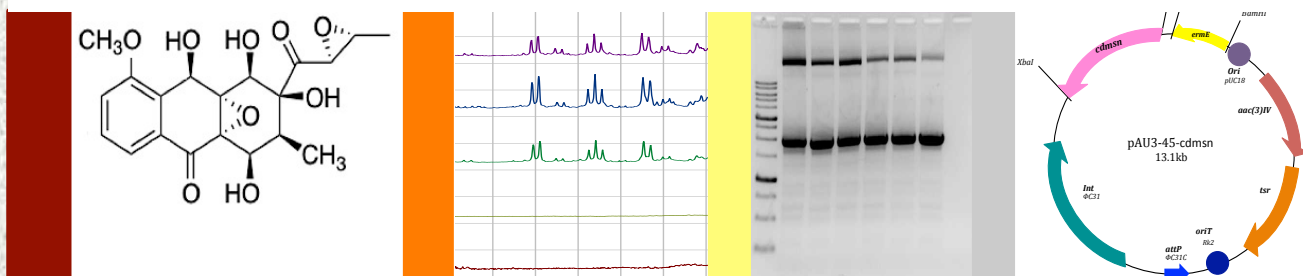


Estudio genómico comparativo de cepas de *Streptomyces* patógenas de papa en Uruguay



Tesis de Doctorado
María Inés Lapaz Eugui

**Estudio genómico comparativo de cepas de
Streptomyces patógenas de papa en Uruguay**

María Inés Lapaz Eugui

**Trabajo presentado para obtener el título de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Directores de Tesis:

María Julia Pianzzola

José Huguet-Tapia

Tribunal:

Gabriela Garmendia

Federico Battistoni

Marc Valls

Montevideo

Setiembre de 2019

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

PEDECIBA BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero resaltar que los caminos no se recorren solos y es por eso que durante el transcurso de mi tesis de Doctorado quiero agradecer principalmente a mi tutora María Julia. Siempre me ha acompañado y motivado, y quiero destacar su disposición y sobretodo su buen humor que hacen que de cosas que no funcionan uno termine riendo por no llorar y buscando alternativas. Ella me convenció de trabajar con los *Streptomyces* hace ya unos nueve años desde mi tesis de grado y hoy puedo decir que es una bacteria fascinante.

No hay nada mejor que trabajar en un buen ambiente de trabajo, quiero agradecer a las otras jefas María Inés, Sonia y Gianna por estar dispuestas siempre para cualquier consulta, intercambiar ideas y por ser unas grandes personas. A todos los peones del laboratorio 12 que hacen que los días pasen volando entre trabajo, música y porque no las salidas extra Lab.

Quiero agradecer a los compañeros de la Cátedra de Microbiología que es como una gran familia, todos hacen la diferencia.

Agradezco a José e Iselde que hicieron posible gran parte de este trabajo durante mis pasantías en Estados Unidos, por brindarme sus conocimientos, estar siempre dispuestos a intercambiar y sobre todo por ser unas personas excepcionales con las que da ganas de hablar más allá del tema de trabajo.

Muchas gracias Guille y Andrés por su buena disposición y porque sin ustedes la parte química de este trabajo hubiera sido muy difícil.

Quiero agradecerle a mis amigos, los del Lab, las bioquímicas y las gurisas de Dolores que siempre me han apoyado, alentado y adaptado a la amiga que no para de estudiar.

Por último y no menos importante quiero agradecerle a mi familia mamá, papá, Emi, Vicky y Tino que me han acompañado durante todo el transcurso y ellos sí que lo viven de cerca. Por eso es que esta tesis se la dedico a mi familia, los adoro.

RESUMEN

La sarna común de la papa es una enfermedad de distribución mundial causada por bacterias del género *Streptomyces*. Esta enfermedad adquirió relevancia en los últimos años por la aparición de patógenos emergentes como *Streptomyces acidiscabies* y *turgidiscabies*. Esto se ha asociado a la capacidad del género para la transferencia horizontal de genes de patogenicidad presentes en islas genómicas. A partir de una colección de cepas de *Streptomyces* patógenas aisladas de papa y suelos en Uruguay se generó conocimiento sobre los diferentes genotipos de patogenicidad presentes en nuestro país, los factores de virulencia involucrados y la capacidad de las cepas para la transferencia horizontal. Se secuenciaron los genomas de cinco cepas representativas de la colección. Mediante un enfoque genómico comparativo se determinó la relación filogenética entre las cepas y se compararon los resultados con los obtenidos por el método de *Multi Locus Sequence Analysis* (MLSA). Se determinó la capacidad de resolución inter-específica de este método para la identificación de aislamientos de especies del género *Streptomyces* y se concluyó que el sistema de MLSA es una buena herramienta para la identificación de especies de este complejo género. Se realizó la caracterización fenotípica y genotípica de la patogenicidad para las cepas de la colección, detección de las islas de patogenicidad presentes así como los genes asociados a su movilidad y se buscaron potenciales factores de virulencia. Se identificó y elucidó químicamente un nuevo metabolito secundario, asociado a la patogenicidad en cepas atípicas que carecían de los factores de virulencia conocidos. Se identificó mediante análisis genómico el *cluster* de biosíntesis de dicho metabolito, se generaron mutantes y se identificó a la desmetilmensacarcina como un nuevo metabolito asociado a la patogenicidad. Los resultados de este trabajo de tesis permiten avanzar en la comprensión de los mecanismos de patogenicidad y transferencia horizontal de genes de *Streptomyces* patógenos de papa, conocer las especies actualmente presentes en nuestro país así como determinar el mejor método para su identificación.

INDICE

Generalidades de <i>Streptomyces</i> spp. como agente causal de la sarna común en la papa.....	6
1.1 La “Sarna común” en la papa	7
1.2 Agente causal: bacterias del género <i>Streptomyces</i>	8
1.3 El particular genoma de <i>Streptomyces</i>	10
1.4 <i>Streptomyces</i> spp. : Taxonomía y Clasificación	12
1.5 Distribución geográfica y características de las especies de <i>Streptomyces</i> patógenas	15
1.6 Ciclo de la enfermedad	16
1.7 Mecanismos de Virulencia	18
1.8 Control de la enfermedad	34
1.9 Antecedentes de Trabajo.....	36
Justificación	37
Objetivos y descripción de la tesis.....	37
Bibliografía	39
Análisis genómico comparativo y filogenético de cepas de <i>Streptomyces</i> spp. causantes de sarna común en la papa en Uruguay.....	54
Introducción	55
Objetivos	56
Materiales y métodos	57
Resultados	62
Discusión	74
Bibliografía	77
Caracterización de la patogenicidad y del potencial para la transferencia horizontal en cepas de <i>Streptomyces</i> spp. causantes de sarna común de papa en Uruguay.....	81
Introducción	82
Objetivos	83
Materiales y Métodos	83
Resultados	88
Discusión	98
Bibliografía	101
Búsqueda de nuevos factores de patogenicidad asociados a cepas de <i>Streptomyces</i> causantes de sarna común en papa	103
Introducción	104
Objetivo	105
Materiales y Métodos	105
Resultados	110
Discusión	138
Bibliografía	143
Minería genómica dirigida a <i>clusters</i> de metabolitos secundarios asociados a la patogenicidad	146
Introducción	147
Objetivos	149
Materiales y Métodos	149
Resultados	166
Discusión	207
Bibliografía	211
Consideraciones finales y perspectivas	215

ANEXO I	219
ANEXO II.....	224
ANEXO III	244
ANEXO IV	245

Abreviaturas empleadas en el texto

ABACAS	<i>Algorithm Based Automatic Contiguation of Assembled Sequences</i>
ACT	<i>the Artemis Comparison Tool</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANI	<i>Average nucleotide identity</i>
Apra	Apramicina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BGCs	<i>Biosynthetic gene clusters</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDS	Secuencias codificantes
CFA	Ácido coronafácico
CFA-Ile	N-coronafacoil-L-isoleucina
CIP	Fosfatasa alcalina intestinal de becerro
CK	Citoquininas
Cml	Cloranfenicol
CR	Región de colonización
COR	Coronatina
CTAB	<i>Cetyl trimethylammonium bromide</i>
DDH	Hibridación ADN-ADN
DIEA	DIEA Dirección de Estadísticas Agropecuarias
dmsn	Desmetilmensacarcina
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DQL	Departamento de Química del Litoral
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
EE.UU	Estados Unidos
FAS	Sintasas de ácidos grasos
FD	Fragmento <i>downstream</i>
FU	Fragmento <i>upstream</i>
GC	Guanina Citosina
GGDC	<i>Genome to Genome Distance Calculator</i>
Glimmer	<i>Microbial Gene-Finding System</i>
IAA	Ácido indol-3-acético
isDDH	<i>in silico DNA-DNA Hybridization</i>
IPA	Isla de patogenicidad
IPAS _t	Isla de patogenicidad descrita en <i>S. turgidiscabies car8</i>
IPAS _{sc}	Región TR de la IPA en <i>S. scabiei</i> 87-22
ISP	<i>International Streptomyces Project</i>
ISP-2	<i>International Streptomyces Project Medium 2</i>
ISP-4	<i>International Streptomyces Project Medium 4</i>
JA	Ácido jasmónico
JA-Ile	N-coronafacoil-L-isoleucina
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobases

LB	medio Luria-Bertani
MGAP	Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
Mpb	Mega pares de bases
MLPs	Proteínas de la familia MbtH
msn	Mensacarcina
Na	Ácido Nalidíxico
NRPS	Sintetasas de péptidos no ribosomales
OBB	<i>Oat bran broth</i>
ORF	Marcos abiertos de lectura
<i>Ori</i>	Origen de replicación
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKS	Policétido sintasas
PMB	<i>Potato Mashed Broth</i>
RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
rep-PCR	<i>Repetitive element palindromic PCR</i>
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
SA	Sarna ácida
SC	Sarna común
SE	Sarna elevada
SFM	<i>Soy flour mannitol</i>
SN	Sarna netted
SR	Sarna Rojiza
SDS	Dodecil sulfato sódico
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima ADN polimerasa)
TE	Buffer Tris EDTA
Tet	Tetraciclina
Thio	Tiostreptona
TDM	<i>Thaxtomin Defined Medium</i>
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TR	Región toxicogénica
Tris	Trihidroximetil aminometano
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TSP	ácido 2,2,3,3-d ₄ -3-(trimetilsilil)propionico
TxtA	Taxtamina A
UV	Ultravioleta
WT	Cepa silvestre (<i>wild type</i>)
YME	<i>Yeast malt extract</i>

CAPÍTULO 1

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

1.1 La “Sarna común” en la papa

La sarna común (SC) es una enfermedad que afecta al cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) y otros cultivos de raíces y tubérculos incluyendo rábano, remolacha, zanahoria, nabo y boniato. Se considera la enfermedad de mayor importancia económica dentro de las causadas por especies del género *Streptomyces* (Loria *et al.*, 1997). La sarna de la papa es una enfermedad bacteriana compleja, con diversidad de síntomas y de agentes causales (Wanner, 2009). Se caracteriza por la formación de diferentes tipos de lesiones (superficiales, elevadas o profundas) con variados aspectos (lisas, rugosas, reticuladas o en forma de estrella) en la superficie del tubérculo (Figura 1.1). Debido a los síntomas externos, esta enfermedad reduce el valor de mercado del cultivo de papa y resulta en pérdidas económicas significativas para los productores. La enfermedad está distribuida mundialmente ya que la mayoría de las variedades de papa cultivada son susceptibles a la sarna y los controles fitosanitarios en papa semilla no son rigurosos, por lo que ésta puede ser un agente de diseminación de la enfermedad (Dees & Wanner, 2012; Loria *et al.*, 1997; Wanner, 2006). La sarna en la papa se puede clasificar en diferentes tipos. La sarna común (SC), sarna ácida (SA) y sarna elevada (SE) son diferentes nombres para la misma enfermedad designados en base a las características de las lesiones y el patógeno asociado a ellas. Los tres tipos de sarnas se caracterizan por producir los mismos síntomas, los cuales van desde unas pocas manchas marrones superficiales o elevadas sobre la piel del tubérculo, hasta pozos oscuros que se extienden varios milímetros. Las lesiones pueden ser pequeñas y discretas, o pueden unirse para cubrir varias zonas de la superficie del tubérculo (Wanner, 2006). Las lesiones pueden variar considerablemente de aspecto, pudiendo estar presentes distintos síntomas en un mismo tubérculo (Cancino, 2003; Loria *et al.*, 1997). La denominación de la enfermedad está asociada al tipo de patógeno y/o a las características ambientales para el desarrollo de la enfermedad. La sarna común está vinculada a *Streptomyces scabiei*, se desarrolla en suelos por encima de pH 5.2 mientras que la sarna ácida es causada por *S. acidiscabies*, ocurre en suelos ácidos con pH alrededor de 4.5 y, a la especie *S. turgidiscabies*, se la relaciona con la sarna elevada. La sarna *netted* (SN) se ha reportado principalmente en Europa y se caracteriza por lesiones superficiales marrones con aspecto de red, y por necrosis en las raíces de la planta de papa. Otro tipo de sarna es la sarna rojiza (SR) la cual es superficial como SN, pero no se observa el mismo síntoma en el tubérculo ni necrosis en las raíces de las plantas (Bignell *et al.*, 2014). La mayoría de los *Streptomyces* causantes de SC, SA, SE y algunas especies que causan SN, con excepción de las cepas que causan SR, están asociados a la producción por el patógeno de una toxina, llamada taxtamina (Bignell *et al.*, 2014; Loria *et al.*, 1997). Dado que el mecanismo de patogenicidad en cuatro de las sarnas es el mismo y que los

síntomas son muy similares, la enfermedad puede ser denominada simplemente como sarna común, que es la más extendida mundialmente.

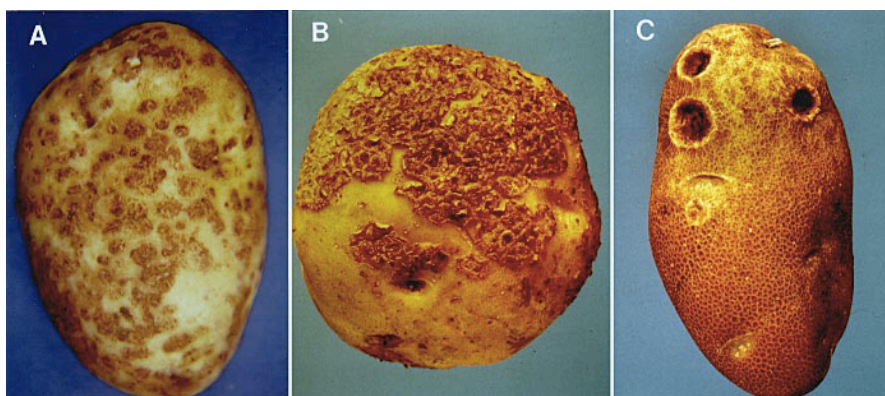


Figura 1.1. Tipos de síntomas de sarna común en tubérculos de papa causados por *S. scabiei*. A. sarna reticulada; B. sarna elevada; C. sarna profunda. Extraído de Loria y colaboradores (1997).

