las diferentes fracciones.

CAPÍTULO 6

CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

El género *Streptomyces* ha sido una rica fuente de productos naturales bioactivos y nuevos fármacos durante tres cuartos de siglo. Sin embargo, muchos trabajos sugieren que el género es capaz de producir unos 150.000 compuestos bioactivos más que todos los reportados hasta la fecha. Investigadores de todo el mundo siguen explorando este enorme potencial utilizando una variedad de estrategias que incluyen la modificación de las condiciones de cultivo, minería de genomas, expresión heteróloga y otros enfoques para la activación de grupos de genes biosintéticos crípticos. Estos trabajos demuestran el potencial de *Streptomyces* como fuente de nuevos productos naturales de interés.

Nuestro grupo de investigación viene trabajando desde hace varios años en el estudio de las especies de *Streptomyces* causantes de la sarna común en la papa, una enfermedad que causó y sigue causando serios problemas económicos a los productores uruguayos. El enfoque metabolómico de esta tesis comenzó evaluando perfiles de ^1H RMN para profundizar en las fitotoxinas responsables de dicha enfermedad y así poder contribuir a su control. Se pudieron encontrar asociaciones entre los perfiles metabólicos de cepas relacionadas filogenéticamente, identificando así, por ejemplo, que la desmetilmensacarcina está asociada principalmente a la especie *S. neiviscabies*. Si bien se identificó a la taxtomina y la desmetilmensacarcina como principales responsables de la patogenicidad en las cepas de nuestra colección, este enfoque permitió también plantear la hipótesis de la existencia de nuevos metabolitos fitotóxicos que aún no han sido identificados y priorizar las cepas que los producen para futuros estudios.

Por otra parte, en esta tesis se profundizó en la caracterización de las cepas de *Streptomyces* no patógenas, evaluando su potencial en la producción de metabolitos con actividad nematocida y en la promoción del crecimiento vegetal. El potencial de aplicación de este recurso microbiano fue verificado en esta tesis al encontrarse una alta proporción de cepas con alguna de las actividades buscadas. Los resultados obtenidos permitieron valorizar esta colección y seleccionar cepas de *Streptomyces* productoras de compuestos con actividad nematocida frente a *C. elegans* y con actividades vinculadas a la promoción del crecimiento vegetal como la producción de auxinas, de sideróforos y la solubilización de fósforo.

Asimismo, se implementaron nuevas metodologías de *screening* de estas actividades que podrán ser aplicadas para la evaluación de nuevas cepas. Como perspectiva de esta tesis, se plantea continuar profundizando en la caracterización de estas cepas por su potencial de aplicación en la agricultura, evaluando su capacidad de promover el crecimiento de los cultivos mediante ensayos de inoculación a nivel de invernáculo y mediante ensayos de antagonismo frente a diferentes patógenos. Estos trabajos permitirán complementar otros abordajes que lleva adelante el grupo de investigación para el control de enfermedades bacterianas que afectan a cultivos hortícolas entre otros. Además, los genomas de *Streptomyces* secuenciados en esta tesis, son una gran fuente de información para la búsqueda de una gran variedad de actividades, así como enzimas novedosas.

Un aspecto importante abordado en esta tesis fue la implementación de análisis de redes de datos genómicos y metabolómicos que contribuyeron a representar de forma global la diversidad biosintética de las cepas seleccionadas. La información generada es un insumo muy valioso para la priorización de cepas y condiciones de cultivo en futuros estudios. La correspondencia de los metabolitos con los grupos de genes involucrados en su biosíntesis permite identificar a sus productores y facilita los estudios sobre su producción y función ecológica. Para algunos de los productos naturales identificados en este estudio, se logró establecer este nexo metaboloma-genoma y su similitud con otros productos bioactivos ya reportados. Dentro de este grupo se destacan los compuestos sideróforos del grupo de las desferroxiaminas, compuestos de la familia de las antimicinas, de la germicidina, entre otros. Por otro lado, se encontraron otros candidatos para los cuales no se encontraron coincidencias en bases de datos y que se destacan por tratarse de compuestos potencialmente novedosos. En particular, como perspectiva de esta tesis se propone profundizar en la caracterización de metabolitos de la familia de los RiPPs, para los cuales se encontraron BGCs en las 5 cepas de *Streptomyces* secuenciadas, incluyendo algunas familias novedosas que no mostraron coincidencias con las reportadas en bases de datos. Este tipo de metabolitos microbianos presentan una gran diversidad química dada por

diversas modificaciones postraduccionales, que dan lugar a una amplia gama de actividades biológicas.

En relación con la actividad nematocida de las cepas seleccionadas, los análisis realizados permitieron identificar algunos compuestos promisorios, seleccionando la antimicina como compuesto candidato para la cepa MAI 2237. El análisis genético funcional realizado sugiere que las antimicinas podrían contribuir, pero no serían esenciales para la actividad nematocida frente a *C. elegans*. Es necesario continuar profundizando en este análisis para terminar de dilucidar el rol de las antimicinas o de otros metabolitos con actividad producidos por esta cepa. Para ello, se propone realizar un fraccionamiento bio guiado de los sobrenadantes de cultivo, evaluando los perfiles metabólicos de las fracciones con actividad mediante los abordajes metabolómicos utilizados en esta tesis e integrandolos con la información genómica disponible. Esta estrategia se podría aplicar también para las otras cepas con actividad seleccionadas, ampliando así las posibilidades de identificar compuestos novedosos con actividad nematocida. Por otro lado, es importante destacar que el trabajo realizado permitió implementar la herramienta de edición génica basada en CRISPR-Cas, demostrando su utilidad para la generación de cepas mutantes de *Streptomyces*.

En suma, la ejecución de esta tesis contribuyó a caracterizar una colección de cepas *Streptomyces*, aportando a la implementación de nuevas herramientas de análisis metabolo-genómicos que serán de gran utilidad para futuros proyectos. Además, se cuenta con un repertorio de cepas bioactivas caracterizadas y con un gran volumen de información sobre sus perfiles metabólicos y sus genomas que sugieren la existencia de nuevas moléculas sobre las cuáles continuar profundizando.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Alla, M. H., El-Sayed, E.-S. A., and Rasmey, A.-H. M. (2014). Indole-3-Acetic acid production of *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil of Egypt. *J. Biol. Earth Sci.* 3, 182–193. Available at: <http://newjournals.tmkarpinski.com/index.php/jbes/article/view/76/65>.
- Agrawal, P., Khater, S., Gupta, M., Sain, N., and Mohanty, D. (2017). RiPPMiner : a bioinformatics resource for deciphering chemical structures of RiPPs based on prediction of cleavage and cross-links. *Nucleic Acids Res.* 45, 80–88. doi:10.1093/nar/gkx408.
- Alam, K., Mazumder, A., Sikdar, S., Zhao, Y., Hao, J., Song, C., et al. (2022). *Streptomyces* : The biofactory of secondary metabolites. *Front. Microbiol.*, 1–21. doi:10.3389/fmicb.2022.968053.
- Alanjary, M., Steinke, K., and Ziemert, N. (2019). AutoMLST : an automated web server for generating multi-locus species trees highlighting natural product potential. *Nucleic Acids Res.* 47, 276–282. doi:10.1093/nar/gkz282.
- Andreu, V. P., Augustijn, H. E., Chen, L., Zhernakova, A., Fu, J., Fischbach, M. A., et al. (2021). A systematic analysis of metabolic pathways in the human gut microbiota. *bioRxiv*, 2021.02.25.432841. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.02.25.432841v1.abstract>.
- Aoki, Y., Matsumoto, D., Kawaide, H., and Natsume, M. (2011). Physiological role of germicidins in spore germination and hyphal elongation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Antibiot. (Tokyo)*. 64, 607–611. doi:10.1038/ja.2011.59.
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., et al. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* 30, 108–160. doi:10.1039/c2np20085f.
- Arnold M. 2002. CD-aktive metabolite aus Streptomycceten sowie Untersuchung der

Biosyntheseleistungen des Mensacarcin-Bildners *Streptomyces* sp. Go C4/4.
Gottingen: Cuvillier Verlag.