1.2 Agente causal: bacterias del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* está constituido por bacterias Gram-positivas, filamentosas, formadoras de esporas, aerobias y capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Se encuentran en el suelo, aunque también se han aislado de organismos marinos y aunque con poca frecuencia de plantas y animales (Seipke *et al.*, 2012). Los suelos agrícolas contienen aproximadamente 10^6 - 10^7 UFC por gramo de suelo (Janssen, 2006). Aunque estos números son grandes, constituyen una pequeña proporción de la población microbiana del suelo agrícola estimada en 10^9 UFC por gramo. Se han descrito al menos 800 especies de *Streptomyces*, pero solo se sabe que una pequeña fracción (aproximadamente una docena) de ellas son patógenos de las plantas (Hao *et al.*, 2009; Law *et al.*, 2018; St-Onge *et al.*, 2008; Wanner, 2009; Wanner & Kirk, 2015). El suelo es un ambiente hostil y competitivo para los microorganismos. Este entorno heterogéneo y pobre en nutrientes es el hogar de los recolectores, como artrópodos, y una amplia gama de organismos que secretan moléculas antimicrobianas. Los organismos deben soportar condiciones extremas de temperatura y humedad, particularmente en las capas superiores del suelo. Las especies de *Streptomyces* se encuentran entre los organismos que prosperan en este entorno. Su éxito se atribuye a su capacidad para producir una amplia gama de enzimas catabólicas que degradan polímeros biológicos complejos, incluidos los sustratos recalcitrantes celulosa y quitina (Loria *et al.*, 2006). Los *Streptomyces* también producen enzimas ampliamente utilizadas en la industria, que incluyen proteinasas, glucosil hidrolasas y reguladores del crecimiento de las plantas (Chater *et al.*, 2010). De hecho, su capacidad degradativa contribuye en gran medida al ciclo de nutrientes (Chamberlain & Crawford, 2000). *Streptomyces* también tiene la capacidad de producir grandes cantidades de compuestos antimicrobianos, atributo que hace que las

especies de *Streptomyces* sean particularmente valiosas como fuentes de antibióticos farmacéuticamente importantes (Watve *et al.*, 2001). Varias especies de *Streptomyces* han sido la fuente de más del 60% de compuestos bioactivos de importancia médica, pro-microbianos o antimicrobianos, incluidos los antibióticos (p. Ej., eritromicina, neomicina, estreptomina, tetraciclina, vancomicina, rifamicina, cloranfenicol), agentes antifúngicos (p. Ej., nistatina y anfotericina B), agentes inmunosupresores y compuestos anticancerígenos (p. ej., microstatina) (Wanner & Kirk, 2015). Sin embargo, la adaptación de *Streptomyces* al ambiente del suelo va más allá de su capacidad de hidrolizar polímeros derivados de plantas y animales y sintetizar moléculas biológicamente activas. Se encuentran entre los pocos procariotas que poseen un complejo programa de desarrollo. El ciclo de vida de *Streptomyces* comienza como esporas hidrófobas, uninucleadas y resistentes a la desecación. Su hidrofobicidad permite que sean transportados fácilmente por el agua en movimiento y por eucariotas móviles como los artrópodos y nematodos del suelo (Loria *et al.*, 2006). Las esporas germinan y crecen para formar hifas vegetativas, dando como resultado un micelio vegetativo muy ramificado (Chater, 1972). El crecimiento exponencial de las hifas vegetativas se logra mediante una combinación de crecimiento apical y ramificación. El hecho de que la división celular durante el crecimiento vegetativo no conduzca a la fisión celular sino a las paredes transversales que separan las hifas en compartimentos conectados hace que los *Streptomyces* sean un raro ejemplo de una bacteria multicelular, y a su vez cada compartimento contiene múltiples copias del cromosoma (Claessen *et al.*, 2014; Elliot *et al.*, 2008; Wildermuth & Hopwood, 1970). Esta red de filamentos segrega enzimas catabólicas, permitiendo liberar nutrientes a partir de sustratos orgánicos en el suelo y estimula el crecimiento de colonias. El micelio vegetativo no crece indefinidamente; las señales ambientales, incluida la privación de nutrientes, activan un programa de desarrollo que detiene el crecimiento del micelio pero activa el desarrollo de estructuras esporogénicas llamadas hifas aéreas (Loria *et al.*, 2006). *Streptomyces* y otros microorganismos filamentosos son sésiles; cuando se produce el agotamiento de nutrientes, el micelio vegetativo se degrada autolíticamente por un mecanismo similar a la muerte celular programada. De esta forma adquiere los nutrientes necesarios para formar la segunda masa de micelio (aéreo) (Méndez *et al.*, 1985; Miguélez *et al.*, 1999). Como resultado hay acumulación de aminoácidos, aminoazúcares, nucleótidos y lípidos alrededor del micelio lisado, lo que atrae microorganismos competitivos móviles en el hábitat (Fernández & Sánchez, 2002; Kim *et al.*, 1995; Rigali *et al.*, 2006). La producción y secreción de metabolitos secundarios se da en este momento como forma de proteger el conjunto de nutrientes (Barka *et al.*, 2016). Los micelios aéreos desarrollan septos, y los núcleos se dividen en esporas uni-genómicas que luego se propagan (Loria *et al.*, 2006). La forma de las cadenas de esporas, que pueden ser rectas, ramificadas, espirales u onduladas, es una característica taxonómica importante (Loria *et al.*, 1997).

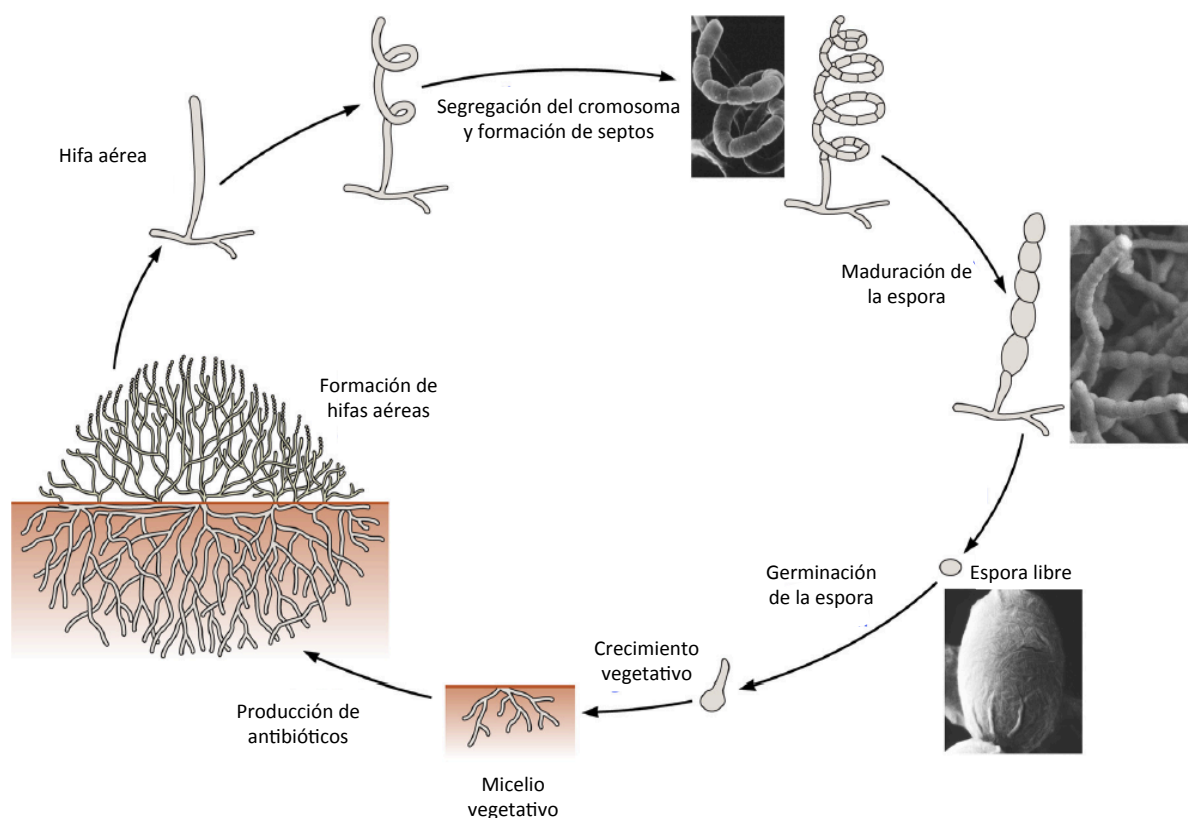


Figura 1.2. Representación esquemática del ciclo de vida de *Streptomyces*. Imagen extraída de Barka y colaboradores (2016) con modificaciones.

1.3 El particular genoma de *Streptomyces*

El género *Streptomyces* dentro del orden Actinomycetales tiene una espectacular diversidad en morfología, tamaño y contenido G+C del genoma así como en la cantidad de secuencias codificantes. Las bacterias del género *Streptomyces* se destacan por poseer un cromosoma lineal de gran tamaño, entre aproximadamente 8.5 y 12Mb, con contenidos de GC entre 67-78% (Law *et al.*, 2018). El cromosoma lineal de estos organismos parecería facilitar la flexibilidad del genoma, ya que la región central del cromosoma de 4.5-6Mb está enriquecida de genes involucrados en funciones metabólicas esenciales, como crecimiento y metabolismo, mientras que en cada extremo del cromosoma de unos 2 a 3Mb, se encuentran múltiples *clusters* de genes que codifican para una variedad de metabolitos secundarios (Chater *et al.*, 2010; Loria *et al.*, 2006; Wanner & Kirk, 2015). Estudios de genomas de *Streptomyces* han revelado que contienen más de 20 *clusters* de genes de metabolitos secundarios que codifican biosíntesis de policétidos por policétido sintasas (PKS), péptidos por sintetisas de péptidos no ribosomales (NRPS), bacteriocinas, terpenoides, aminoglucósidos y otros productos naturales (Nett *et al.*, 2009). Muchos de estos *clusters* se encuentran delimitados por secuencias repetidas invertidas,

secuencias de inserción o sitios de integración de fagos, lo que sugiere que se han transferido horizontalmente entre y dentro de los genomas de *Streptomyces* (Wanner & Kirk, 2015). *Streptomyces* también contiene plásmidos circulares y lineales que contribuyen a la adaptabilidad y sin duda mejoran la transferencia horizontal de genes (Loria *et al.*, 2006). El cromosoma lineal de *Streptomyces* tiene un origen de replicación central (*OriC*) y al final de los extremos contiene secuencias terminales repetidas e invertidas. 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). El cromosoma posee a su vez proteínas covalentemente unidas en los extremos 5' (Volff & Altenbuchner, 1998). Hasta la fecha, se han reportado 348 genomas secuenciados de cepas de *Streptomyces* en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse>). La mayoría de las cepas secuenciadas producen algún metabolito de interés o son patógenos de plantas. El primer genoma secuenciado de un *Streptomyces* patógeno de plantas fue en el 2005, de la cepa *S. scabiei* 87-22 (Número de acceso GenBank NC_013929). Desde entonces, las secuencias genómicas de otras cepas de *S. scabiei*, así como de otras especies patógenas, se han completado (Bown & Bignell, 2017b; Huguet-Tapia *et al.*, 2016; Tomihama *et al.*, 2016; Wanner & Kirk, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Zhang & Loria, 2017). La genómica comparativa se ha acelerado con el advenimiento de una secuenciación más accesible y rápida (se debe tener en cuenta que la calidad de las secuencias de genomas de *Streptomyces* depositadas es variable). A partir de estas secuencias se han realizado estudios sobre la composición del genoma dentro de este género. Kim y colaboradores compararon los genomas de 17 cepas diversas (que van de 6.7 a 12.3 Mb). Los genomas contenían de 5.382 a 10.022 secuencias codificantes (CDS), de las cuales 2.018 estaban presentes en todos, por lo que forman parte del genoma central (Core-genoma), el que ocupa la mayor parte de la región central de los cromosomas lineales de *Streptomyces*. La mayoría de los genes restantes estaban presentes en solo uno o unos pocos genomas. Éstos forman parte del genoma accesorio para el cual se totalizó 32.574 genes, por lo que el pan-genoma de *Streptomyces* comprende al menos 34.592 genes (Kim *et al.*, 2015). Los genes accesorios se encuentran principalmente en los extremos de los cromosomas, inestables y están sujetos a reemplazo por recombinación con plásmidos lineales o segmentos de cromosomas transferidos por conjugación de otros estreptomicetos. Estudios recientes han revelado un nivel inesperadamente alto de recombinación dentro de genes representativos del genoma-core, lo que resulta en la incongruencia filogenética entre estos genes (Huguet-Tapia *et al.*, 2016, Doroghazi & Buckley, 2010; Cheng *et al.*, 2016). Los niveles de recombinación detectados son lo suficientemente altos como para plantear que la diversidad taxonómica del género ha tenido lugar en un tiempo significativamente más corto que el ampliamente aceptado (Cheng *et al.*, 2016). Durante la divergencia de antepasados comunes, dicho intercambio genético continuó a

un ritmo que disminuyó a medida que aumentó la divergencia, generando un origen reticulado de estreptomicetos existentes, en gran parte definido por un número relativamente pequeño de eventos de recombinación ancestral. La recombinación asociada con la divergencia naciente continúa hasta el presente cercano, ya que los eventos de recombinación detectados por el análisis del genoma de aislados independientes de la misma especie son aproximadamente 100 veces más frecuentes que aquellos entre especies (Chater, 2016; Doroghazi & Buckley, 2010).

1.4 *Streptomyces* spp. : Taxonomía y Clasificación

Streptomyces es el género más numeroso dentro de la familia *Streptomycetaceae*, perteneciente al filo *Actinobacteria*. Las bacterias del género *Streptomyces* producen metabolitos secundarios que tienen diversos efectos biológicos. Actualmente, se conocen más de 10.000 compuestos bioactivos derivados de *Streptomyces* (Law *et al.*, 2018). El descubrimiento de antibióticos producidos por bacterias de este género en la década de 1940 derivó en la detección intensiva de nuevos compuestos bioactivos y, posteriormente, la necesidad de patentar condujo a una sobre clasificación del género. Las cepas productoras de productos naturales novedosos fueron descritas como nuevas especies y patentadas. Las especies descritas dentro del género *Streptomyces* aumentaron de aproximadamente 40 a más de 3.000, considerándose muchas de estas cepas sinónimas (Anderson *et al.*, 2001). Afortunadamente, se han llevado a cabo modificaciones en su taxonomía para abordar este problema. Actualmente, el género *Streptomyces* consta de 854 especies y 38 subespecies que se describen de manera válida (www.bacterio.net). El Proyecto Internacional *Streptomyces* (ISP) se enfoca en la clasificación de cepas *Streptomyces* desde 1964, con el objetivo de lograr una caracterización confiable de las cepas tipo existentes de las especies de *Streptomyces* y *Streptoverticillium*. El ISP fue enmendado y promulgado por el Subcomité de Taxonomía de Actinomicetos del Comité de Taxonomía de la Sociedad Americana de Microbiología y el Subcomité de Taxonomía de Actinomicetos del Comité Internacional de Nomenclatura Bacteriológica (Labeda *et al.*, 2012; Shirling & Gottlieb, 1968). El ISP trabaja enviando las cepas tipo y neotipo de especies asignadas dentro de estos géneros a un mínimo de tres expertos en diferentes países. Estas son investigadas estrictamente utilizando experimentos estandarizados, incluyendo medios para la identificación de características morfológicas, pigmentación y utilización de fuentes de carbono (Shirling & Gottlieb, 1966; Shirling & Gottlieb, 1968). Los protocolos y resultados de los estudios del ISP son publicados y las cepas tipo identificadas resultantes depositadas en colecciones de microorganismos reconocidas internacionalmente (Shirling & Gottlieb, 1968; Shirling & Gottlieb, 1969). Aunque los métodos recomendados por el ISP han sido utilizados para la

clasificación y caracterización de *Streptomyces*, sin embargo, no son los mejores, ya que se basan en gran medida en un número limitado de características seleccionadas o criterios fenotípicos estándar como la morfología y la pigmentación (Labeda *et al.*, 2012). Los métodos de identificación y caracterización han evolucionado mediante la aplicación de análisis moleculares y filogenéticos. Quizás el más utilizado actualmente sea el análisis de la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S. Se han realizado muchos estudios basados en la secuencia del gen del ARNr 16S para la identificación del género *Streptomyces* (Lee *et al.*, 2014; Ser *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2017). En general, el gen del ARNr 16S sigue siendo de utilidad para la identificación de especies en otros géneros, pero no es así para *Streptomyces*. Ha habido muchos estudios intentando utilizar las regiones variables de la secuencia del gen ARNr 16S para formar una estructura taxonómica dentro del género *Streptomyces*. Sin embargo, la variación fue demasiado baja para distinguir entre especies de *Streptomyces* estrechamente relacionadas, ya que poseían secuencias del gen muy similares o idénticas, con la adición del problema de sobreespeciación dentro del género (Rong *et al.*, 2009). Además, se han encontrado múltiples copias del gen ARNr 16S heterogéneas dentro de un solo genoma en algunas bacterias (Acinas *et al.*, 2004). Esto sugeriría que existe posibilidad de que ocurran eventos de transferencia horizontal de los genes de ARNr (Acinas *et al.*, 2004; Rong *et al.*, 2009). Por lo tanto, la construcción filogenética basada en secuencias del gen ARNr 16S no podría asegurar árboles filogenéticos bien resueltos que representen una relación entre especies particularmente dentro del género *Streptomyces* (Alam *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2012; Labeda *et al.*, 2012). Por esta razón, en muchos casos las secuencias del gen ARNr 16S proporcionan baja resolución como marcador filogenético para las especies de *Streptomyces*. Por otro lado, el uso de genes que codifican proteínas como marcadores filogenéticos se ha vuelto más común. Se ha demostrado que los genes que codifican proteínas mejoran la resolución y la robustez a nivel de especies de *Streptomyces* y pueden usarse como un enfoque aceptable para la diferenciación de las mismas. Especialmente los genes *houskeeping* *gyrB*, *trpB* y *rpoB* pueden proporcionar un mayor poder discriminatorio de cepas estrechamente relacionadas debido a sus mayores porcentajes de regiones variables y mayores tasas de evolución molecular en comparación con el gen ARNr 16S (Kim *et al.*, 2004; Rong & Huang, 2010). La mayor tasa de evolución podría explicarse por las sustituciones sinónimas predominantemente en la tercera posición de los codones en estos genes codificadores de proteínas que se producen sin afectar las secuencias de aminoácidos (Han *et al.*, 2012). Sin embargo, la utilización de un único gen no resuelve por completo la filogenia en *Streptomyces*. Para abordar este problema, se desarrolló el *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA); que implica el uso de múltiples fragmentos internos a genes como los que codifican para la ATP sintasa F1 (subunidad- β ; *atpD*), ADN girasa (subunidad- β ; *gyrB*), recombinasa A (*recA*), ARN polimerasa (subunidad- β ; *rpoB*), y triptofano sintasa (subunidad- β ; *trpB*). La utilización de este método ha

resuelto con éxito las relaciones evolutivas de algunas especies de *Streptomyces* estrechamente relacionadas (Guo *et al.*, 2008). Actualmente, la técnica de MLSA se ha aplicado ampliamente para deducir la filogenia bacteriana y tiene como objetivo amortiguar las distorsiones filogenéticas causadas por la recombinación (Glaeser & Kämpfer, 2015). Este método podría ser una alternativa a la técnica de Hibridación ADN-ADN (DDH), ya que es reproducible y posee una resolución comparable (Rong *et al.*, 2009). Estudios previos han determinado una alta correlación entre DDH y MLSA. Una distancia evolutiva de 0.007 basada en el esquema de MLSA de los cinco genes mencionados, corresponde al valor DDH del 70%, punto de corte para la determinación de especies del género *Streptomyces* (Glaeser & Kämpfer, 2015; Rong & Huang, 2010; Rong & Huang, 2012). DDH es una técnica molecular basada en el ADN utilizada para indicar la distancia genética o la similitud genética entre especies, particularmente entre aquellas especies estrechamente relacionadas, a través de comparaciones de todo el genoma. La hibridación ADN-ADN en el laboratorio sigue siendo considerada el método *gold estándar* para determinación de especie. Sin embargo, se trata de un método tedioso y difícil de estandarizar (Achtman & Wagner, 2008). En contraste y debido a los avances en las tecnologías de secuenciación, análisis de datos y la disponibilidad de genomas, métodos como *in silico* DNA-DNA Hibridization (*isDDH*) y *Average nucleotide identity* (ANI) basados en la secuencia del genoma son reproducibles y rápidos siempre que esté disponible la secuencia del genoma. El ANI de todos los genes compartidos por los aislamientos proporciona una buena estimación de la distancia evolutiva. En general un valor ANI del 95 al 96% y un valor del 70% *isDDH* corresponde al estándar de 70% DDH, por lo que ambos valores se utilizan como punto de corte en la discriminación de especies (Goris *et al.*, 2007; Meier-Kotloff *et al.*, 2013). A su vez aprovechando la disponibilidad de genomas del género *Streptomyces* se han realizado estudios filogenómicos. Éstos consisten en la concatenación de las secuencias de cientos de genes de copia única conservados en el conjunto de cepas analizadas. Estos análisis comparativos han permitido resolver eficientemente relaciones filogenéticas en dicho género (Zhang *et al.*, 2016; Zhang & Loria, 2017). La identificación y caracterización taxonómica de las especies de *Streptomyces* es relativamente difícil principalmente debido a la gran cantidad de especies presentes en este género. Por lo cual para un resultado confiable se requiere de una taxonomía polifásica, donde se deben realizar métodos que involucren características fenotípicas, genotípicas y filogenéticas.

1.5 Distribución geográfica y características de las especies de *Streptomyces* patógenas

La sarna de la papa, es una enfermedad causada por un complejo de especies del género *Streptomyces*, las cuales presentan diferencias en morfología, fisiología, características moleculares y patogenicidad (Dees & Wanner, 2012). *Streptomyces scabiei* es la primera especie descrita como causante de sarna común (sinónimo. *S. scabies*) (Lambert & Loria, 1989a). Está distribuida mundialmente, principalmente en suelos secos con un rango de pH de 5.5 a 7.5 (Powelson & Rowe, 2008). Se caracteriza por poseer esporas grises lisas que forman cadenas en espiral (Lambert & Loria, 1989a). Las cepas de *S. scabiei* se pueden distinguir en base a sus características fisiológicas. Muchas cepas evaluadas por Lambert y Loria, no degradaron xantina y fueron susceptibles hasta 20 µg/ml de estreptomicina y 0.5 µg/ml de cristal violeta. Producen melanina en agar tirosina y hierro peptona agar y utilizan todos los carbohidratos como fuente de carbono recomendados para la caracterización de especies del género *Streptomyces* por el *International Streptomyces Project* (Lambert & Loria, 1989a; Shirling & Gottlieb, 1966). Bouček-Mechiche y colaboradores analizando cepas con características morfológicas y fisiológicas de *S. scabiei*, basados en la relación ADN-ADN y la secuencia del gen del ARNr 16S concluyeron que éstas podían ser divididas en tres especies genómicas diferentes. Estas especies son *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* y *S. stelliscabiei*. La especie *S. europaeiscabiei* fue descrita en Francia (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000) y ha sido reportada en Estados Unidos, Canadá, Europa, Taiwan y Corea (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000; Dees *et al.*, 2013; Flores-Gonzalez *et al.*, 2008; Hiltunen *et al.*, 2014; Leiminger *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2004; Wanner, 2006). Produce esporas de color gris en cadenas espiraladas, es productora de melanina en medios con tirosina y utiliza todos los carbohidratos del ISP. Es sensible a 20µg/ml de estreptomicina y crece en medio conteniendo 0.5 µg/ml de cristal violeta (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000). La especie *S. stelliscabiei* ha sido reportada en Francia, Sudáfrica, Estados Unidos y Alemania (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000; Jordaan & Van der Waals, 2016b; Leiminger *et al.*, 2013; Wanner, 2006). Posee características fenotípicas muy similares a *S. europaeiscabiei*, se diferencian en que *S. stelliscabiei* no asimila 1-o-metil-galactopiranosido y 5-ceto-d-gluconato (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000). *Streptomyces acidiscabies* fue descrita por Lambert y Loria en 1989, esta especie bacteriana tiene como característica principal su crecimiento en sustratos con pH por debajo de 5.2 causando sarna en tubérculos cultivados en suelos ácidos. La sarna ácida causada por *S. acidiscabies* fue reportada por primera vez en Maine (EE.UU) en 1953 por Manzer y McIntyre. Los síntomas fueron idénticos a los producidos por *S. scabies*, pero la enfermedad se produjo en suelos con valores de pH tan bajos como 4.5. Fue descrita en China, Corea, Japón, América del Norte, Reino Unido, Alemania y Uruguay (Lambert & Loria, 1989b;

Lapaz *et al.*, 2012; Leiminger *et al.*, 2013; Mun *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2004; St-Onge *et al.*, 2008; Thwaites *et al.*, 2010; Tóth *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2010). Se caracteriza por la producción de esporas de color blanco a rosa que se agrupan formando cadenas flexuosas, no produce melanina en medios con tirosina y utiliza todos los carbohidratos del ISP excepto la rafinosa (Lambert & Loria, 1989b). Produce un pigmento difusible sensible al pH color rojo o amarillo (Loria *et al.*, 1997). *Streptomyces turgidiscabies* se reportó en la isla de Hokkaido (Japón) en 1995 y fue descrita posteriormente por Miyajima y colaboradores (1998). También ha sido reportado en Finlandia, Corea, Suecia, América del Norte, Alemania y España (Lehtonen *et al.*, 2004; Leiminger *et al.*, 2013; Lindholm *et al.*, 1997; Sarwar *et al.*, 2017; Wanner, 2009). Se caracteriza por tener esporas grises que forman cadenas flexuosas. No produce pigmentos melanoides, ni otros pigmentos difusibles, utiliza todos los carbohidratos recomendados por el ISP y no crece por debajo de pH 4. Por otro lado es sensible a penicilina G y polimixina B (Miyajima *et al.*, 1998). Park y colaboradores (2003) mediante el secuenciado de la región espaciadora 16S-23S y la hibridación ADN-ADN caracterizaron tres nuevas especies de *Streptomyces* aislados en Corea, *Streptomyces luridiscabies*, *S. puniscabies* y *S. niveiscabies*. Estas indujeron síntomas elevados en papas cultivadas en suelos ácidos. *S. luridiscabies* posee esporas blancas-amarillas en cadenas flexuosas y rectas; *S. puniscabies* produce esporas púrpuras-rojas, en cadenas rectas y *S. niveiscabies* produce esporas blancas en cadenas flexuosas y rectas. Estas especies utilizan todos los carbohidratos del ISP. Sólo la especie *S. niveiscabies* no produce melanina. La especie *Streptomyces reticuliscabies*, fue aislada de sarna reticulada en Francia y descrita por Bouček-Méchiche y colaboradores (2000). Posee cadenas de esporas flexuosas con coloración gris, no produce melanina en medios con tirosina y utiliza todos los carbohidratos del ISP como fuente de carbono. *S. caviscabies* se reportó en la región de Quebec, Canadá asociada a síntomas profundos de sarna común por Faucher y colaboradores (1992). Fue caracterizada y descrita por Goyer y colaboradores (1996). Posee esporas blancas formando cadenas flexuosas, no produce melanina, no crece a un pH de 4.5 y utiliza sólo rafinosa como fuente de carbono, de acuerdo con el ISP. Esta especie también ha sido reportada en China (Gong *et al.*, 2017). Además de las especies descritas anteriormente, se han reportado cepas de *S. bottropensis*, y de los grupos *Streptomyces sp. IdahoX* y *S. sp. DS3024* que causan sarna en la papa (Hao *et al.*, 2009; Sarwar *et al.*, 2018; Wanner, 2007; Zhou *et al.*, 2017; Sarwar *et al.*, 2018).

1.6 Ciclo de la enfermedad

Las especies de *Streptomyces* saprófitos sobreviven en el suelo o en tejidos vegetales infectados en forma de micelio vegetativo o esporas. Las esporas pueden sobrevivir durante largos periodos en suelos secos mientras que las hifas no son tolerantes a la alta humedad del suelo

(Cancino, 2003). Las esporas pueden ser propagadas por la lluvia, el viento, tierra adherida a herramientas o a través de papa semilla contaminada (Lehtonen *et al.*, 2004). La característica hidrofóbica de las mismas les permite ser transportadas también por artrópodos y nematodos (Loria *et al.*, 2006). Las esporas germinan e invaden los tejidos a través de lenticelas, heridas, estomas y, en tubérculos jóvenes. Desde el inicio de la tuberización, los tejidos del tubérculo se encuentran sometidos a un proceso de crecimiento continuo. El periodo de mayor susceptibilidad a la infección por *Streptomyces* es hasta tres o cuatro semanas después del inicio de la tuberización ya que las lenticelas jóvenes aún no han formado una capa de suberina protectora (Agrios 2005; Khatri *et al.*, 2011; Locci *et al.*, 1994). Después de la penetración, el patógeno coloniza y crece a través de las pocas capas celulares externas de forma simplástica y apoplástica (Agrios 2005). La taxtamina, una fitotoxina producida por los *Streptomyces* que causan sarna común, debilita la pared celular de células vegetales en crecimiento activo, permitiendo la penetración del patógeno (Fry & Loria, 2002; Loria *et al.*, 2003; Scheible *et al.*, 2003; Tegg *et al.*, 2005). El tubérculo es el único tipo de tejido conocido que muestra síntomas en la papa (Powelson & Rowe, 2008). Sin embargo, Han y colaboradores demostraron que *S. scabiei* afecta la emergencia y el crecimiento de las raíces en las primeras etapas de desarrollo (Han *et al.*, 2008). A medida que las células del huésped mueren, proporcionan nutrientes para la bacteria. Posteriormente, las células vivas alrededor del área de infección se dividen y producen capas de células de corcho que eventualmente empujan hacia fuera, formándose superficies ásperas y suberizadas (síntoma de la sarna) en la superficie del tubérculo, permitiendo a su vez la diseminación del patógeno hacia células vecinas (Agrios, 2005; Babcock *et al.*, 1993). Las lesiones pueden aparecer como pequeñas protuberancias con una depresión central cubierta por tejido corchoso, que a veces abarcan toda la superficie del tubérculo. La profundidad de la lesión depende de la variedad del huésped, de las condiciones del suelo, y de la invasión de la lesión por otros organismos, incluyendo insectos. Estos últimos parecen romper las capas de corcho y permitir que el patógeno invada el tubérculo a mayor profundidad. Las lesiones de sarna a menudo sirven como puntos de entrada, para organismos parásitos secundarios o saprófitos que hacen que los tejidos se pudran (Agrios, 2005). Inicialmente las lesiones son pequeñas (5-8 mm) y superficiales, pero a medida que el agente patógeno coloniza el tubérculo, el huésped desarrolla heridas en la peridermis dando lugar a lesiones ligeramente elevadas, compuestas por tejido áspero, corchoso. Estas manchas pueden unirse para formar lesiones de forma irregular, que suelen ser tanto de color marrón y de textura áspera (Gouws, 2006). Los parches pueden convertirse en grietas cuando la infección progresa y adquieren una apariencia de estrella. La enfermedad también puede extenderse al tubérculo resultando en sarna superficial (Ndowora *et al.*, 1996). En lesiones superficiales la

peridermis del tubérculo se mantiene intacta. Pero en lesiones más profundas, la peridermis del tubérculo se rompe y se forman varias capas de "corcho" (Gouws, 2006) (Figura 1.3).