- Aron, A. T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L. F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., et al. (2020). Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nat. Protoc.* 15, 1954–1991. doi:10.1038/s41596-020-0317-5.
- Atkinson, H. J., Lilley, C. J., and Urwin, P. E. (2012). Strategies for transgenic nematode control in developed and developing world crops. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 251–256. doi:10.1016/j.copbio.2011.09.004.
- Audoin, C., Zampal gr, A., Blanchet, N., Giuliani, A., Roulland, E., Lapr vote, O., et al. (2018). MS/MS-guided isolation of clarinoside, a new anti-inflammatory pentalogin derivative. *Molecules* 23, 1–9. doi:10.3390/molecules23051237.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., et al. (2008). The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 1–15. doi:10.1186/1471-2164-9-75.
- Babcock, M. J., Eckwall, E. C., and Schottel, J. L. (1993). Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1579–1586. doi:10.1099/00221287-139-7-1579.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richardss, M., Boyaval, P., Moineau, S., et al. (2007). CRISPR Provides Acquired resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science (80-)*. 315, 1709–1712. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17379808/>.
- Becerril, A., Álvarez, S., Braña, A. F., Rico, S., Díaz, M., Santamaría, R. I., et al. (2018). Uncovering production of specialized metabolites by *Streptomyces argillaceus*: Activation of cryptic biosynthesis gene clusters using nutritional and genetic approaches. *PLoS One* 13, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0198145.
- Belin, B. J., Busset, N., Giraud, E., Molinaro, A., Silipo, A., and Newman, Di. K. (2018). Hopanoid lipids: From membranes to plant-bacteria interactions. *Nat. Rev. Microbiol.*

- 16, 304–315. doi:10.1038/nrmicro.2017.173.
- Belknap, K. C., Park, C. J., Barth, B. M., and Andam, C. P. (2020). Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in *Streptomyces* bacteria. *Sci. Rep.* 10, 1–9. doi:10.1038/s41598-020-58904-9.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces*. *Nature* 3, 141–147.
- Berdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 58, 1–26. doi:10.1038/ja.2005.1.
- Betancur, L. A., Naranjo-Gaybor, S. J., Vinchira-Villarraga, D. M., Moreno-Sarmiento, N. C., Maldonado, L. A., Suarez-Moreno, Z. R., et al. (2017). Marine Actinobacteria as a source of compounds for phytopathogen control: An integrative metabolic-profiling/bioactivity and taxonomical approach. *PLoS One* 12, 1–25. doi:10.1371/journal.pone.0170148.
- Bignell, D. R. D., Cheng, Z., and Bown, L. (2018). The coronafacoyl phytotoxins: structure, biosynthesis, regulation and biological activities. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 111, 649–666. doi:10.1007/s10482-017-1009-1.
- Bignell, D. R. D., Fyans, J. K., and Cheng, Z. (2014). Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *J. Appl. Microbiol.* 116, 223–235. doi:10.1111/jam.12369.
- Bignell, D. R. D., Seipke, R. F., Hugueta-Tapia, J. C., Chambers, A. H., Parry, R. J., and Loria, R. (2010). *Streptomyces scabies* 87-22 contains a coronafacic acid-like biosynthetic cluster that contributes to plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 161–175. doi:10.1094/MPMI-23-2-0161.
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., Van Wezel, G. P., Medema, M. H., et al. (2021). AntiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Res.* 49, W29–W35. doi:10.1093/nar/gkab335.
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, Y., et al. (2019). antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* 47, 81–87. doi:10.1093/nar/gkz310.

- Bouček-Mechiche, K., Gardan, L., Normand, P., and 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 s. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 91–99. doi:10.1099/00207713-50-1-91.
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez Bravo, J., and Acosta Echeverría, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *An. Biol. ISSN 1138-3399, ISSN-e 1989-2128, N° 27, 2005, págs. 137-142, 137–142.*
- Cao, Z., Khodakaramian, G., Arakawa, K., and Kinashi, H. (2012). Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 353–357. doi:10.1271/bbb.110799.
- Chapleau, M., Guertin, J. F., Farrokhi, A., Lerat, S., Burrus, V., and Beaulieu, C. (2016). Identification of genetic and environmental factors stimulating excision from *Streptomyces scabiei* chromosome of the toxicogenic region responsible for pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* 17, 501–509. doi:10.1111/mpp.12296.
- Chen, J., Liu, M., Liu, X., Miao, J., Fu, C., Gao, H., et al. (2016). Interrogation of *Streptomyces avermitilis* for efficient production of avermectins. *Synth. Syst. Biotechnol.* 1, 7–16. doi:10.1016/j.synbio.2016.03.002.
- Chen, Y., Tang, J., Tang, X., Wang, C., Lian, Y., Shao, Z., et al. (2013). New phenethylamine derivatives from *Arenibacter nanhaiticus* sp. nov. NH36A T and their antimicrobial activity. *J. Antibiot. (Tokyo).* 66, 655–661. doi:10.1038/ja.2013.65.
- Cheng, C., and Hua, Z. C. (2020). Lasso Peptides: Heterologous Production and Potential Medical Application. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8. doi:10.3389/fbioe.2020.571165.
- Chevrette, M. G., Gutiérrez-García, K., Selem-mojica, N., Aguilar-Martinez, C., Yañez-Olvera, A., Ramos-Aboites, H. E., et al. (2019). Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria. *Nat. Prod. Rep.* doi:10.1039/c9np00048h.
- Chu, B. C., Alicia Garcia-herrero, Johanson, T. H., Krewulak, K. D., Lau, C. K., Peacock, R. S., et al. (2010). Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a

- bird 's eye view. *Biometals* 23, 601–611. doi:10.1007/s10534-010-9361-x.
- Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H. J., Penninga, N. A., Bormann, C., Salas, J. A., et al. (2004). The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplins. *Mol. Microbiol.* 53, 433–443. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04143.x.
- Cobb, R. E., Wang, Y., and Zhao, H. (2015). High-Efficiency Multiplex Genome Editing of *Streptomyces* Species Using an Engineered CRISPR/Cas System. *ACS Synth. Biol.* 4, 723–728.
- Costa dos Santos, G., Renovato-Martins, M., and de Brito, N. M. (2021). The remodel of the “central dogma”: a metabolomics interaction perspective. *Metabolomics* 17. doi:10.1007/s11306-021-01800-8.
- Craney, A., Ahmed, S., and Nodwell, J. (2013). Towards a new science of secondary metabolism. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 387–400. doi:10.1038/ja.2013.25.
- Culp, E. J., Yim, G., Waglechner, N., Wang, W., Pawlowski, A. C., and Wright, G. D. (2019). Hidden antibiotics in actinomycetes can be identified by inactivation of gene clusters for common antibiotics. *Nat. Biotechnol.* 37, 1149–1154. doi:10.1038/s41587-019-0241-9.
- Da Silva, R. R., Dorrestein, P. C., and Quinn, R. A. (2015). Illuminating the dark matter in metabolomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 12549–12550. doi:10.1073/pnas.1516878112.
- Dahal, B., NandaKafle, G., Perkins, L., and Brözel, V. S. (2017). Diversity of free-living nitrogen fixing *Streptomyces* in soils of the badlands of South Dakota. *Microbiol. Res.* 195, 31–39. doi:10.1016/j.micres.2016.11.004.
- Damayanti, E., Widada, J., Dinoto, A., and Mustofa (2021). Antiplasmodial activity and genome mining study of marine-derived *Streptomyces* sp. GMY01. *Indones. J. Pharmacol. Ther.* 2, 50–60. doi:10.22146/ijpther.1335.
- Davies, J. (2013). Specialized microbial metabolites : functions and origins. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 361–364. doi:10.1038/ja.2013.61.
- Dede, A., Güven, K., and Şahin, N. (2020). Isolation, plant growth-promoting traits,

- antagonistic effects on clinical and plant pathogenic organisms and identification of actinomycetes from olive rhizosphere. *Microb. Pathog.* 143. doi:10.1016/j.micpath.2020.104134.
- de Hoffmann y Stroobant. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd Edition Wiley VCH; Sept 20, 2007.
- Dickschat, J. S. (2011). Isoprenoids in three-dimensional space : the stereochemistry of terpene biosynthesis. *Nat. Prod. Rep*, 1917–1936. doi:10.1039/c1np00063b.
- Dona, A. C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E. A., Varshavi, D., Veselkov, K., et al. (2016). A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 14, 135–153. doi:10.1016/j.csbj.2016.02.005.
- Doroghazi, J. R., Albright, J. C., Goering, A. W., Ju, K. S., Haines, R. R., Tchalukov, K. A., et al. (2014). Aroadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics. *Nat. Chem. Biol.* 10, 963–968. doi:10.1038/nChEMBio.1659.
- Du, L., Sanchez, C., and Shen, B. (2001). Hybrid Peptide Polyketide Natural Products : Biosynthesis and Prospects toward Engineering Novel Molecules. *Metab. Eng.* 3, 78–95.
- Duncan, K. R., Crüsemann, M., Lechner, A., Sarkar, A., Li, J., Ziemert, N., et al. (2015). Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from salinispora species. *Chem. Biol.* 22, 460–471. doi:10.1016/j.chembiol.2015.03.010.
- Dunshee, B. R., Leben, C., Keitt, G. W., and Strong, F. M. (1949). The Isolation and Properties of Antimycin A. 71, 2436–2437.
- Elliot, M. A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M. J., Cohen, S. N., Kao, C. M., et al. (2003). The chaplins : a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *GENES Dev.* 17, 1727–1740. doi:10.1101/gad.264403.Filamentous.
- Ekelund, S. (2012). ROC Curves: What are They and How are They Used ? *Point Care* 11, 16–21.

- Ernst, M., Kang, K. Bin, Caraballo-Rodríguez, A. M., Nothias, L. F., Wandy, J., Chen, C., et al. (2019). Molnetenhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites* 9. doi:10.3390/metabo9070144.
- Ewing, B., and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186–194. doi:10.1101/gr.8.3.186.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186–194. doi:10.1101/gr.8.3.186.
- Firn, R. D., and Jones, C. G. (2009). A Darwinian view of metabolism: Molecular properties determine fitness. *J. Exp. Bot.* 60, 719–726. doi:10.1093/jxb/erp002.
- Fischbach, M. A., and Walsh, C. T. (2006). Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics : Logic , Machinery , and Mechanisms. *Chem. Rev.* 106, 3468–3496.
- Flett, F., Mersinias, V., and Smith, C. P. (1997). High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 155, 223–229. doi:10.1016/S0378-1097(97)00392-3.
- Fyans, J. K., Bown, L., and Bignell, D. R. D. (2016). Isolation and Characterization of Plant-Pathogenic *Streptomyces* Species Associated with Common Scab-Infected Potato Tubers in Newfoundland. *Phytopathology* 106, 123–131.
- Goering, A. W., McClure, R. A., Doroghazi, J. R., Albright, J. C., Haverland, N. A., Zhang, Y., et al. (2016). Metabologenomics: Correlation of microbial gene clusters with metabolites drives discovery of a nonribosomal peptide with an unusual amino acid monomer. *ACS Cent. Sci.* 2, 99–108. doi:10.1021/acscentsci.5b00331.
- Gunther H. NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry, 3rd edition, Wiley VCH; Sept 25, 2013.
- Guo, J., Zhang, X., Lu, X., Liu, W., Chen, Z., Li, J., et al. (2018). SAV4189, a MarR-family regulator in *Streptomyces avermitilis*, activates avermectin biosynthesis. *Front. Microbiol.* 9, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2018.01358.
- Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., and Huang, Y. (2008). A multilocus phylogeny of the

- Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade : use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 149–159. doi:10.1099/ijs.0.65224-0.
- Gürtler, H., Pedersen, R., Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P. H., Wellington, E. M. H., et al. (1994). Albaflavenone, a sesquiterpene ketone with a zizaene skeleton produced by a streptomycete with a new rope morphology. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 47, 434–439. doi:10.7164/antibiotics.47.434.
- Hamilton, P. B., Carroll, F. I., Rutledge, J. H., Mason, J. E., Harris, B. S., Fenske, C. S., et al. (1969). Simple isolation of antimycin A1 and some of its toxicological properties. *Appl. Microbiol.* 17, 102–105. doi:10.1128/aem.17.1.102-105.1969.
- Hannigan, G. D., Prihoda, D., Palicka, A., Soukup, J., Klempir, O., Rampula, L., et al. (2019). A deep learning genome-mining strategy for biosynthetic gene cluster prediction. *Nucleic Acids Res.* 47. doi:10.1093/nar/gkz654.
- He, H., Shen, B., and Carter, G. T. (2000). Structural elucidation of lemomycin, a potent antibiotic from *Streptomyces candidus*. *Tetrahedron Lett.* 41, 2067–2071. doi:10.1016/S0040-4039(00)00116-7.
- Healy, F. G., Eaton, K. P., Limsirichai, P., Aldrich, J. F., Plowman, A. K., and King, R. R. (2009). Characterization of γ -butyrolactone autoregulatory signaling gene homologs in the angucyclinone polyketide WS5995B producer *Streptomyces acidiscabies*. *J. Bacteriol.* 191, 4786–4797. doi:10.1128/JB.00437-09.
- Hertweck, C., Luzhetskyy, A., and Bechthold, A. (2007). Type II polyketide synthases : gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat. Prod. Rep.*, 162–190. doi:10.1039/b507395m.
- Hillis, D. M., and Bull, J. J. (1993). An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Syst. Biol.* 42, 182–192. doi:10.1093/sysbio/42.2.182.
- Hirota-Takahata, Y., Kobayashi, H., Kizuka, M., Ohyama, T., Kitamura-Miyazaki, M., Suzuki, Y., et al. (2016). Studies on novel HIF activators, A-503451s.I. Producing organism, fermentation, isolation and structural elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 69, 747–753.

doi:10.1038/ja.2016.17.