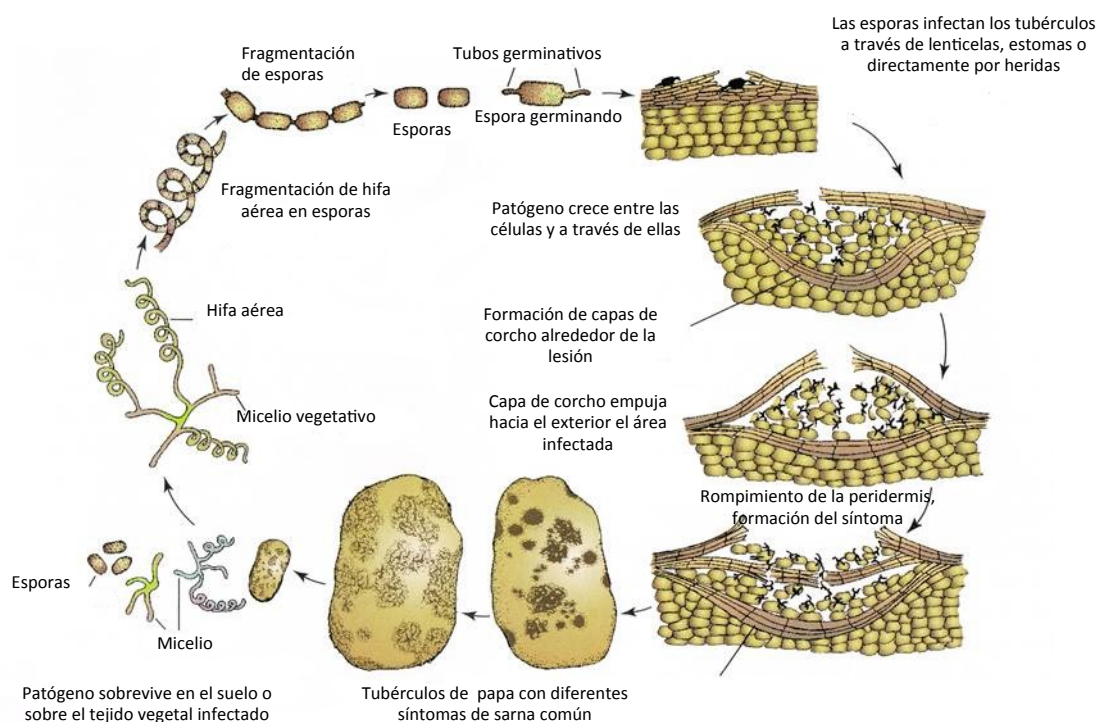


Figura 1.3. Ciclo de la enfermedad de sarna común causada por *S. scabiei*. Imagen extraída de Agrios, 2005 con modificaciones.

1.7 Mecanismos de Virulencia

En los últimos años, el estudio sobre los *Streptomyces* spp. patógenos de plantas ha proporcionado pistas para una mejor comprensión de los mecanismos utilizados por estos organismos para colonizar e infectar a una planta huésped y causar enfermedad. Estos avances han sido posibles en gran medida por la disponibilidad de un número creciente de genomas secuenciados de *Streptomyces* patógenos y no patógenos. Esto ha posibilitado la realización de análisis genómicos comparativos que han permitido identificar nuevos factores de virulencia. Los factores de virulencia así como otros factores que están potencialmente involucrados en la mediación de las interacciones *Streptomyces* – planta, se dividen en tres categorías principales: fitotoxinas, fitohormonas y proteínas secretadas (Li *et al.*, 2019a).

1.7.1 Fitotoxinas

El género *Streptomyces* es conocido por su capacidad para producir metabolitos secundarios útiles desde el punto de vista médico y agrícola. Las primeras investigaciones sobre los

mecanismos de patogenicidad en planta de *Streptomyces* revelaron el rol de metabolitos fitotóxicos especializados (fitotoxinas) como factores de patogenicidad claves. Las primeras fitotoxinas de *Streptomyces* asociadas con la patogenicidad en planta fueron taxtomina A y B (King *et al.*, 1989). Aunque las taxtominas son consideradas el principal determinante de patogenicidad asociado con la sarna común en la papa, actualmente hay evidencia de que otras fitotoxinas pueden desempeñar un papel clave en el desarrollo o la gravedad de la enfermedad (Bignell *et al.*, 2010; Bignell *et al.*, 2014; Dees & Wanner, 2012).

Taxtominas

Las taxtominas son una familia de metabolitos fitotóxicos que consisten en dipéptidos cíclicos (2,5-dicetopiperazinas) derivados de L-fenilalanina y L-4-nitrotriptófano (Bignell *et al.*, 2014, King & Calhoun, 2009). Se han identificado once análogos de taxtominas, y varían en la incorporación de grupos hidroxilo y N-metilo en ubicaciones específicas en el esqueleto de taxtomina. La taxtomina A (TxtA) (Figura 1.4) es el principal análogo de la taxtomina producido por *S. scabiei*, aunque se han detectado otros análogos en bajas cantidades (King & Calhoun, 2009). *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. niveiscabiei*, *Streptomyces* sp. IdahoX y *Streptomyces* sp. DS3024 también producen taxtomina A (Bignell *et al.*, 2014; Healy *et al.*, 2000; King *et al.*, 1989; King & Calhoun, 2009; Park *et al.*, 2003b). Un análogo de taxtomina menos modificado, taxtomina C (Figura 1.4), es el producto principal producido por *S. ipomoeae* agente causal de sarna en boniato (King *et al.*, 1994; Guan *et al.*, 2012).

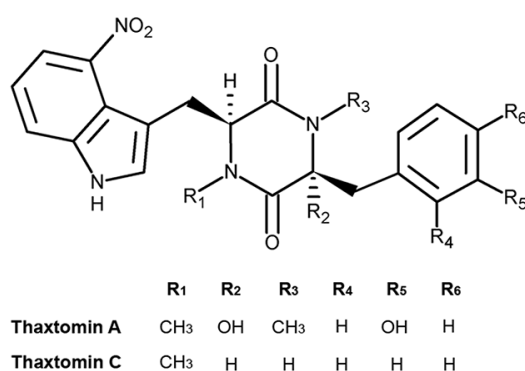


Figura 1.4. Estructura química de las taxtominas A y C. Imagen extraída de Li *et al.*, 2019a con modificaciones.

Varios estudios han demostrado una correlación positiva entre la producción de taxtomina y la patogenicidad de *Streptomyces* spp. (Goyer *et al.*, 1998; Guan *et al.*, 2012; Healy *et al.*, 2000; King

et al., 1991; Kinkel *et al.*, 1998; Loria *et al.*, 1995) La taxtomina A pura induce necrosis en el tejido de discos de papa, y extractos conteniendo taxtomina A y B pueden inducir lesiones típicas de sarna común en mini tubérculos cultivados asépticamente (Lawrence *et al.*, 1990; Loria *et al.*, 2006). Varias evidencias sugieren que la taxtomina A funciona como un inhibidor de la biosíntesis de celulosa, aunque el blanco celular específico de la toxina sigue siendo desconocido (Bischoff *et al.*, 2009; Duval & Beaudoin, 2009; Fry & Loria, 2002; Scheible *et al.*, 2003). Además, la taxtomina A provoca una respuesta de defensa temprana en *Arabidopsis* al inducir la entrada de Ca^{2+} y la salida de iones H^+ a través de la membrana plasmática (Bischoff *et al.*, 2009; Errakhi *et al.*, 2008; Tegg *et al.*, 2005). La producción de moléculas de la familia taxtomina es exclusiva de los *Streptomyces* spp. patógenos de plantas e involucra un *cluster* de genes biosintéticos que está altamente conservado en estas especies (Huguet-Tapia *et al.*, 2016). El *cluster* consiste en siete genes, de los cuales seis (*txtA*, *txtB*, *txtC*, *txtD*, *txtE* y *txtH*) codifican proteínas involucradas en la biosíntesis del metabolito, y uno (*txtR*) codifica para un regulador transcripcional (Figura 1.5) (Bignell *et al.*, 2014; Huguet-Tapia *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). La biosíntesis de taxtomina comienza con la producción de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina por la óxido nítrico sintasa TxtD (Kers *et al.*, 2004). Una citocromo P450 monooxigenasa, TxtE, nitrifica un L-triptófano utilizando el NO producido por TxtD, generando el intermediario L-4-nitrotriptófano (Barry *et al.*, 2012). Dos sintetasas de péptidos no ribosomales, TxtA y TxtB, utilizan L-fenilalanina y L-4-nitrotriptófano como sustratos, respectivamente, para generar un dipéptido cíclico intermediario llamado taxtomina D (Healy *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2009). La taxtomina D está N-metilada en los grupos nitrotriptofilo y fenilalanilo, y es probable que los pasos de metilación estén catalizados por los dominios S-adenosilmetionina dependiente de N-metiltransferasa que se encuentran en TxtA y TxtB (Bignell *et al.*, 2014). TxtH es una proteína de la familia MbtH (MLPs). Las MLPs son pequeñas proteínas (~70 aminoácidos) que usualmente se encuentran dentro de los *cluster* de NRPS. Estudios recientes mostraron que estas proteínas están involucradas en el correcto plegamiento y en el funcionamiento de algunas sintetasas de péptidos no ribosomales. Recientemente Li y colaboradores confirmaron que la proteína TxtH está involucrada en el plegamiento y funcionamiento de TxtA y TxtB (Li *et al.*, 2019b). La citocromo P450 monooxigenasa introduce los dos grupos hidroxilos al esqueleto de la taxtomina D generándose finalmente la taxtomina A (Healy *et al.*, 2002).

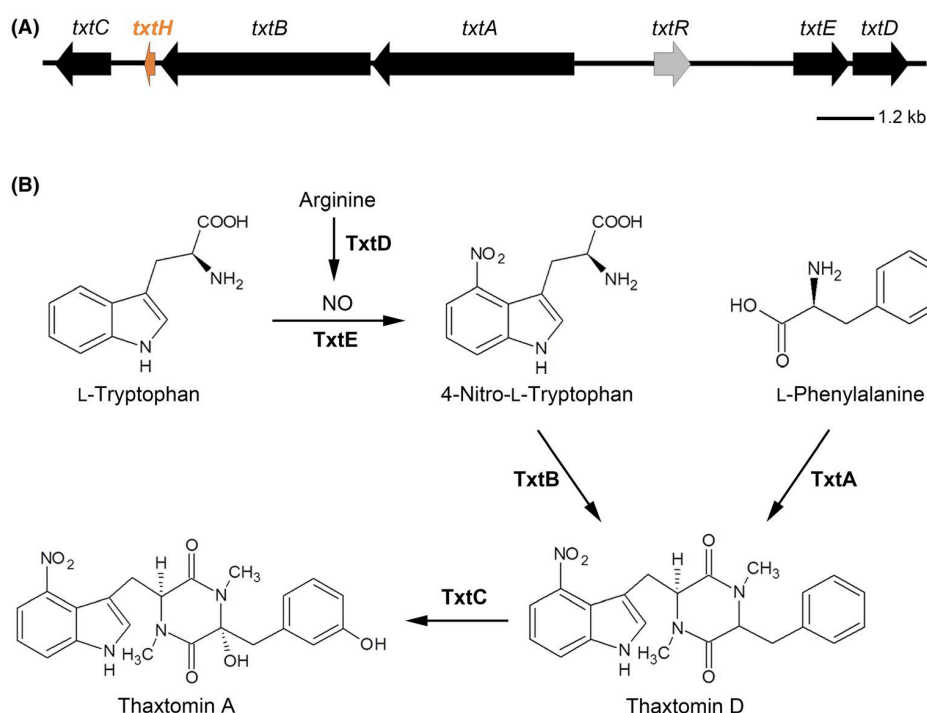


Figura 1.5. A. Organización del *cluster* de genes biosintéticos de taxtomin en la *S. scabiei* 87.22. Las flechas representan los genes dentro del *cluster*, y la dirección de cada flecha indica la dirección de la transcripción. Los genes biosintéticos *txtA*, *txtB*, *txtC*, *txtD* y *txtE* están representados en negro, el gen regulador *txtR* en gris y el gen *txtH* que codifica la proteína similar a MbtH (MLP) en naranja. **B.** La vía biosintética propuesta de taxtomin A en *S. scabiei* 87.22. Imagen extraída de Li *et al.*, 2019b.

Los celo-oligosacáridos celobiosa y celotriosa son considerados los principales inductores de la producción de taxtomin. Estos son transportados hacia el citoplasma mediante el transportador ABC CebEFG-MsiK y sirven como ligandos para el represor CebR, el cual se caracterizó como un represor de la utilización de celulosa/celobiosa/celo-oligosacáridos en *Streptomyces* no patógenos (Francis *et al.*, 2015; Jourdan *et al.*, 2016). Al inhibirse la unión del represor al ADN en los dos sitios *cbs* del *cluster*, se induce la expresión de los genes biosintéticos y reguladores de la taxtomin (Francis *et al.*, 2015) (Figura 1.6). Los tejidos vegetales en expansión sirven como sitio de acción de la taxtomin y el sitio de infección del patógeno. Por lo tanto, debe existir un mecanismo que evite la producción innecesaria de la fitotoxina por la presencia de celo-oligosacáridos producidos a través de la degradación enzimática de la celulosa del material vegetal muerto (Jourdan *et al.*, 2017). Se ha observado que la celotriosa es el inductor más eficaz de la producción de taxtomin, y que se libera de los tejidos vegetales en crecimiento activo mientras que esto no ocurre con la celobiosa (Johnson *et al.*, 2007). Esto ha llevado a proponer que la celotriosa podría servir como una señal específica para la presencia de tejidos vegetales en expansión, mientras que la celobiosa, que es el producto principal de la degradación de la

celulosa por el sistema celulolítico, puede servir como una señal para la presencia de material celular muerto (Jourdan *et al.*, 2017). Esta idea está respaldada por la observación de que el componente CebE del transportador de celo-oligosacáridos se une a la celotriosa con una afinidad mucho mayor que a la celobiosa, lo que sugiere que *S. scabiei* tiene la capacidad de detectar y responder a niveles muy bajos de celotriosa liberada de los tejidos vegetales en expansión (Jourdan *et al.*, 2016). Un inductor adicional de la producción de taxtomina en *S. scabiei* sería la suberina, un biopolímero lipídico insoluble que es uno de los componentes principales de la peridermis de la papa (Komeil *et al.*, 2013). Un estudio de Lerat y colaboradores demostraron que *S. scabiei* cultivado en un medio mínimo que contiene celobiosa o suberina produce solo niveles traza de taxtomina A, mientras que la adición de celobiosa y suberina al medio mejora significativamente el nivel de producción de la fitotoxina (Lerat *et al.*, 2010). Esto sugiere que la suberina y la celobiosa exhiben un efecto sinérgico sobre la producción de taxtomina en *S. scabiei*. Si bien no está claro cómo funciona la suberina como inductor de la biosíntesis de la taxtomina, se ha demostrado que acelera la diferenciación morfológica y mejora la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces* spp., tanto patógenos como no patógenos (Lauzier *et al.*, 2008; Lerat *et al.*, 2009). En particular, Padilla-Reynaud y colaboradores encontraron recientemente que la suberina estimula la producción de glicosil hidrolasas, como las celulasas, cuando se agrega a los medios que contienen celulosa. Esto llevó a proponer que la aparición de mecanismos de virulencia en *S. scabiei* requieren tanto suberina como celulosa, donde la primera estimula la producción de celulasas que generan celobiosa a partir de la celulosa. La producción de taxtomina, a su vez, es inducida tanto por la celobiosa generada como por la suberina, que sirve como desencadenante general del metabolismo especializado en *Streptomyces* spp. (Padilla-Reynaud *et al.*, 2015). La producción de taxtomina en *S. scabiei* también está bajo el control de varios miembros de la familia de genes reguladores globales *bld* (bald) que controlan el desarrollo morfológico y, en algunos casos, el metabolismo secundario en *Streptomyces* spp. (Barka *et al.*, 2016). El gen regulador *txtR* situado en el *cluster* contiene un solo codón TTA, cuya traducción requiere el leucil-ARNt codificado por el gen *bldA*. La eliminación de *bldA* en *S. scabiei* elimina la producción de taxtomina A y reduce significativamente la expresión de los genes biosintéticos (Figura 1.6) (Bignell *et al.*, 2014).