- Hoffmann, T., Krug, D., Bozkurt, N., Duddela, S., Jansen, R., Garcia, R., et al. (2018). Correlating chemical diversity with taxonomic distance for discovery of natural products in myxobacteria. *Nat. Commun.* 9, 1–10. doi:10.1038/s41467-018-03184-1.
- Holden-Dye, L., and Walker, R. J. (2007). *Anthelmintic drugs*. doi:10.1136/vr.118.7.181.
- Hooft, J. J. J. Van Der, Mohimani, H., Dorrestein, P. C., Duncan, K. R., and Bauermeister, A. (2020). Chem Soc Rev Linking genomics and metabolomics to chart specialized metabolic diversity. *Chem. Soc. Rev.* 49, 3297–3314. doi:10.1039/D0CS00162G.
- Hopwood, D. A. (2006). “Soil To Genomics : The *Streptomyces* Chromosome,” in *Annu. Rev. Genet.* 1–23. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090639.
- Hopwood, D. A. (2019). Highlights of *Streptomyces* genetics. *Heredity (Edinb.)*, 23–32. doi:10.1038/s41437-019-0196-0.
- Hopwood, D. A., Hintermann, G., Kieser, T., and Wright, H. M. (1984). Integrated DNA Sequences in Three Streptomyces Form Related Autonomous Plasmids after Transfer to *Sf*reptomyces lividans. *Plasmid* 11, 1–16.
- Hoskisson, P. A., and Seipke, R. F. (2020). Cryptic or silent? The known unknowns, unknown knowns, and unknown unknowns of secondary metabolism. *MBio* 11, 1–5. doi:10.1128/mBio.02642-20.
- Hosotani, N., Kumagai, K., Nakagawa, H., Shimatani, T., and Saji, I. (2005). Antimycins A10-A16, seven new antimycin antibiotics produced by *Streptomyces* spp. SPA-10191 and SPA-8893. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 58, 460–467. doi:10.1038/ja.2005.61.
- Huang, C., Lin, Y., Yang, Y., and Chen, C. W. (1998). The telomeres of Streptomyces chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol. Microbiol.* 28, 905–916.
- Huang, L., Cobessi, D., Tung, E. Y., and Berry, E. A. (2005). Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc1 complex: a new crystal structure reveals an altered hydrogen-bonding pattern. *J Mol Biol* 351, 573–597.
- Huber, F., Ridder, L., Verhoeven, S., Spaaks, J. H., Diblen, F., Rogers, S., et al. (2021). Spec2Vec: Improved mass spectral similarity scoring through learning of structural

- relationships. *PLoS Comput. Biol.* 17. doi:10.1371/JOURNAL.PCBI.1008724.
- Huguet-Tapia, J. C., Lefebure, T., Badger, J. H., Guan, D., Pettis, G. S., Stanhope, M. J., et al. (2016). Genome content and phylogenomics reveal both ancestral and lateral evolutionary pathways in plant-pathogenic *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2146–2155. doi:10.1128/AEM.03504-15.
- Hwang, K. S., Kim, H. U., Charusanti, P., Palsson, B. T., and Lee, S. Y. (2014). Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 32, 255–268. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.008.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., and Shiba, T. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* 21. doi:10.1038/nbt820.
- Intaraudom, C., Rachtawee, P., Suvannakad, R., and Pittayakhajonwut, P. (2011). Antimalarial and antituberculosis substances from *Streptomyces* sp. BCC26924. *Tetrahedron* 67, 7593–7597. doi:10.1016/j.tet.2011.07.053.
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., and Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* 9, 1–8. doi:10.1038/s41467-018-07641-9.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (80-.)*. 337, 816–822.
- Jog, R., Pandya, M., Nareshkumar, G., and Rajkumar, S. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiol. (United Kingdom)* 160, 778–788. doi:10.1099/mic.0.074146-0.
- Johnson, E. G., Joshi, M. V., Gibson, D. M., and Loria, R. (2007). Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-causing *Streptomyces* species. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71, 18–25. doi:10.1016/j.pmpp.2007.09.003.
- Joynt, R., and Seipke, R. F. (2018). A phylogenetic and evolutionary analysis of antimycin biosynthesis. *Microbiology* 164, 28–39. doi:10.1099/mic.0.000572.

- Kaur, T., Jasrotia, S., Ohri, P., and Manhas, R. K. (2016). Evaluation of in vitro and in vivo nematicidal potential of a multifunctional streptomycete, *Streptomyces hydrogenans* strain DH16 against *Meloidogyne incognita*. *Microbiol. Res.* 192, 247–252. doi:10.1016/j.micres.2016.07.009.
- Kaur, T., and Manhas, R. K. (2014). Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16. *J. Basic Microbiol.* 54, 1175–1185. doi:10.1002/jobm.201300086.
- Kelleher, A. C., Good, B., De Waal, T., and Keane, O. M. (2020). Anthelmintic resistance among gastrointestinal nematodes of cattle on dairy calf to beef farms in Ireland. *Ir. Vet. J.* 73, 1–8. doi:10.1186/s13620-020-00167-x.
- Kenshole, E., Herisse, M., Michael, M., and Pidot, S. J. (2021). Natural product discovery through microbial genome mining. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 60, 47–54. doi:10.1016/j.cbpa.2020.07.010.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Kim, H. K., Choi, Y. H., and Verpoorte, R. (2011). NMR-based plant metabolomics: Where do we stand, where do we go? *Trends Biotechnol.* 29, 267–275. doi:10.1016/j.tibtech.2011.02.001.
- King, R. R., Lawrence, C. H., Clark, M. C., and Calhoun, L. A. (1989). Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 13, 849–850. doi:10.1039/C39890000849.
- Kluepfel, D., Sehgal, S. N., and Vézina, C. (1969). Antimycin A components. Isolation and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 23, 75–80.
- Kobinata, K., Uramoto, M., Nishii, M., Kusakabe, H., Nakamura, G., and Isono, K. (1980). Neopolyoxins A, B, and C, New chitin synthetase inhibitors. *Agric Biol. Chem.* 44, 1709–1711.
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., and Phillippy, A. M. (2017). Canu : scalable and accurate long-read assembly via adaptive k -mer weighting and repeat separation. *Genome Res.* 27, 722–736. doi:10.1101/gr.215087.116.Freely.

- Kormanec, J., Rezuchova, B., Homerova, D., Csolleiova, D., Sevcikova, B., Novakova, R., et al. (2019). Recent achievements in the generation of stable genome alterations/mutations in species of the genus *Streptomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 5463–5482.
- Kouprina, N., and Larionov, V. (2008). Selective isolation of genomic loci from complex genomes by transformation-associated recombination cloning in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Protoc.* 3, 371–377. doi:10.1038/nprot.2008.5.
- Kouprina, N., and Larionov, V. (2016). Transformation-associated recombination (TAR) cloning for genomics studies and synthetic biology. *Chromosoma* 125, 621–632. doi:10.1002/cncr.27633.Percutaneous.
- Lambert, D. H., and Loria, R. (1989a). *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 39, 393–396. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Lambert, D. H., and Loria, R. (1989b). *Streptomyces scabies* sp. nov., norn. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 387–392.
- Lapaz, M. I., Huguet-Tapia, J. C., Siri, M. I., Verdier, E., Loria, R., and Pianzola, M. J. (2017). Genotypic and Phenotypic Characterization of *Streptomyces* Species Causing Potato Common Scab in Uruguay. 101, 1362–1372. doi:10.1094/PDIS-09-16-1348-RE.
- Lapaz, M. I., López, A., Huguet-Tapia, J. C., Fabián, M., Iglesias, C., Loria, R., et al. (2018). Isolation and structural characterization of a non-diketopiperazine phytotoxin from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. *Nat. Prod. Res.*, 1–7. doi:10.1080/14786419.2018.1511554.
- Law, J. W., Tan, K., Wong, S. H., Mutalib, N. A., and Lee, L. (2018). Taxonomic and Characterization Methods of *Streptomyces* : A Review. *Prog- Microbes Mol Biol* 1, 1–13.
- Lawrence, C. H., Clark, M. C., and King, R. R. (1990). Induction of Common Scab Symptoms in Aseptically Cultured Potato Tubers by the Vivotoxin, Thaxtomin. *Phytopathology* 80, 606–608. doi:10.1094/phyto-80-606.
- Leão, T. F., Wang, M., da Silva, R., Gurevich, A., Bauermeister, A., Gomes, P. W. P., et al. (2022). NPOmix: A machine learning classifier to connect mass spectrometry

- fragmentation data to biosynthetic gene clusters. *PNAS Nexus* 1, 1–15. doi:10.1093/pnasnexus/pgac257.
- Leão, T., Wang, M., Moss, N., da Silva, R., Sanders, J., Nurk, S., et al. (2021a). A Multi-Omics Characterization of the Natural Product Potential of Tropical Filamentous Marine Cyanobacteria. *Mar. Drugs* 19. doi:10.3390/md19010020.
- Leão, T., Wang, M., Moss, N., da Silva, R., Sanders, J., Nurk, S., et al. (2021b). A Multi-Omics Characterization of the Natural Product Potential of Tropical Filamentous Marine Cyanobacteria. *Mar. Drugs* 19. doi:10.3390/MD19010020.
- Lee, J., Wood, T. K., and Lee, J. (2015). Roles of Indole as an Interspecies and Interkingdom Signaling Molecule. *Trends Microbiol.* xx, 1–12. doi:10.1016/j.tim.2015.08.001.
- Lee, N., Hwang, S., Kim, J., Cho, S., Palsson, B., and Cho, B. (2020). Mini review : Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18, 1548–1556. doi:10.1016/j.csbj.2020.06.024.
- Leet, J. E., Schroeder, D. R., Golik, J., Matson, J. A., Doyle, T. W., Lam, K. S., et al. (1996). Himastatin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus* III. Structural elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 49, 299–311. doi:10.7164/antibiotics.49.299.
- Li, M., Chen, Z., Zhang, X., Song, Y., Wen, Y., and Li, J. (2010). Enhancement of avermectin and ivermectin production by overexpression of the maltose ATP-binding cassette transporter in *Streptomyces avermitilis*. *Bioresour. Technol.* 101, 9228–9235. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.132.
- Li, Y., Zhang, J., Zhang, J., Xu, W., and Mou, Z. (2019). Characteristics of Inorganic Phosphate-Solubilizing Bacteria from the Sediments of a Eutrophic Lake.
- Li, Y., Liu, J., Díaz-Cruz, G., Cheng, Z., and Bignell, D. R. D. (2019). Virulence mechanisms of plant pathogenic *Streptomyces* species: an updated review. *Microbiology*. doi:10.1099/mic.0.000818.
- Liu, D., Liang, B., and Li, X. (2015). Two New Pyrrolonesquiterpenes Produced by a *Streptomyces* Species Introduction . – Natural products are excellent sources for lead compounds for the development of new drugs for the treatment of diseases [1]. This

- is particularly evident in the treatment. *Chem. Biodivers.* – 12, 153–156.
- Liu, J., Zhu, X., Kim, S. J., and Zhang, W. (2016). Antimycin-type depsipeptides: Discovery, biosynthesis, chemical synthesis, and bioactivities. *Nat. Prod. Rep.* 33, 1146–1165. doi:10.1039/c6np00004e.
- Loria, R., Kers, J., and Joshi, M. (2006). Evolution of Plant Pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 469–487. doi:10.1146/annurev.phyto.44.032905.091147.
- Macherla, V. R., Liu, J., Bellows, C., Teisan, S., Nicholson, B., Lam, K. S., et al. (2005). Glaciapyrroles A, B, and C, pyrrolonesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. *J. Nat. Prod.* 68, 780–783. doi:10.1021/np049597c.
- Mackellar, D., Lieber, L., Norman, J. S., Bolger, A., Tobin, C., Murray, J. W., et al. (2016). *Streptomyces thermoautotrophicus* does not fix nitrogen. *Sci. Rep.* 6, 1–12. doi:10.1038/srep20086.
- MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H., & MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 111(1), 61-68.
- Madhaiyan, M., Saravanan, V. S., and See-Too, W.-S. (2020). Genome-based analyses reveal the presence of 12 heterotypic synonyms in the genus *Streptomyces* and emended descriptions of *Streptomyces bottropensis*, *Streptomyces celluloflavus*, *Streptomyces fulvissimus*, *Streptomyces glaucescens*, *Streptomyces murinus*, and . *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 3924–3929. doi:10.1099/ijsem.0.004217.
- Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., Simão, F. A., and Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO Update: Novel and Streamlined Workflows along with Broader and Deeper Phylogenetic Coverage for Scoring of Eukaryotic, Prokaryotic, and Viral Genomes. *Mol. Biol. Evol.* 38, 4647–4654. doi:10.1093/molbev/msab199.
- Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A., and Barash, I. (1994). Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology* 140, 1045–1050. doi:10.1099/13500872-140-5-1045.
- Medema, M. H., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J. B., Blin, K., et al. (2015). Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nat. Chem. Biol.* 11, 625–

631. doi:10.1038/nchembio.1890.

- Medema, M. H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., Berg, M. van den, Ulrike Muller, Heijne, W., et al. (2010). The Sequence of a 1.8-Mb Bacterial Linear Plasmid Reveals a Rich Evolutionary Reservoir of Secondary Metabolic Pathways. *Genome Biol. Evol.* 2, 212–224. doi:10.1093/gbe/evq013.
- Mehta, S., and Nautiyal, C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* 43, 51–56. doi:10.1007/s002840010259.
- Meier-Kolthoff, J. P., and Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat. Commun.* 10. doi:10.1038/s41467-019-10210-3.
- Meier-kolthoff, J. P., Hahnke, R. L., Petersen, J., Scheuner, C., Michael, V., Fiebig, A., et al. (2014). Complete genome sequence of DSM 30083, the type strain (U5/41) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. *Stand. Genomic Sci.* 9, 1–19.
- Mikheenko, A., Prijbelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., and Gurevich, A. (2018). Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics* 34, i142–i150. doi:10.1093/bioinformatics/bty266.
- Milagres, A. M. F., Machuca, A., and Napoleão, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Methods* 37, 1–6. doi:10.1016/S0167-7012(99)00028-7.
- Miyajima, K., Tanaka, F., Tekeuchi, T., and Kuninaga, S. (1998). *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 495–502.
- Miyoshi, H., Tokutake, N., Imaeda, Y., Akagi, T., and Iwamura, H. (1995). A model of antimycin A binding based on structure-activity studies of synthetic antimycin A analogues. *BBA - Bioenerg.* 1229, 149–154. doi:10.1016/0005-2728(94)00185-8.
- Mohimani, H., Kersten, R. D., Liu, W. T., Wang, M., Purvine, S. O., Wu, S., et al. (2014). Automated genome mining of ribosomal peptide natural products. *ACS Chem. Biol.* 9, 1545–1551. doi:10.1021/cb500199h.