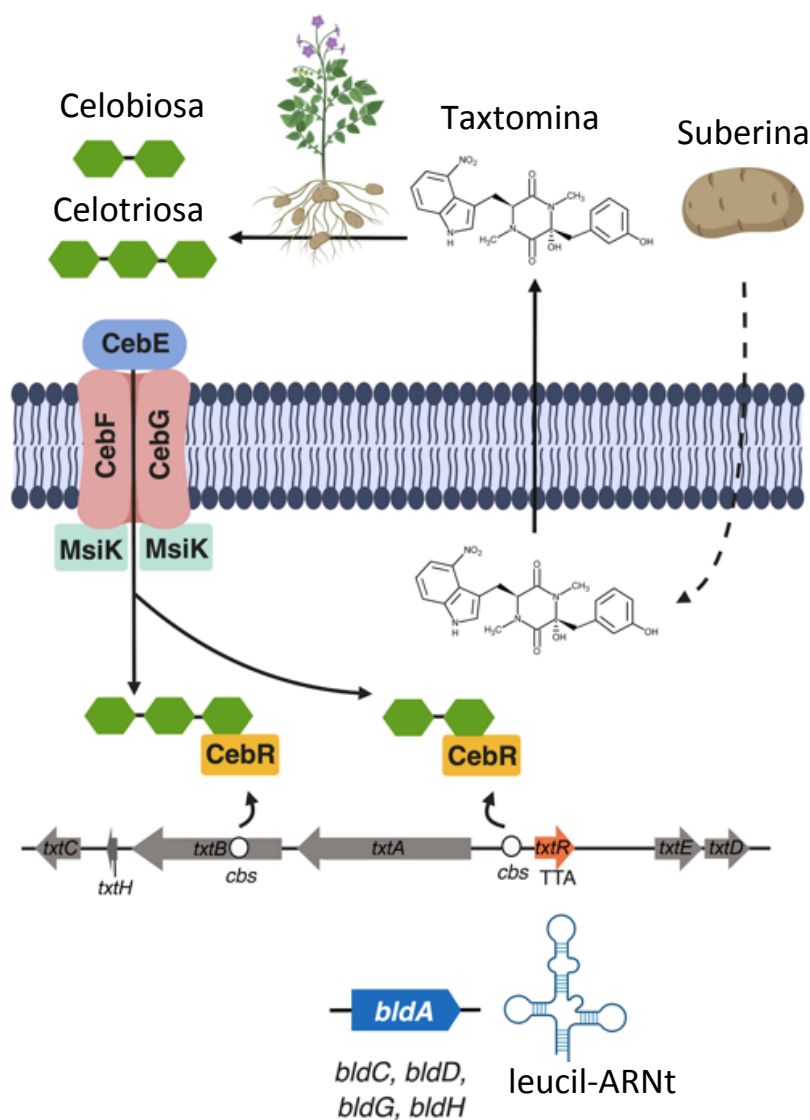


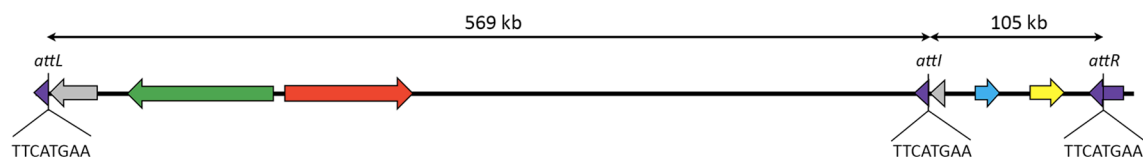
Figura 1.6. Modelo de regulación de la taxtomina A en *S. scabiei*. Se predice que los oligosacáridos se liberan de las paredes celulares en expansión y se transportan al citoplasma de *S. scabiei* a través del transportador ABC -ebEFG-MsiK. Una vez dentro de la célula, los celo-oligosacáridos se unen a CebR, y esto da como resultado la transcripción del grupo de genes del *cluster* de taxtomina al provocar la liberación de CebR de los sitios *cbs* (indicado por ○). La expresión de los genes biosintéticos de la taxtomina, puede aumentar mediante la unión de la celobiosa al activador TxtR, lo que conduce a la producción de taxtomina A. La TxtA luego inhibe la biosíntesis de la celulosa de los tejidos vegetales en expansión y provoca la liberación de más celotriosas, creando así un circuito positivo de retroalimentación para la biosíntesis de taxtomina A. También se sabe que el componente principal del periderma de la papa, la suberina, estimula la producción de TxtA, al afectar el metabolismo secundario en *S. scabiei*. Además, la expresión de *txtR* está regulada por el *bldA* leucil-tRNA, que se requiere para la traducción del codón TTA dentro de la secuencia de codificación de *txtR*, así como por los reguladores transcripcionales *bldC*, *bldD*, *bldG* y *bldH*. Imagen extraída de Li et al^a, 2019a con modificaciones.

Transferencia horizontal del *cluster* de biosíntesis de taxtomina

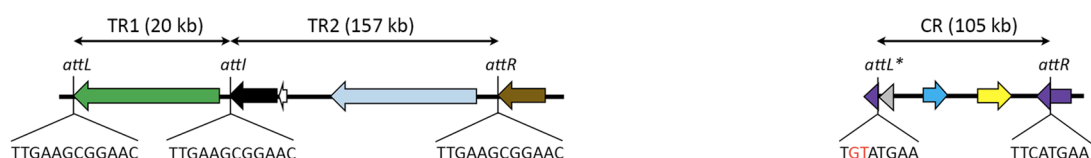
La conservación del *cluster* de biosíntesis de la taxtomina entre *Streptomyces* spp. filogenéticamente distintos sugiere que la transferencia horizontal de genes ha desempeñado un papel en la aparición de nuevas especies de *Streptomyces* fitopatógenas en entornos agrícolas (Huguet-Tapia *et al.*, 2016; Loria *et al.*, 2006). En *S. turgidiscabies* Car8, los genes de biosíntesis de la taxtomina, junto con otros factores de virulencia como *nec1*, *tomA* y el operón *fas*, se localizan en una isla de patogenicidad (IPAS_t) de 674 kb. Ésta se puede transferir a otras especies de *Streptomyces* e integrarse por recombinación sitio específica por una secuencia palindrómica de 8 pb (TTCATGAA) dentro del extremo final 3' del gen de resistencia a la bacitracina (*bacA*) (Figura 1.7). La IPAS_t puede escindirse del cromosoma de *S. turgidiscabies* en módulos de diferentes tamaños y se ha demostrado que la transferencia de la IPAS_t completa confiere un fenotipo patogénico en la especie no patógena *S. diastatochromogenes* (Huguet-Tapia *et al.*, 2014; Kers *et al.*, 2005). En *S. scabiei* 87-22 y *S. acidiscabies* 84.104, los genes de virulencia encontrados en IPAS_t, con la excepción del operón *fas*, están localizados en dos regiones separadas en el cromosoma, llamadas región toxicogénica (TR) y región de colonización (CR) (Figura 1.7). Los genes de biosíntesis de la TxtA se encuentran en la TR, mientras que otros genes de virulencia, como *nec1* y *tomA*, se encuentran en la CR (Huguet-Tapia *et al.*, 2014; Lerat *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2016). La TR de *S. scabiei* 87-22 puede dividirse además en 2 sub-regiones (TR1 y TR2) que están flanqueadas por dos sitios de integración (*att*) y están separadas por un sitio interno *att*. La sub-región TR1, tiene un tamaño de 20 kb y contiene el *cluster* de genes de TxtA, mientras la sub-región TR2, con un tamaño de 157 kb incluye elementos integrativos y de conjugación putativos (Figura 1.7) (Chapleau *et al.*, 2016). Zhang y colegas demostraron que CR y TR1 se encuentran en varias especies diferentes de *Streptomyces* patógenos, mientras que TR2 solo se conserva en cepas de *S. scabiei*, *S. acidiscabies* a10, *S. stelliscabiei* P3825 y en una cepa patógena *Streptomyces* sp. (96-12) aislada en Egipto (Zhang *et al.*, 2016, Zhang & Loria, 2017). Todo el TR o solo el TR1 están integrados en el extremo 3' del gen *aviXI* que codifica para una proteína putativa de unión a ATP/GTP (Figura 1.7). Se ha comprobado en el cromosoma *S. scabiei* 87-22, la escisión de todo el TR, así como de TR1 y TR2. Por otra parte, cuando TR2 o todo el TR fueron transferidos al genoma de una cepa receptora no patógena, ésta se tornó patógena, solo después de recibir el TR completo (Zhang *et al.*, 2016; Chapleau *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren que se requiere TR2 para la movilización, TR1 para la patogenicidad, y ambas sub-regiones son necesarias para generar nuevas especies fitopatógenas (Zhang *et al.*, 2016). Se ha demostrado que TR2 se puede auto movilizar a especies patógenas de *Streptomyces* que albergan solo la región TR1 e integrarse en el sitio *att* de TR1, lo que conlleva a la acumulación en tándem de TR1 residente y TR2 entrante.

El TR2 puede movilizar el TR1 residente en *cis* y transferirlo a una nueva cepa receptora (Zhang & Loria, 2017). Estos estudios han dejado en evidencia que el trasfondo genético de las cepas que adquieren el grupo de genes de taxtomina en la TR y IPAS_t influye en la capacidad de las cepas receptoras para producir taxtomina A (Bignell *et al.*, 2010; Kers *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2018). Esto explicaría por qué la aparición de nuevos patógenos de plantas es relativamente poco frecuente en los sistemas agrícolas (Loria *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2018).

***S. turgidiscabies* Car8 PAIS_t**



***S. scabiei* 87-22 PAIS_s**



***S. acidiscabies* 84.104 PAIS_a**



Figura 1.7. Diagrama esquemático que muestra la organización genética de las islas de patogenicidad de *S. turgidiscabies* Car8, *S. scabiei* 87-22 y *S. acidiscabies* 84.104. La isla completa de patogenicidad de *S. turgidiscabies* (PAIS_t, 674 kb) está flanqueada por dos sitios de unión (*attL* y *attR*) que consisten en una secuencia palindrómica de 8 pb. La PAIS_t se puede dividir aún más en dos módulos que están separados por un sitio de unión interno (*attI*). El módulo de 569 kb contiene el *cluster* de biosíntesis de la taxtomina (Tx_tA) (flecha verde), el *cluster* de genes que codifica para una citoquinina (*fas*) (flecha roja) y un gen de integrasa (*intSt*) (flecha gris), mientras que el módulo de 105 kb contiene *nec1* (flecha azul), *tomA* (flecha amarilla) y un remanente del gen *intSt* (triángulo gris). *attR* se encuentra dentro del extremo 3' del gen *bacA* (flecha morada), mientras que *attL* y *attI* se encuentran dentro de copias truncadas del extremo 3' *bacA* (triángulos morados). Las islas de patogenicidad de *S. scabiei* y *S. acidiscabies* (PAIS_s y PAIS_a) consisten en dos regiones distintas designadas como la región de colonización (CR) y región toxicogénica (TR). La CR en ambas especies es idéntica al módulo de 105 kb de PAIS_t, excepto que está flanqueado por sitios att palindrómicos de 8 pb imperfectos (los residuos que son diferentes están en rojo). La región TR en *S. scabiei* está flanqueada por sitios de unión *attL* y *attR* de 12 pb y contiene un sitio *attI* interno que divide la región en dos sub-regiones llamadas TR1 y TR2. TR1 se conserva en *S. acidiscabies* y contiene el *cluster* Tx_tA, mientras que TR2 no se encuentra en *S. acidiscabies* y contiene un gen de integrasa (flecha negra), un gen factor de recombinación con direccionalidad flecha blanca y genes de conjugación (flecha azul claro). El TR completo en *S. scabiei* y el TR1 en *S. acidiscabies* se insertan en el extremo 3' del gen *aviXI* (flecha marrón). Imagen extraída de Li *et al.*, 2019.

Fitotoxinas coronafacoil

Las fitotoxinas de coronafacoil son fitotoxinas que no son huésped específicas para las que se sabe y se sospecha que son producidas por diferentes bacterias fitopatógenas, incluyendo varios patovares (pv) de *Pseudomonas syringae*. Los miembros de esta familia de fitotoxinas están compuestos por el ácido coronafácico (CFA) basado en el anillo de hidrindano bicíclico y un derivado de aminoácido unido a través de un enlace amida. La coronatina (COR) (Figura 1.8), la fitotoxina coronafacoil mejor caracterizada, es el miembro primario de la familia producida por *P. syringae* y otras *Pseudomonas* spp. y consiste en CFA unido a un aminoácido llamado ácido coronámico (Bignell *et al.*, 2018). Recientemente, se demostró que *S. scabiei* 87-22 puede producir N-coronafacoil-L-isoleucina (CFA-Ile) (Figura 1.8), que también es producida por *P. syringae* en cantidades menores (Fyans *et al.*, 2015). Se han informado otras fitotoxinas coronafacoil producidas en menor cantidad por *S. scabiei* y/o *Pseudomonas* spp. Las fitotoxinas de coronafacoil son factores de virulencia importantes que contribuyen a la persistencia del patógeno y al desarrollo de síntomas de la enfermedad, aunque no son esenciales para la patogenicidad del microorganismo (Bignell *et al.*, 2018). Se ha demostrado que COR funciona activando la señalización del ácido jasmónico (JA) en plantas debido a su capacidad de interactuar con el mismo receptor que el jasmonoil-L-isoleucina (JA-Ile) (Figura 1.8), la forma más bioactiva de JA (Fonseca *et al.*, 2009; Katsir *et al.*, 2008). JA es una molécula de señalización importante que controla varios procesos biológicos, incluida la defensa contra herbívoros y patógenos necrotróficos. Otra vía de señalización importante en las plantas es la vía del ácido salicílico (SA), que es responsable de regular la defensa contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos, entre otras cosas (Glazebrook, 2005). Las vías de señalización JA y SA son antagónicas (Thaler *et al.*, 2012). Por lo tanto, la activación de la vía de señalización JA por COR conduce a la supresión de la señalización mediada por ácido salicílico, que es fundamental para las defensas del huésped contra la infección por *P. syringae* (Xin *et al.*, 2013). COR también suprime la deposición de calosa de una manera independiente de ácido salicílico, y facilita la entrada de patógenos a la planta al superar las defensas estomáticas (Geng *et al.*, 2012; Melotto *et al.*, 2008). El papel de la producción de coronafacoil fitotoxina en el desarrollo de la enfermedad SC no está claro. *S. scabiei* es el único *Streptomyces* sp. conocido que produce esta familia de fitotoxinas pero éstas no son determinantes de patogenicidad esenciales para la inducción de la enfermedad de SC (Bignell *et al.*, 2018). Sin embargo, trabajos recientes sugieren que existe una correlación positiva entre los niveles de producción de CFA-Ile y la gravedad del desarrollo de síntomas de la enfermedad en el tejido del tubérculo de papa (Cheng *et al.*, 2019). Queda por determinar si la producción de CFA-Ile contribuye a la invasión del huésped o la supresión de la planta.

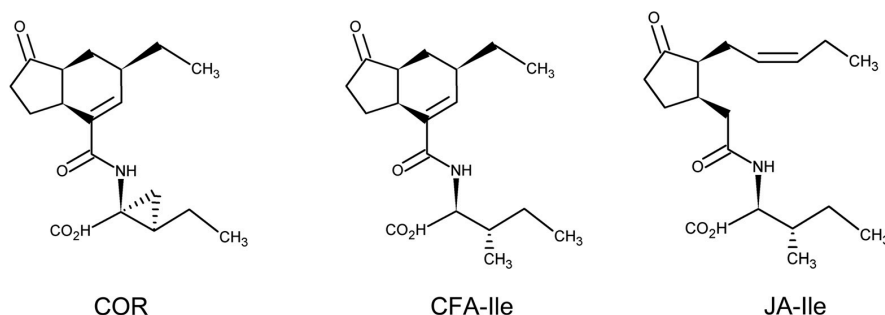


Figura 1.8. Estructuras químicas de las fitotoxinas de coronafacoil. Coronatina (COR) y coronafacoil-L-isoleucina (CFA-Ile) producidas por *P. syringae* y *S. scabiei*, respectivamente, y conjugado bioactivo de la hormona vegetal 7- iso-jasmonil-L-isoleucina (JA-Ile). Imagen modificada de Bown *et al.*, 2017.

Concanamicinas

Las concanamicinas son policétido macrólidos que fueron aislados por primera vez de *S. diastatochromogenes* S-45 (Kinashi *et al.*, 1984). Se caracterizan por un anillo macrólido tetraénico de 18 miembros con un metil enol éter y una cadena lateral β -hidroxihemiacetal. Poseen actividad antifúngica y antineoplásica, pero no actividad antibacteriana (Bignell *et al.*, 2014). Se demostró que las cepas de *S. scabiei* aisladas en Japón producen dos miembros de la familia de las concanamicinas, concanamicina A y B (Figura 1.9), y ambos compuestos muestran actividad inhibidora del crecimiento de las raíces de arroz (*Oryza sativa*), canola (*Brassica napus*) y alfalfa (*Medicago sativa*) (Natsume *et al.*, 1996; Natsume *et al.*, 2005). Se identificó un *cluster* de genes biosintéticos para concanamicina en la secuencia del genoma de *S. scabiei* 87–22 (Bignell *et al.*, 2010), y se confirmó la producción de concanamicina A por esta cepa (Fyans *et al.*, 2016). Al igual que con CFA-Ile, otros *Streptomyces* spp. patógenos no parecen producir concanamicinas (Natsume *et al.*, 1998; Natsume *et al.*, 2001; Natsume *et al.*, 2005). Ensayos en rodajas de papa inoculadas con concanamicina A pura muestran lesiones ligeramente hundidas, mientras que el tratamiento con taxtomina A produce una superficie plana y necrótica. Además, se observó un efecto sinérgico cuando se agregaron ambas fitotoxinas a la misma rodaja de tubérculo. Ensayos inoculando tubérculos con diferentes cepas sugieren que las diferencias en la producción de concanamicina por *Streptomyces* spp. puede contribuir a las diferencias observadas en los tipos de lesiones de sarna en tubérculos de papa infectados (Natsume *et al.*, 2017).

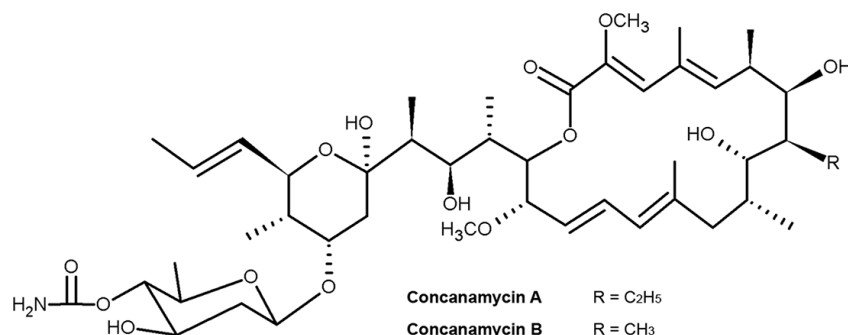


Figura 1.9. Estructura química de las Concanamicinas A y B. Imagen modificada de Li *et al.*, 2019a.

Otras fitotoxinas

Estudios recientes han revelado que otros metabolitos fitotóxicos especializados podrían desempeñar un papel en el desarrollo de la enfermedad por *Streptomyces* spp. La fridamicina E (Figura 1.10A) se purificó recientemente de cultivos de una cepa de *S. turgidiscabies* no productora de taxtomina que se aisló de lesiones superficiales de sarna común en tubérculos de papa en el norte de Suecia. Dicho compuesto pudo inhibir el brote de mini tubérculos de papa o reducir el crecimiento de los brotes de manera dependiente de la concentración, aunque no indujo lesiones de sarna común en los mini tubérculos (Natsume *et al.*, 2018). En Irán se aisló una cepa de *Streptomyces* (GK18) no productora de taxtomina, a partir de lesiones profundas en tubérculos de papa y se reportó que produce el policétido macrólido de 18 miembros llamado borrelidina (Figura 1.10B). Los bioensayos revelaron que la borrelidina pura induce necrosis del tejido del tubérculo de papa y causa atrofia de las plántulas de rabanito (*Raphanus sativa*) (Cao *et al.*, 2012). FD-891 (toxina Kamenoko-byo) es una fitotoxina aislada de una nueva especie de *Streptomyces* llamada *S. cheloniumii* (Figura 1.10C). Es un macrólido de 16 miembros, el cual fue capaz de causar necrosis del tejido del tubérculo de papa e inhibir el crecimiento de las raíces en arroz y el crecimiento de los brotes en la alfalfa (Natsume *et al.*, 2005).

Queda por determinar si las fitotoxinas mencionadas en esta sección son determinantes de patogenicidad esenciales para los organismos productores, pero la ausencia de producción de taxtomina en estas cepas sugiere que múltiples metabolitos fitotóxicos especializados contribuyen al fenotipo patógeno de *Streptomyces* spp.

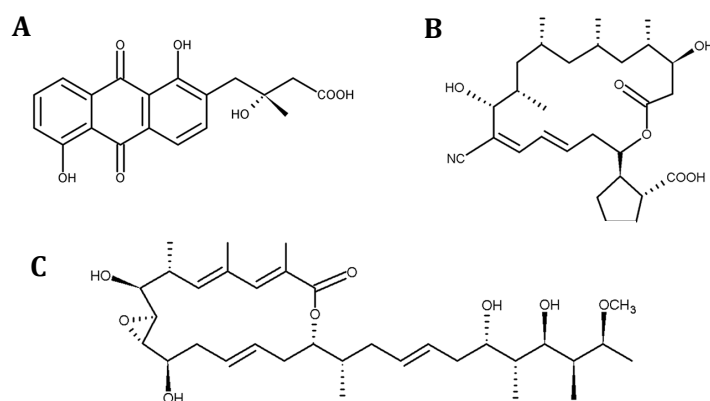


Figura 1.10. Estructuras químicas de fitotoxinas. A. Fridamicina E. B. Borrelidina. C. FD-891. Imagen modificada de Li *et al.*, 2019a.

1.7.2 Fitohormonas

Los patógenos de plantas han desarrollado estrategias para influir en las vías de señalización de las hormonas de las plantas para facilitar la infección del huésped. Por ejemplo, algunos patógenos producen toxinas o efectores que manipulan las vías de señalización de fitohormonas y, como ya se discutió, la producción de COR por *P. syringae* es un ejemplo de dicha estrategia. Además, muchos patógenos de plantas producen fitohormonas como las citoquininas, las auxinas y el etileno como una forma de alterar la señalización hormonal en el huésped. Como las hormonas regulan varios procesos durante el crecimiento y las respuestas al estrés en plantas, la manipulación de las vías de señalización de fitohormonas puede permitir que los patógenos supriman las respuestas de defensa de las plantas y/o se hagan cargo de los procesos de desarrollo y asignación de nutrientes para facilitar la colonización y diseminación. A continuación se detallan fitohormonas producidas por *Streptomyces* spp. y su potencial rol en la virulencia.

Citoquininas

Las citoquininas (CK) se conocen clásicamente como hormonas de "crecimiento" debido a su papel en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. Muchos patógenos de plantas producen CK para ayudar a la translocación de nutrientes en sitios de infección para mejorar la proliferación de patógenos (Ma & Ma, 2016). En un estudio realizado por Kers y colaboradores, se identificó un supuesto grupo de genes biosintéticos CK adyacente al grupo de genes de

taxtomina en la IPAS_t de *S. turgidiscabies* (Figura 1.7) (Kers *et al.*, 2005). Se determinó que el grupo de genes es muy similar en contenido y organización al operón de fasciación vegetal (*fas*) que está presente en *Rhodococcus fascians*, y el cual induce agallas en una amplia gama de plantas (Goethals *et al.*, 2001; Kers *et al.*, 2005). Curiosamente, el operón *fas* no está presente en otros *Streptomyces* spp. (Figura 1.7), lo que sugiere que el operón fue obtenido por *S. turgidiscabies* Car8 después de que la IPAS_t fue movilizada en este organismo (Joshi & Loria, 2007a ; Kers *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2016). El operón *fas* en *R. fascians* es necesario para la patogenicidad y dirige la síntesis de una mezcla de CK (Eason *et al.*, 1996; Pertry *et al.*, 2009). En *S. turgidiscabies*, todos los genes dentro del operón *fas* se expresan en condiciones que apoyan la producción de taxtomina, y se demostró que los sobrenadantes de cultivo exhiben actividad CK. Además, las plántulas de *Arabidopsis* y tabaco infectadas con un mutante de *S. turgidiscabies* deficiente en taxtomina desarrollaron agallas, y este efecto no se observó cuando se usó un mutante de operón *fas* en ensayos de infección. No está claro qué papel juega la producción de CK por *S. turgidiscabies* en la infección por patógenos y el desarrollo de la enfermedad de SC, pero es notable que se haya informado que esta especie produce lesiones elevadas particularmente grandes en los tubérculos de papa, y es posible que la producción de CK contribuya a la mayor reproducción o dispersión del patógeno en estas lesiones (Joshi & Loria, 2007a).

Ácido indol-3-acético (AIA)

El ácido indol-3-acético (AIA) es el miembro mejor caracterizado de la clase de auxinas de las hormonas vegetales y desempeña un papel fundamental en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Ma & Ma, 2016). El AIA puede ser producido por una amplia variedad de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas y bacterias patógenas de las plantas (Patten *et al.*, 2009). Los estudios han demostrado que AIA es un factor de virulencia relevante en varias bacterias fitopatógenas (Bignell *et al.*, 2010; Castillo-Lizardo *et al.*, 2015). En el género *Streptomyces*, se ha encontrado la producción de AIA en varias especies, incluida *S. scabiei* (Bignell *et al.*, 2010). El genoma de *S. scabiei* 87-22 reveló la presencia de los genes *scab_75511* y *scab_75501*, que son homólogos de *iaaM* y *iaaH*, respectivamente, de la vía indol-3-acetimida, que es la vía mejor caracterizada en las bacterias fitopatógenas (Bignell *et al.*, 2010; Patten *et al.*, 2009). Los mutantes de *S. scabiei* que carecen de *iaaH* o *iaaM* redujeron la producción de AIA y causaron menos necrosis en las raíces de rábano en comparación con la cepa de tipo salvaje (Hsu, 2010). Sin embargo, un estudio realizado por Legault y sus colaboradores mostraron que la producción de AIA por *S. scabiei* se mejora significativamente mediante la adición de L-

triptófano al medio de cultivo, mientras que la producción de taxtomina A se redujo en las mismas condiciones, al igual que la virulencia en las plántulas de rábano (Legault *et al.*, 2011). Por lo tanto, el papel de la producción de AIA como factor de virulencia para *S. scabiei* requiere más investigación.

1.7.3 Proteínas secretadas

Un rol fundamental en la patogénesis microbiana lo cumplen las proteínas secretadas por los patógenos dentro de la célula vegetal, así como las enzimas extracelulares que descomponen los polímeros de la pared celular de las plantas. Las enzimas extracelulares permiten la adquisición de nutrientes, la penetración y la propagación del microorganismo a través de los tejidos del huésped (Alfano, 2009; Hogenhout & Loria, 2008). Las bacterias Gram-negativas, que contienen una envoltura celular con doble membrana, exhiben seis sistemas de secreción de proteínas (tipos I – VI), que mueven las proteínas desde el citoplasma al exterior de la célula mediante un mecanismo de uno o dos pasos (Desvaux *et al.*, 2009). Estos sistemas de secreción están ausentes en las bacterias Gram-positivas, que generalmente (con la excepción de las micobacterias y los géneros estrechamente relacionados) tienen una organización de envoltura celular más simple que comprende una sola membrana. Los sistemas de secreción Sec y Tat, que se encuentran en la membrana citoplasmática de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, secretan en bacterias Gram-positivas directamente proteínas extracelulares (Fyans *et al.*, 2013; Sibbald *et al.*, 2006; Widdick *et al.*, 2006). Uno de los sistemas especializados más estudiado es el de secreción tipo III (TTSS), factor de virulencia característico en muchas bacterias fitopatógenas Gram-negativas (Chang *et al.*, 2014). Este sistema despliega proteínas denominadas efectores dentro de las células vegetales de forma de suprimir la respuesta de defensa del huésped (Thapa *et al.*, 2019). La falta de un sistema de secreción de proteínas de tipo III en *Firmicutes* y *Actinobacteria* plantea inmediatamente preguntas sobre el suministro de proteínas de virulencia a través de la pared y la membrana celular de la planta. *S. scabiei*, *S. turgidiscabies* y *S. acidiscabies* penetran directamente a través de las paredes celulares de las plantas con la ayuda de la fitotoxina taxtomina que inhibe la biosíntesis de celulosa, presumiblemente permitiendo la secreción de proteínas en la membrana de la célula huésped. (Hogenhout & Loria, 2008). Las bacterias Gram-positivas poseen un sistema especializado de exportación de proteínas, denominado sistema de secreción tipo VII o ESX (Burts *et al.*, 2005; Fyans *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2003; Pym *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2003). Se ha observado que tres de los cinco sistemas de secreción de tipo VII (T7SS) de *Mycobacterium tuberculosis* funcionan de manera similar al TTSS para secretar efectores y éstos son necesarios o

contribuyen a la virulencia (Gröschel *et al.*, 2016). Por lo tanto, el T7SS podría funcionar en la virulencia de las bacterias fitopatógenas Gram-positivas. Se ha demostrado también que el T7SS es esencial para la viabilidad y está involucrado en la conjugación. Mutantes de *S. scabiei* que poseen genes afectados asociados a T7SS, todavía son capaces de causar síntomas, pero se ven alterados en el desarrollo (Fyans *et al.*, 2013). A continuación se describen algunas de las proteínas secretadas que estarían involucradas en la patogenicidad de *Streptomyces* spp.