- Mphahlele, M., Molefe, N., Tsoetsi-Khambule, A., and Oriel, T. (2020). Anthelmintic Resistance in Livestock. *Helminthiasis*, 1–15. doi:10.5772/intechopen.87124.
- Natsume, M., Komiya, M., Koyanagi, F., Tashiro, N., Kawaide, H., and Abe, H. (2005). Phytotoxin produced by *Streptomyces* sp. causing potato russet scab in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 71, 364–369. doi:10.1007/s10327-005-0211-6.
- Natsume, M., Nagagata, A., Aittamaa, M., Okaniwa, N., Somervuo, P., Fiedler, H. P., et al. (2018). Phytotoxin produced by the netted scab pathogen, *Streptomyces turgidiscabies* strain 65, isolated in Sweden. *J. Gen. Plant Pathol.* 84, 108–117. doi:10.1007/s10327-018-0765-8.
- Natsume, M., Ryu, R., and Abe, H. (1996). Production of Phytotoxins, Concanamycins A and B by *Streptomyces* spp. Causing Potato Scab. *Japanese J. Phytopathol.* 62, 411–413. doi:10.3186/jjphytopath.62.411.
- Natsume, M., Taki, M., Tashiro, N., and Abe, H. (2001). Phytotoxin Production and Aerial Mycelium Formation by *Streptomyces scabies* and *S. acidiscabies* in vitro. *J. Gen. Plant Pathol.* 302, 299–302.
- Natsume, M., Yamada, A., Tashiro, N., and Abe, H. (1998). Differential Production of the Phytotoxins Thaxtomin A and Concanamycins A and B by Potato Common Scab-causing *Streptomyces* spp. *Japanese J. Phytopathol.* 64, 202–204. doi:10.3186/jjphytopath.64.202.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for *screening* phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 265–270. doi:10.1016/S0378-1097(98)00555-2.
- Navarro-Muñoz, J. C., Selem-Mojica, N., MULLOWNEY, M. W., KAUTSAR, S. A., TRYON, J. H., PARKINSON, E. I., et al. (2020). A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nat. Chem. Biol.* 16, 60–68. doi:10.1038/s41589-019-0400-9.
- Nguyen, H. T., Lee, D. K., Lee, W. J., Lee, G. J., Yoon, S. J., Shin, B. kyu, et al. (2016). UPLC-QTOFMS based metabolomics followed by stepwise partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) explore the possible relation between the variations in secondary metabolites and the phylogenetic divergences of the genus *Panax*. *J. Chromatogr. B*

1012–1013, 61–68. doi:10.1016/j.jchromb.2016.01.002.

Ni, Y., Su, M., Lin, J., Wang, X., Qiu, Y., Zhao, A., et al. (2008). Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress. *FEBS Lett.* 582, 2627–2636. doi:10.1016/j.febslet.2008.06.040.

Nicholson, J. K., and Lindon, J. C. (2008). Metabonomics. *Nature* 455, 1054–1056.

Nouioui, I., Carro, L., García-lópez, M., and Meier-kolthoff, J. P. (2018). Genome-Based Taxonomic Classification of the Phylum Actinobacteria. *Front. Microbiol.* 9, 1–119. doi:10.3389/fmicb.2018.02007.

Nunnery, J. K., Engene, N., Byrum, T., Cao, Z., Jabba, S. V., Pereira, A. R., et al. (2012). Biosynthetically intriguing chlorinated lipophilic metabolites from geographically distant tropical marine cyanobacteria. *J. Org. Chem.* 77, 4198–4208. doi:10.1021/jo300160e.

Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., et al. (2008). Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350 †. *J. Bacteriol.* 190, 4050–4060. doi:10.1128/JB.00204-08.

Ortega, M. A., and Van Der Donk, W. A. (2016). New Insights into the Biosynthetic Logic of Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptide Natural Products. *Cell Chem. Biol.* 23, 31–44. doi:10.1016/j.chembiol.2015.11.012.

Pandey, R., Swamy, K. V., and Khetmalas, M. B. (2013). Indole: A novel signaling molecule and its applications. *Indian J. Biotechnol.* 12, 297–310.

Park, D. H., Yu, Y. M., Kim, J. S., Cho, J. M., Hur, J. H., and Lim, C. K. (2003b). Characterization of Streptomyces Causing Potato Common Scab in Korea. *Plant Dis.* 87, 1290–1296. doi:10.1094/PDIS.2003.87.11.1290.

Pascal Andreu, V., Augustijn, H. E., van den Berg, K., van der Hooft, J. J. J., Fischbach, M. A., and Medema, M. H. (2021). BiG-MAP: an Automated Pipeline To Profile Metabolic Gene Cluster Abundance and Expression in Microbiomes. *mSystems* 6, 1–14. doi:10.1128/msystems.00937-21.

Petersen, F., Zahner, H., Metzger, J. W., Freund, S., and Hummel, R. P. (1993). Germicidin,

- an autoregulative germination inhibitor of streptomyces viridochromogenes NRRLB-1551. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 46, 1126–1138. doi:10.7164/antibiotics.46.1126.
- Pettit, G. R., Tan, R., Pettit, R. K., Smith, T. H., Feng, S., Doubek, D. L., et al. (2007). Antineoplastic Agents 560. Isolation and Structure of Kitastatin 1 from an Alaskan *Kitasatospora* sp.1. *J Nat Prod* 23, 1–7. doi:10.1021/np068072c.Antineoplastic.
- Pishchany, G., and Kolter, R. (2020). On the possible ecological roles of antimicrobials. *Mol. Microbiol.* 113, 580–587. doi:10.1111/mmi.14471.
- Prabhu, J., Schauwecker, F., Grammel, N., Keller, U., and Bernhard, M. (2004). Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (thpD) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3130–3132. doi:10.1128/AEM.70.5.3130-3132.2004.
- Rashad, F. M., Fathy, H. M., El-Zayat, A. S., and Elghonaimy, A. M. (2015). Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiol. Res.* 175, 34–47. doi:10.1016/j.micres.2015.03.002.
- Rey, T., and Dumas, B. (2017). Plenty Is No Plague: *Streptomyces* Symbiosis with Crops. *Trends Plant Sci.* 22, 30–37. doi:10.1016/j.tplants.2016.10.008.
- Ribbe, M., Gadkari, D., and Meyer, O. (1997). N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum- dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum- CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272, 26627–26633. doi:10.1074/jbc.272.42.26627.
- Rieske J. S. Antibiotics, ed. D. Gottlieb and P. D. Shaw, Springer, Berlin, Heidelberg, 1967, ch. 42, pp. 542–584.
- Risi, G. (2018). Búsqueda de drogas y blancos de drogas nematocidas usando *C. Elegans*. Available at: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21469/1/uy24-19263.pdf>.
- Risi, G., Aguilera, E., Ladós, E., Suárez, G., Carrera, I., Álvarez, G., et al. (2019). *Caenorhabditis*

- C. elegans* Infrared-Based Motility Assay Identified New Hits for Nematicide Drug Development. *Vet. Sci.* 6, 29. doi:10.3390/vetsci6010029.
- Rodriguez-R, L. M., Gunturu, S., Harvey, W. T., Rosselló-Mora, R., Tiedje, J. M., Cole, J. R., et al. (2018). The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: Taxonomic and gene diversity analysis of Archaea and Bacteria at the whole genome level. *Nucleic Acids Res.* 46, W282–W288. doi:10.1093/nar/gky467.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Salvà-Serra, F., Jaén-Luchoro, D., Jakobsson, H. E., Gonzales-Siles, L., Karlsson, R., Busquets, A., et al. (2020). Complete genome sequences of *Streptococcus pyogenes* type strain reveal 100%-match between PacBio-solo and Illumina-Oxford Nanopore hybrid assemblies. *Sci. Rep.* 10, 1–14. doi:10.1038/s41598-020-68249-y.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volume 3. CSHL Press Available at: <https://books.google.com/books?id=Bosc5JVxNpkC&pgis=1> [Accessed May 23, 2016].
- Sampietro, D. A., Belizán, M. M. E., Vattuone, M. A., and Catalán, C. A. N. (2013). “Alkylresorcinols: Chemical properties, methods of analysis and potential uses in food, industry and plant protection,” in *Natural Antioxidants and Biocides from Wild Medicinal Plants*, 148–166. doi:10.1079/9781780642338.0148.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R., and Gopalakrishnan, S. (2017). Plant growth-promoting actinobacteria : a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *Biotech* 7, 1–10. doi:10.1007/s13205-017-0736-3.
- Savorani, F., Tomasi, G., and Engelsen, S. B. (2010). icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *J. Magn. Reson.* 202, 190–202. doi:10.1016/j.jmr.2009.11.012.
- Schwyn, B., and Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47–56. doi:10.1016/0003-2697(87)90612-9.

- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153.
- Sehgal, S. N., Baker, H., and Vézina, C. (1975). Rapamycin (Ay-22,989), a New Antifungal Antibiotic. II. Fermentation, Isolation and Characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 28, 727–732. doi:10.7164/antibiotics.28.727.
- Seipke, R. F. (2015). Strain-level diversity of secondary metabolism in *Streptomyces albus*. *PLoS One* 10, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0116457.
- Seipke, R. F., Barke, J., Brearley, C., Hill, L., Yu, D. W., Goss, R. J. M., et al. (2011a). A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *acromyrmex octospinosus*. *PLoS One* 6, 4–11. doi:10.1371/journal.pone.0022028.
- Seipke, R. F., Crossman, L., Drou, N., Heavens, D., Bibb, M. J., Caccamo, M., et al. (2011b). Draft genome sequence of *Streptomyces* strain S4, a symbiont of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *J. Bacteriol.* 193, 4270–4271. doi:10.1128/JB.05275-11.
- Senges, C. H. R., Al-dilaimi, A., Marchbank, D. H., Wibberg, D., Winkler, A., and Haltli, B. (2018). The secreted metabolome of *Streptomyces chartreusis* and implications for bacterial chemistry. *PNAS* 115, 2490–2495. doi:10.1073/pnas.1715713115.
- Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I , II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 285–295. doi:10.1016/S1367-5931(03)00020-6.
- Shiomi, K., Hatae, K., Hatano, H., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Jiang, C. L., et al. (2005). A new antibiotic, antimycin a9, produced by *Streptomyces* sp. K01-0031. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 58, 74–78. doi:10.1038/ja.2005.10.
- Shirling, E. B., and Gottlieb, D. (1966). METHODS FOR CHARACTERIZATION OF STREPTOMYCES SPECIES. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16, 313–340. doi:10.1017/S0165070X00023998.
- Silva, L. J., Crevelin, E. J., Souza, D. T., Lacerda-Júnior, G. V., de Oliveira, V. M., Ruiz, A. L. T. G., et al. (2020). Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery. *Sci. Rep.* 10, 1–15. doi:10.1038/s41598-020-69786-2.
- Simonetta, S. H., and Golombek, D. A. (2007). An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J.*

- Neurosci. Methods* 161, 273–280. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.11.015.
- Simundic, A. M. (2012). Diagnostic Accuracy V Part 1 Basic concepts: Sensitivity and Specificity, ROC Analysis, STARD Statement. *Point Care* 11, 6–8.
- Skinnider, M. A., Johnston, C. W., Gunabalasingam, M., Merwin, N. J., Kieliszek, A. M., Maclellan, R. J., et al. (2020). Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nat. Commun.* 11, 1–9. doi:10.1038/s41467-020-19986-1.
- Soldatou, S., Eldjarn, G. H., Huerta-Urbe, A., Rogers, S., and Duncan, K. R. (2019). Linking biosynthetic and chemical space to accelerate microbial secondary metabolite discovery. *FEMS Microbiol. Lett.* 366, 1–8. doi:10.1093/femsle/fnz142.
- Soldatou, S., Eldjárn, G. H., Ramsay, A., van der Hooft, J. J. J., Hughes, A. H., Rogers, S., et al. (2021). Comparative Metabologenomics Analysis of Polar Actinomycetes. *Mar. Drugs* 19, 1–21. doi:10.3390/md19020103.
- Sousa, J. A. de J., and Olivares, F. L. (2016). Plant growth promotion by streptomycetes: Ecophysiology, mechanisms and applications. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 3, 1–12. doi:10.1186/s40538-016-0073-5.
- Spicer, R., Salek, R. M., Moreno, P., Cañueto, D., and Steinbeck, C. (2017). Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. *Metabolomics* 13, 0. doi:10.1007/s11306-017-1242-7.
- Stasiuk, M., and Kozubek, A. (2010). Biological activity of phenolic lipids. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 841–860. doi:10.1007/s00018-009-0193-1.
- Steppek, G., Buttle, D. J., Duce, I. R., and Behnke, J. M. (2006). Human gastrointestinal nematode infections: Are new control methods required? *Int. J. Exp. Pathol.* 87, 325–341. doi:10.1111/j.1365-2613.2006.00495.x.
- Strangman, W. K., Kwon, H. C., Broide, D., Paul R. Jensen, A., and Fenical, W. (2009). Potent Inhibitors of Pro-Inflammatory Cytokine Production Produced by a Marine-Derived Bacterium. *J Med Chem* 23, 1–7. doi:10.1021/jm801110j.
- Swanson M. S., Joyce E. A. y Horak R.E.A. *Microbe*. 3rd edition ASM Press, June 15, 2022, Cap 14, p 349.

- Takano, H., Nishiyama, T., Amano, S. ichi, Beppu, T., Kobayashi, M., and Ueda, K. (2016). *Streptomyces* metabolites in divergent microbial interactions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 143–148. doi:10.1007/s10295-015-1680-z.
- Tamreihao, K., Ningthoujam, D. S., Nimaichand, S., Singh, E. S., Reena, P., Singh, S. H., et al. (2016). Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. *Microbiol. Res.* 192, 260–270. doi:10.1016/j.micres.2016.08.005.
- Tangerina, M. M. P., Furtado, L. C., Leite, V. M. B., Bauermeister, A., Velasco-Alzate, K., Jimenez, P. C., et al. (2021). Metabolomic study of marine *Streptomyces* sp.: Secondary metabolites and the production of potential anticancer compounds. *PLoS One* 15, 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0244385.
- Tanizawa, Y., Fujisawa, T., and Nakamura, Y. (2018). DFAST: A flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* 34, 1037–1039. doi:10.1093/bioinformatics/btx713.
- Tao, W., Yang, A., Deng, Z., and Sun, Y. (2018). CRISPR/Cas9-Based Editing of *Streptomyces* for Discovery, Characterization, and Production of Natural Products. *Front. Microbiol.* 9, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2018.01660.
- Tenconi, E., Traxler, M. F., Hoebreck, C., van Wezel, G. P., and Rigali, S. (2018). Production of prodiginines is part of a programmed cell death process in *Streptomyces coelicolor*. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2018.01742.
- Terlouw, B. R., Blin, K., Navarro-Muñoz, J. C., Avalon, N. E., Chevrette, M. G., Egbert, S., et al. (2022). MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.*, epub ahead of print. doi:10.1093/nar/gkac1049.
- Tietz, J. I., Schwalen, C. J., Patel, P. S., Maxson, T., Blair, P. M., Tai, H.-C., et al. (2017). A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape. *Nat Chem Biol.* 13, 470–478. doi:10.1038/nchembio.2319.
- Tobias, N. J., and Bode, H. B. (2019). Heterogeneity in Bacterial Specialized Metabolism. *J. Mol. Biol.* 431, 4589–4598. doi:10.1016/j.jmb.2019.04.042.