Nec1

nec1 codifica una proteína secretada de 16 kDa que exhibe actividad necrogénica en el tejido en discos de papa. El bajo contenido de GC (54%) de este gen en relación con el resto del genoma de *Streptomyces*, sugiere que fue adquirido a través de transferencia horizontal (Bukhalid *et al.*, 1998). *nec1* se conserva en varias especies que causan sarna y se encuentra en la IPASt en *S. turgidiscabies* y en el CR en *S. scabiei*, *S. acidiscabies*, *S. europaeiscabiei* y *S. stelliscabiei* (Figura 1.7) (Kers *et al.*, 2005; Lerat *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2016). Sin embargo, *nec1* no es un factor de patogenicidad esencial, ya que varias cepas patógenas de *Streptomyces* carecen de este gen (Bukhalid *et al.*, 2002; Wanner *et al.*, 2004; Wanner, 2006; Wanner, 2009). La eliminación de *nec1* en *S. turgidiscabies* reduce en gran medida su virulencia en bioensayos de plantas utilizando *Arabidopsis*, tabaco y rábano como hospedadores, y el mutante se ve comprometido en su capacidad de colonizar agresivamente las raíces de rábano. Actualmente, el objetivo específico de Nec1 y su función siguen siendo desconocidos, aunque se ha sugerido que Nec1 funciona temprano en el proceso de infección y puede estar involucrado en la supresión de las respuestas de defensa de la planta (Joshi *et al.*, 2007b).

TomA

El gen *tomA* se descubrió por primera vez en una secuencia parcial del IPASt de *S. turgidiscabies* Car8 (Kers *et al.*, 2005). Al igual que *nec1*, el gen se conserva en varios *Streptomyces* causantes de sarna y se encuentra en la región CR en *S. scabiei*, *S. acidiscabies*, *S. europaeiscabiei* y *S. stelliscabiei* (Figura 1.7) (Kers *et al.*, 2005; Lerat *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2016). *tomA* codifica un homólogo de tomatinasa (TomA), una enzima bien caracterizada que se encuentra en hongos patógenos del tomate (Kers *et al.*, 2005). La tomatinasa es un miembro de la familia saponinasa, enzimas secretadas que funcionan como glicosil hidrolasas dirigidas a las saponinas, que son glucósidos vegetales preformados que confieren resistencia al ataque de patógenos. La tomatinasa actúa sobre la α -tomatina, un tipo de saponina que utilizan las plantas de tomate en las respuestas de defensa (Bouarab *et al.*, 2002; Kaup *et al.*, 2005). En el hongo patógeno del

tomate *Septoria lycopersici*, TomA tiene una doble función, ya que hidroliza la α -tomatina para protegerse y los productos de degradación también interfieren con la respuesta de defensa de la planta (Bouarab *et al.*, 2002). Por el contrario, mutantes de un homólogo de tomA identificado en el patógeno bacteriano del marchitamiento del tomate *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* no se vieron comprometidas en la virulencia (Kaup *et al.*, 2005). El papel de TomA en la patogenicidad de la planta *Streptomyces* sigue sin estar claro. Se demostró que la enzima TomA de *S. scabiei* 87-22 exhibe actividad contra la α -tomatina, pero no contra los glicoalcaloides de la patata α -chaconina o α -solanina. Además, un mutante de *tomA* en *S. scabiei*, no se vio afectado en la virulencia (Seipke & Loria, 2008). La conservación de este gen en especies de *Streptomyces* patógenos sugiere un papel en la interacción planta-patógeno (Kers *et al.*, 2005).

Scabin

Scabin es una enzima de un solo dominio de 22 kDa y 200 residuos producida y secretada por *S. scabiei* (Joshi *et al.*, 2010; Lyons *et al.*, 2010). Scabin es miembro de las toxinas bacterianas mono-ADP-ribosiltransferasa (mART), que comprenden una clase importante de factores de virulencia producidos por patógenos bacterianos (Simon *et al.*, 2014). Los objetivos celulares para las toxinas mART a menudo son reguladores claves de la función celular e incluyen (i) GTPasas, (ii) actina, (iii) reguladores de quinasas, (iv) factores de alargamiento, (v) motivos de reconocimiento de ARN e incluso ADN (genes blanco) (Palazzo *et al.*, 2017). Estas toxinas mART son enzimas que se unen a NAD⁺, escinden su enlace glucosídico (C-N) y transfieren ADP-ribosa a una macromolécula diana. Además, las toxinas mART poseen actividad de glucohidrolasa que aún no tiene una función biológica conocida (Yates & Merrill, 2005). La modificación covalente de la macromolécula diana (ADP-ribosilación) por las toxinas mART altera su función y puede actuar como un interruptor de activación y desactivación de la actividad (Simon *et al.*, 2014). Scabin comparte una identidad de aminoácidos del 40% con la familia de toxinas mART Pierisin que se distingue por su especificidad, donde la ADP-ribosa se transfiere a la base de guanina en el ADN, lo que lleva a la apoptosis de la célula huésped (Takamura-Enya *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1999). Scabin utiliza el ADN como sustrato, además de exhibir especificidad hacia el ADN genómico de los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*). Actualmente, el papel de esta proteína en la virulencia de *S. scabiei* está bajo investigación (Lugo *et al.*, 2018).

Enzimas que degradan polímeros vegetales

Las enzimas secretadas que degradan polímeros de plantas tales como celulasas, pectato liasas, lipasas y esterases son factores de virulencia conocidos en varias bacterias fitopatógenas. Estudios de genómica comparativa entre *Streptomyces* spp. patógenos y no patógenos revelaron la presencia de varios genes que codifican para enzimas de degradación de polímeros vegetales y al ser exclusivas de las especies patógenas, podrían contribuir a la virulencia de estos organismos (Huguet-Tapia *et al.*, 2016). Como se discutió anteriormente, existe evidencia de que la suberina estimula la producción de enzimas celulolíticas extracelulares por *S. scabiei* y que esto contribuye al inicio de la producción de taxtomina y la patogenicidad en este organismo (Padilla-Reynaud *et al.*, 2015). Además, un estudio realizado por Komeil y sus colaboradores mostró que la actividad esterasa extracelular se puede detectar en cultivos de polímeros vegetales que contienen *S. scabiei*, observándose la mayor actividad en presencia de suberina. Se detectaron dos genes que codifican suberinasas putativas, *estA* y *sub1*, en el genoma de *S. scabiei*, y aunque *estA* se expresó en presencia de diferentes polímeros vegetales, *sub1* solo se expresó en presencia de suberina o cutina (Komeil *et al.*, 2013). En particular, *sub1* (también llamado scab_78931) ha sido identificado como miembro del pato-genoma de *Streptomyces* debido a su conservación en diferentes especies patógenas y su ausencia en no patógenas (Huguet-Tapia *et al.*, 2016). Aunque previamente se había predicho que *sub1* codifica una cutinasa, es posible que la enzima codificada permita la degradación de la suberina para facilitar la penetración de la peridermis del tubérculo durante la infección por patógenos (Bignell *et al.*, 2010).

1.8 Control de la enfermedad

Aunque la sarna común de la papa fue descrita por primera vez hace más de 100 años los científicos aún tienen poca comprensión sobre los factores que contribuyen a la aparición y gravedad de la enfermedad (Braun *et al.*, 2017; Dees & Wanner, 2012; Loria *et al.*, 1997). Con respecto al patógeno, es necesario profundizar el conocimiento sobre la diversidad lo que es esencial para la selección del germoplasma resistente a sarna común además de las bases genéticas que conducen a diferencias de agresividad entre aislamientos. Con respecto a la planta, es necesario conocer sobre las bases fisiológicas o genéticas implicadas en las diferencias en resistencia/susceptibilidad de la enfermedad en diferentes cultivares de papa. Aún la fuente de resistencia a sarna común no ha sido identificada (Braun *et al.*, 2017; Dees & Wanner, 2012; Hosaka *et al.*, 2000). Los factores ambientales, tales como el pH, humedad y la flora microbiana del suelo, en combinación con el cultivar de papa y la virulencia del patógeno, hacen que el manejo de la SC sea una tarea difícil (Dees & wanner, 2012). Las prácticas de

manejo para controlar la enfermedad varían, e incluyen rotación de cultivos, variedades tolerantes, monitoreo del pH y la humedad en el suelo al principio de la tuberización, y la aplicación de plaguicidas al suelo y/o a la semilla (Tabla 1.1) (Braun *et al.*, 2017; Wanner & Kirk, 2015). Actualmente no existen medidas de control consistentemente confiables, excepto el uso de cultivares de papa resistentes. Sin embargo, no existe una resistencia/tolerancia completa en los cultivares de papa cultivados comercialmente, aunque existe una gran diversidad en la susceptibilidad a la SC. Se está avanzando en el desarrollo de cultivares más resistentes y hay varias líneas con una resistencia sustancialmente mejor (Haynes *et al.*, 2010). En los últimos años la atención se ha dirigido a la comunidad microbiana dentro del tubérculo y durante su desarrollo, cuya contribución es poco conocida en el inicio y desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Se ha demostrado que la comunidad microbiana endófito de los cultivares de papa difiere según los suelos (Kinkel *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2011). Los microorganismos presentes en los suelos difieren según las diferentes prácticas de labranza (Berg & Smalla, 2009; Larkin *et al.*, 2010; 2011; Peters *et al.*, 2004; Sessitsch *et al.*, 2004; Sturz *et al.*, 2005; Wiggins & Kinkel, 2005). Se han asociado cepas específicas de *Streptomyces* a campos supresores de SC (Lorang *et al.*, 1995; Neeno-Eckwall *et al.*, 2001). Actualmente las investigaciones se dirigen a la caracterización de comunidades microbianas de la rizósfera/endófitas dentro y durante el desarrollo del tubérculo que pueden correlacionarse con la susceptibilidad/resistencia a SC, proporcionando nuevas estrategias para avanzar hacia el control de la SC (Wanner & Kirk, 2015).

Tabla 1.1. Medidas de control de la sarna común y su efectividad. Tabla extraída y modificada de Wanner & Krik, 2015.

Medida de control	Eficacia
Papa semilla sin patógeno	Insuficiente; <i>Streptomyces</i> es endémico, ubicuo y es transmitido por el suelo
Tratamiento de semillas con productos químicos	Resultados erráticos
Bajo pH del suelo <5.2	Limita la rotación de cultivo; puede fallar
Alta humedad del suelo (Durante 4-5 semanas a partir del inicio del tubérculo)	A menudo falla
Fumigación química (PCNB, cloropicrina)	Funciona por una temporada; costoso
Rotación de cultivos o rotaciones largas	Ineficaz
Fertilizantes de azufre	Reduce la gravedad de la sarna en algunos lugares
Variedades de plantas resistentes	El método de control más confiable y rentable, pero no se conoce resistencia completa
Biocontrol	Necesita pruebas y validación

1.9 Antecedentes de Trabajo

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los tres cultivos alimentarios más importantes del mundo después del arroz y el trigo, y el primer cultivo hortícola en superficie cultivada en Uruguay (Devaux *et al.*, 2014; DIEA & MGAP, 2010; Haverkorta & Struikb, 2015). A partir de la aparición en el 2010 de un brote muy severo de sarna común en nuestro país, durante el cual los tubérculos de papa presentaron una sintomatología de una gravedad nunca antes registrada, provocando disminución de la calidad y pérdidas económicas (DIEA & MGAP, 2010; Grela *et al.*, 2010), quedó en evidencia el desconocimiento respecto a este tema y, en particular, de las cepas de *Streptomyces* patógenas presentes en nuestros suelos. En respuesta a la preocupación de los productores, se elaboró un proyecto presentado al Programa de Vinculación Universidad – Sociedad y Producción que fue financiado por CSIC-UdelaR (2011-2013). Como resultado se generó una colección de unas 300 cepas de *Streptomyces* aisladas a partir de tubérculos con síntomas y suelos con diferentes antecedentes de varias regiones paperas de nuestro país. Mediante ensayos de patogenicidad en papa se determinó que 70 cepas de la colección son patógenas. La detección por PCR de genes marcadores de patogenicidad, mostró la diversidad de combinaciones de éstos en las cepas, y resaltó un grupo de cepas en las cuales no se detectaron los genes asociados a la patogenicidad evaluados (Lapaz *et al.*, 2017). Se realizó la caracterización de los aislamientos mediante secuenciación del gen marcador taxonómico *rpoB* (subunidad β de las ARN polimerasa); *fingerprinting* rep-PCR; MLSA y *Multilocus Sequence Typing* (MLST), identificándose a algunas de las cepas como *S. scabies*, *S. europaeiscabiei* y *S. acidiscabies*. Estos trabajos constituyen el primer estudio extenso respecto a la presencia e identificación de *Streptomyces* patógenos asociados a la sarna común de la papa en Uruguay (Lapaz *et al.*, 2012, Lapaz, 2014; Lapaz *et al.*, 2017). Como resultado se generó una colección de *Streptomyces* diversa respecto a variabilidad genética y patogenicidad. Además se concluyó que el método MLSA sería el más efectivo para identificar especies de este género. Sin embargo, el método utilizado, basado en el secuenciado de cuatro genes *housekeeping* (*atpD*, *recA*, *rpoB* y *trpB*) no alcanzó a identificar algunas de las especies patógenas (Lapaz, 2014; Lapaz *et al.*, 2017).

Justificación

La sarna común es una enfermedad de relevancia en los cultivos de papa en todo el mundo. En los últimos años la aparición de patógenos emergentes de *Streptomyces* y su diseminación, entre otras razones debido a la globalización, hace necesario conocer la identidad y el potencial patogénico de cepas con diferente localización geográfica de forma de contribuir a su control. En trabajos previos se generó una colección de 70 cepas patógenas de *Streptomyces* aisladas de papa y suelo que poseen gran diversidad fenotípica y genotípica. En particular se caracterizó un grupo de cepas patógenas atípicas que no poseen los determinantes de patogenicidad conocidos. Dado que nuestro país es productor de papa, a la aparición reciente de patógenos emergentes del género *Streptomyces*, y que se cuenta con una colección diversa de este género, se hace imprescindible conocer el potencial patogénico de las cepas aisladas, los factores de virulencia que presentan, sean éstos los ya descritos o nuevos factores y su capacidad para realizar transferencia horizontal de genes de patogenicidad. Interesa además conocer si está presente en estas cepas la isla de patogenicidad descrita en *S. turgidiscabies* o remanentes de ésta que se han encontrado en otras especies y el potencial de transferencia del *cluster* de la fitotoxina taxtomina, único determinante de patogenicidad reconocido. Determinar la especies patógenas presentes, su variabilidad genética, así como los mecanismos de patogenicidad de las cepas causantes de sarna en la papa en nuestros suelos es una información indispensable para mejorar las estrategias de control de la enfermedad.

Objetivos y descripción de la tesis

Objetivo General

Dilucidar los determinantes de patogenicidad presentes en los aislamientos de *Streptomyces* patógenos de papa presentes en Uruguay, su potencial para la transferencia horizontal de genes y contribuir a una mejor identificación de este complejo de especies.

Objetivos específicos

1. Realizar un análisis genómico comparativo de cepas de *Streptomyces* patógenas de papa aisladas en Uruguay.
2. Determinar la capacidad de resolución inter-específica del método *Multi Locus Sequence Analysis* para la identificación de aislamientos de especies del género *Streptomyces*.
3. Completar la caracterización fenotípica y genotípica de la patogenicidad de las cepas de *Streptomyces* de la colección.

CAPÍTULO 1- Justificación, Objetivos y descripción de la tesis

4. Determinar el potencial de estas cepas para la transferencia horizontal de genes asociados a la patogenicidad.
5. Buscar e identificar nuevos factores de virulencia en cepas patógenas de papa del género *Streptomyces*.
6. Buscar e identificar potenciales *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios asociados a la patogenicidad.