- Traxler, M. F., and Kolter, R. (2015). Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Nat. Prod. Rep.* 00, 1–15. doi:10.1039/C5NP00013K.
- Trygg, J., Holmes, E., and Lundstedt, T. (2007). Chemometrics in Metabonomics. *J. Proteome Res.* 6, 469–479.
- Trygg, J., and Wold, S. (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemom.* 16, 119–128. doi:10.1002/cem.695.
- Tyc, O., Song, C., and Dickschat, J. S. (2017). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends Microbiol.* 25, 280–292. doi:10.1016/j.tim.2016.12.002.
- Undabarrena, A., Valencia, R., Cumsille, A., Leiva, L. Z.-, Nallar, E. C.-, Gomez, F. B.-, et al. (2021). Rhodococcus comparative genomics reveals a phylogenomic- - dependent non- - ribosomal peptide synthetase distribution : insights into biosynthetic gene cluster connection to an orphan metabolite. *Microb. Genomics* 7. doi:10.1099/mgen.0.000621.
- van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., and van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 546–558. doi:10.1038/s41579-020-0379-y.
- Van Den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., and Van Der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7, 1–15. doi:10.1186/1471-2164-7-142.
- Van Der Heul, H. U., Bilyk, B. L., McDowall, K. J., Seipke, R. F., and Van Wezel, G. P. (2018). Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: New perspectives from the post-genomic era. *Nat. Prod. Rep.* 35, 575–604. doi:10.1039/c8np00012c.
- van der Hooft, J. J. J., Mohimani, H., Bauermeister, A., Dorrestein, P. C., Duncan, K. R., and Medema, M. H. (2020). Linking genomics and metabolomics to chart specialized metabolic diversity. *Chem. Soc. Rev.* 49, 3297–3314. doi:10.1039/d0cs00162g.
- van Santen, J. A., Jacob, G., Singh, A. L., Aniebok, V., Balunas, M. J., Bunsko, D., et al. (2019). The Natural Products Atlas: An Open Access Knowledge Base for Microbial Natural

- Products Discovery. *ACS Cent. Sci.* 5, 1824–1833. doi:10.1021/acscentsci.9b00806.
- van Santen, J. A., Poynton, E. F., Iskakova, D., McMann, E., Alsup, T. A., Clark, T. N., et al. (2022). The Natural Products Atlas 2.0: a database of microbially-derived natural products. *Nucleic Acids Res.* 50, D1317–D1323. doi:10.1093/nar/gkab941.
- Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., and Goormachtig, S. (2016). *Streptomyces* as a plant's best friend? *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, 1–10. doi:10.1093/femsec/fiw119.
- Vicente, C. M., Thibessard, A., Lorenzi, J. N., Benhadj, M., Hôtel, L., Gacemi-Kirane, D., et al. (2018). Comparative genomics among closely related *streptomyces* strains revealed specialized metabolite biosynthetic gene cluster diversity. *Antibiotics* 7. doi:10.3390/antibiotics7040086.
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., and Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of *streptomyces* spp. As endophytes. *Int. J. Mol. Sci.* 19. doi:10.3390/ijms19040952.
- Waksman S. A. y Curtis R. E. 1916. *Soil Science*, 1, 93–135.
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., et al. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with GNPS. *Nat Biotechnol.* 34, 828–837. doi:10.1038/nbt.3597.Sharing.
- Ward, J. H. (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58, 236–244. doi:10.1198/016214503000000486.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., and Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* 13, 1–22. doi:10.1371/journal.pcbi.1005595.
- Wold, S., Esbensen, K. I. M., and Geladi, P. (1987). Principal Component Analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2, 37–52.
- Wright, F., and Bibb, M. J. (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113, 55–65.
- Wu, C., Choi, Y. H., and van Wezel, G. P. (2016). Metabolic profiling as a tool for prioritizing antimicrobial compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 299–312.

doi:10.1007/s10295-015-1666-x.

- Wu, C., Du, C., Ichinose, K., Choi, Y. H., and Van Wezel, G. P. (2017). Discovery of C-Glycosylpyranonaphthoquinones in *Streptomyces* sp. MBT76 by a Combined NMR-Based Metabolomics and Bioinformatics Workflow. *J. Nat. Prod.* 80, 269–277. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00478.
- Yamamuro, D., Uchida, R., Takahashi, Y., Masuma, R., and Tomoda, H. (2011). Screening for microbial metabolites affecting phenotype of *Caenorhabditis elegans*. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1619–1623. doi:10.1248/bpb.34.1619.
- Yan, X., Probst, K., Linnenbrink, A., Arnold, M., Paululat, T., Zeeck, A., et al. (2012). Cloning and Heterologous Expression of Three Type II PKS Gene Clusters from *Streptomyces bottropensis*. *ChemBioChem* 13, 224–230. doi:10.1002/cbic.201100574.
- Yan, Y., Zhang, L., Ito, T., Qu, X., Asakawa, Y., Awakawa, T., et al. (2012). Biosynthetic pathway for high structural diversity of a common dilactone core in antimycin production. *Org. Lett.* 14, 4142–4145. doi:10.1021/ol301785x.
- Yang, J. Y., Sanchez, L. M., Rath, C. M., Liu, X., Boudreau, P. D., Bruns, N., et al. (2013). Molecular networking as a dereplication strategy. *J. Nat. Prod.* 76, 1686–1699. doi:10.1021/np400413s.
- Zabolotneva, A. A., Shatova, O. P., Sadova, A. A., Shestopalov, A. V., and Roumiantsev, S. A. (2022). An Overview of Alkylresorcinols Biological Properties and Effects. *J. Nutr. Metab.* 2022. doi:10.1155/2022/4667607.
- Zhang, W., Huang, T., Li, H., Dai, X., Quan, C., and He, Y. (2017). Determination of avermectins by the internal standard recovery correction - high performance liquid chromatography - quantitative Nuclear Magnetic Resonance method. *Talanta* 172, 78–85. doi:10.1016/j.talanta.2017.04.080.
- Zhang, X., Li, C., Hao, J., Li, Y., Li, D., Zhang, D., et al. (2020). A Novel *Streptomyces* sp. Strain PBSH9 for Controlling Potato Common Scab Caused by *Streptomyces galilaeus*. *Plant Dis.* 104, 1986–1993. doi:10.1094/PDIS-07-19-1469-RE.
- Zhang, Y., Bignell, D. R. D., Zuo, R., Fan, Q., Huguet-Tapia, J. C., Ding, Y., et al. (2016). Promiscuous Pathogenicity Islands and Phylogeny of Pathogenic *Streptomyces* spp.

Mol. plant-microbe Interact. 29, 640–650. doi:10.1094/MPMI-04-16-0068-R.

Zhang, Y., Jiang, G., Ding, Y., and Loria, R. (2018). Genetic background affects pathogenicity island function and pathogen emergence in *Streptomyces*. Mol. Plant Pathol. 19, 1733–1741. doi:10.1111/mpp.12656.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7, 203–214. doi:10.1089/10665270050081478.