Los primeros dos objetivos específicos se desarrollan en el Capítulo 2, donde se presentan los resultados del secuenciado y análisis comparativo de genomas representativos de la colección de *Streptomyces* patógenos aislados en Uruguay. También se presentan los análisis filogenómicos y los resultados obtenidos al incorporar el gen *gyrB* al método MLSA usado previamente en la identificación de especies del género *Streptomyces*. En el Capítulo 3, se desarrollan los objetivos específicos 3 y 4, donde se presentan los resultados de la caracterización genotípica y fenotípica de las cepas de la colección con respecto a la patogenicidad y el potencial que poseen para la transferencia horizontal de genes asociados a la virulencia. Por otro lado en el Capítulo 4 se presenta la búsqueda de nuevos factores de patogenicidad y la elucidación de un nuevo metabolito fitotóxico asociado a la patogenicidad. En el Capítulo 5, se desarrolla el objetivo específico 6, búsqueda de *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios asociados a la patogenicidad. Además se presenta la identificación del *cluster* del metabolito fitotóxico elucidado así como su rol en la patogenicidad de la cepa que lo produce mediante la generación de mutantes. Por último en este capítulo se realiza la búsqueda e identificación del *cluster* del metabolito fitotóxico en otras cepas patógenas secuenciadas en la base de datos y de la colección.

Bibliografía

- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., & Polz, M. F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Journal of bacteriology*, 186(9), 2629-2635.
- Achtman, M., & Wagner, M. (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 431.
- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press. Cap. 12: 675-674.
- Alam, M. T., Merlo, M. E., Takano, E., & Breitling, R. (2010). Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives. *Molecular phylogenetics and evolution*, 54(3), 763-772.
- Alfano, J. R. (2009). Roadmap for future research on plant pathogen effectors. *Molecular plant pathology*, 10(6), 805-813.
- Anderson, A. S., & Wellington, E. M. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 797-814.
- Babcock, M. J., Eckwall, E. C., & Schottel, J. L. (1993). Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *Microbiology*, 139(7), 1579-1586.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80(1), 1-43.
- Barry, S. M., Kers, J. A., Johnson, E. G., Song, L., Aston, P. R., Patel, B., ... & Challis, G. L. (2012). Cytochrome P450-catalyzed L-tryptophan nitration in thaxtomin phytotoxin biosynthesis. *Nature chemical biology*, 8(10), 814.
- Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 1-13.
- Bignell, D. R., Huguet-Tapia, J. C., Joshi, M. V., Pettis, G. S., & Loria, R. (2010). What does it take to be a plant pathogen: genomic insights from *Streptomyces* species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(2), 179-194.
- Bignell, D. R. D., Fyans, J. K., & Cheng, Z. (2014). Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *Journal of applied microbiology*, 116(2), 223-235.
- Bignell, D. R., Cheng, Z., & Bown, L. (2018). The coronafacoyl phytotoxins: structure, biosynthesis, regulation and biological activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(5), 649-666.
- Bischoff, V., Cookson, S. J., Wu, S., & Scheible, W. R. (2009). Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of experimental botany*, 60(3), 955-965.
- Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D., & Osbourn, A. (2002). A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature*, 418(6900), 889.
- Bouchek-Mechiche, K., Gardan, L., Normand, P., & Jouan, B. (2000). DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov.

- associated with netted scab. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 50(1), 91-99.
- Bown, L., Li, Y., Berru , F., Verhoeven, J. T., Dufour, S. C., & Bignell, D. R. (2017). Coronafacoyl phytotoxin biosynthesis and evolution in the common scab pathogen *Streptomyces scabiei*. Appl. Environ. Microbiol., 83(19), e01169-17.
- Bown, L., & Bignell, D. R. (2017b). Draft Genome Sequence of the Plant Pathogen *Streptomyces* sp. Strain 11-1-2. Genome Announc., 5(37), e00968-17.
- Braun, S., Gevens, A., Charkowski, A., Allen, C., & Jansky, S. (2017). Potato common scab: A review of the causal pathogens, management practices, varietal resistance screening methods, and host resistance. American Journal of Potato Research, 94(4), 283-296.
- Bukhalid, R. A., Chung, S. Y., & Loria, R. (1998). nec1, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. Molecular Plant-Microbe Interactions, 11(10), 960-967.
- Bukhalid, R. A., Takeuchi, T., Labeda, D., & Loria, R. (2002). Horizontal transfer of the plant virulence gene, nec1, and flanking sequences among genetically distinct *Streptomyces* strains in the Diastatochromogenes cluster. Appl. Environ. Microbiol., 68(2), 738-744.
- Burts, M. L., Williams, W. A., DeBord, K., & Missiakas, D. M. (2005). EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(4), 1169-1174.
- Cancino, L.S. (2003). Evaluación del daño causado por *Streptomyces scabies* (Thaxter) sobre tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* Hawkes.) durante el almacenaje. Chile: Universidad Austral de Chile. Tesis de grado.
- Cao, Z., Khodakaramian, G., Arakawa, K., & Kinashi, H. (2012). Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 76(2), 353-357.
- Castillo-Lizardo, M. G., Aragón, I. M., Carvajal, V., Matas, I. M., Pérez-Bueno, M. L., Gallegos, M. T., ... & Ramos, C. (2015). Contribution of the non-effector members of the HrpL regulon, iaaL and matE, to the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in tomato plants. BMC microbiology, 15(1), 165.
- Chamberlain, K., & Crawford, D. L. (2000). Thatch biodegradation and antifungal activities of two lignocellulolytic *Streptomyces* strains in laboratory cultures and in golf green turfgrass. Canadian journal of microbiology, 46(6), 550-558.
- Chang, J. H., Desveaux, D., & Creason, A. L. (2014). The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in plant pathogenesis. Annual review of phytopathology, 52, 317-345.
- Chapleau, M., Guertin, J. F., Farrokhi, A., Lerat, S., Burrus, V., & Beaulieu, C. (2016). Identification of genetic and environmental factors stimulating excision from *Streptomyces scabiei* chromosome of the toxicogenic region responsible for pathogenicity. Molecular plant pathology, 17(4), 501-509.
- Chater, K. F. (1972). A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. Microbiology, 72(1), 9-28.

- Chater, K. F., Biro, S., Lee, K. J., Palmer, T., & Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), 171-198.
- Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Research*, 5.
- Cheng, K., Rong, X., & Huang, Y. (2016). Widespread interspecies homologous recombination reveals reticulate evolution within the genus *Streptomyces*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 102, 246-254.
- Cheng, Z., Bown, L., Piercey, B., & Bignell, D. R. (2019). Positive and negative regulation of the virulence-associated coronafacoyl phytotoxin in the potato common scab pathogen *Streptomyces scabies*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, (ja).
- Claessen, D., Rozen, D. E., Kuipers, O. P., Søgaaard-Andersen, L., & Van Wezel, G. P. (2014). Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nature Reviews Microbiology*, 12(2), 115.
- Dees, M. W., & Wanner, L. A. (2012). In search of better management of potato common scab. *Potato research*, 55(3-4), 249-268.
- Dees, M. W., Sletten, A., & Hermansen, A. (2013). Isolation and characterization of *Streptomyces* species from potato common scab lesions in Norway. *Plant pathology*, 62(1), 217-225.
- Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R., & Henderson, I. R. (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends in microbiology*, 17(4), 139-145.
- Devaux, A., Kromann, P., & Ortiz, O. (2014). Potatoes for sustainable global food security. *Potato Research*, 57(3-4), 185-199.
- DIEA, MGAP, 2010. Estadísticas Agropecuarias. Encuesta de Papa. N° 297. [[http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,111,0,S,0,MNU;E;42;7;MNU;,"](http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,111,0,S,0,MNU;E;42;7;MNU;,)]. Accedido el 20 de Junio de 2011.
- Doroghazi, J. R., & Buckley, D. H. (2010). Widespread homologous recombination within and between *Streptomyces* species. *The ISME journal*, 4(9), 1136.
- Duval, I., & Beaudoin, N. (2009). Transcriptional profiling in response to inhibition of cellulose synthesis by thaxtomin A and isoxaben in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant cell reports*, 28(5), 811-830.
- Eason, J. R., Morris, R. O., & Jameson, P. E. (1996). The relationship between virulence and cytokinin production by *Rhodococcus fascians* (Tilford 1936) Goodfellow 1984. *Plant Pathology*, 45(2), 323-331.
- Elliot, M. A., Buttner, M. J., & Nodwell, J. R. (2008). Multicellular development in *Streptomyces*. *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation*, 419, 438.
- Errakhi, R., Dauphin, A., Meimoun, P., Lehner, A., Reboutier, D., Vatsa, P., ... & Wendehenne, D. (2008). An early Ca²⁺ influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4259-4270.
- Faucher, E., Savard, T., & Beaulieu, C. (1992). Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 14(3), 197-202.

- Fernández, M., & Sánchez, J. (2002). Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451. *Microbiology*, 148(2), 405-412.
- Flores-González, R., Velasco, I., & Montes, F. (2008). Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. *Plant pathology*, 57(1), 162-169.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., ... & Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature chemical biology*, 5(5), 344.
- Francis, I. M., Jourdan, S., Fanara, S., Loria, R., & Rigali, S. (2015). The cellobiose sensor CebR is the gatekeeper of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *MBio*, 6(2), e02018-14.
- Fry, B. A., & Loria, R. (2002). Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(1), 1-8.
- Fyans, J. K., Bignell, D., Loria, R., Toth, I., & Palmer, T. (2013). The ESX/type VII secretion system modulates development, but not virulence, of the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *Molecular plant pathology*, 14(2), 119-130.
- Fyans, J. K., Altowairish, M. S., Li, Y., & Bignell, D. R. (2015). Characterization of the coronatine-like phytotoxins produced by the common scab pathogen *Streptomyces scabies*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(4), 443-454.
- Fyans, J. K., Bown, L., & Bignell, D. R. (2016). Isolation and characterization of plant-pathogenic *Streptomyces* species associated with common scab-infected potato tubers in Newfoundland. *Phytopathology*, 106(2), 123-131.
- Geng, X., Cheng, J., Gangadharan, A., & Mackey, D. (2012). The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of Arabidopsis defense. *The Plant Cell*, 24(11), 4763-4774.
- Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and applied microbiology*, 38(4), 237-245.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205-227.
- Goethals, K., Vereecke, D., Jaziri, M., Van Montagu, M., & Holsters, M. (2001). Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 27-52.
- Gong, C., Yang, M. P., Yu, D. C., Du, W. F., Song, S. W., Wang, R. X., ... & Jiang, S. Y. (2017). First report of *Streptomyces caviscabies* causing common scab on potato in China. *Plant Disease*, 101(7), 1316-1316.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), 81-91.
- Gouws, R. (2006). Etiology and integrated control of common scab on seed potatoes in South Africa. South Africa: University of Pretoria, Master's Thesis.
- Goyer, C., Faucher, E., & Beaulieu, C. (1996). *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Québec, Canada. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(3), 635-639.

- Goyer, C., Vachon, J., & Beaulieu, C. (1998). Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology*, 88(5), 442-445.
- Grela, A., Caubet, E., Proto, J.A. (2010). Informe de situación calidad de la semilla importada. [http://www.ansepa.com.uy/userfiles/informacion/items/126_pdf.pdf] Accedido el 6 de diciembre de 2010.
- Gröschel, M. I., Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L., & Brosch, R. (2016). ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nature Reviews Microbiology*, 14(11), 677.
- Guan, D., Grau, B. L., Clark, C. A., Taylor, C. M., Loria, R., & Pettis, G. S. (2012). Evidence that thaxtomin C is a pathogenicity determinant of *Streptomyces ipomoeae*, the causative agent of *Streptomyces* soil rot disease of sweet potato. *Molecular plant-microbe interactions*, 25(3), 393-401.
- Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., & Huang, Y. (2008). A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(1), 149-159.
- Han, L., Dutilleul, P., Prasher, S. O., Beaulieu, C., & Smith, D. L. (2008). Assessment of common scab-inducing pathogen effects on potato underground organs via computed tomography scanning. *Phytopathology*, 98(10), 1118-1125.
- Han, J. H., Cho, M. H., & Kim, S. B. (2012). Ribosomal and protein coding gene based multigene phylogeny on the family *Streptomycetaceae*. *Systematic and applied microbiology*, 35(1), 1-6.
- Hao, J. J., Meng, Q. X., Yin, J. F., & Kirk, W. W. (2009). Characterization of a new *Streptomyces* strain, DS3024, that causes potato common scab. *Plant disease*, 93(12), 1329-1334.
- Haverkort, A. J., & Struik, P. C. (2015). Yield levels of potato crops: recent achievements and future prospects. *Field Crops Research*, 182, 76-85.
- Haynes, K. G., Wanner, L. A., Thill, C. A., Bradeen, J. M., Miller, J., Novy, R. G., ... & Vinyard, B. T. (2010). Common scab trials of potato varieties and advanced selections at three US locations. *American Journal of Potato Research*, 87(3), 261-276.
- Healy, F. G., Wach, M., Krasnoff, S. B., Gibson, D. M., & Loria, R. (2000). The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Molecular microbiology*, 38(4), 794-804.
- Healy, F. G., Krasnoff, S. B., Wach, M., Gibson, D. M., & Loria, R. (2002). Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. *Journal of bacteriology*, 184(7), 2019-2029.
- Hiltunen, L. H., Kelloniemi, J., & Valkonen, J. P. T. (2014). First report of *Streptomyces europaeiscabiei* causing common scab on potato in Finland. *Plant disease*, 98(9), 1267-1267.
- Hogenhout, S. A., & Loria, R. (2008). Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current opinion in plant biology*, 11(4), 449-456.
- Hosaka, K., Matsunaga, H., & Senda, K. (2000). Evaluation of several wild tuber-bearing *Solanum* species for scab resistance. *American journal of potato research*, 77(1), 41-45.
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S. M., Chen, B., Chen, M., Dai, A. Z., Morin, P. M., ... & Eisenberg, D. (2003). The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guerin is a loss of secreted lytic function

- required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12420-12425.
- Hsu, S. (2010). IAA production by *Streptomyces scabies* and its role in plant microbe interaction.
- Huang, C. H., Lin, Y. S., Yang, Y. L., Huang, S. W., & Chen, C. W. (1998). The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Molecular microbiology*, 28(5), 905-916.
- Huguet-Tapia, J. C., Bignell, D. R., & Loria, R. (2014). Characterization of the integration and modular excision of the integrative conjugative element PAIS in *Streptomyces turgidiscabies* Car8. *PloS one*, 9(6), e99345.
- Huguet-Tapia, J. C., Lefebure, T., Badger, J. H., Guan, D., Pettis, G. S., Stanhope, M. J., & Loria, R. (2016). Genome content and phylogenomics reveal both ancestral and lateral evolutionary pathways in plant-pathogenic *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(7), 2146-2155.
- Janssen, P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(3), 1719-1728.
- Jiang, G., Zuo, R., Zhang, Y., Powell, M. M., Zhang, P., Hylton, S. M., ... & Ding, Y. (2018). One-pot biocombinatorial synthesis of herbicidal thaxtomins. *ACS Catalysis*, 8(11), 10761-10768.
- Johnson, E. G., Joshi, M. V., Gibson, D. M., & Loria, R. (2007). Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-causing *Streptomyces* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(1-3), 18-25.
- Johnson, E. G., Krasnoff, S. B., Bignell, D. R., Chung, W. C., Tao, T., Parry, R. J., ... & Gibson, D. M. (2009). 4-Nitrotryptophan is a substrate for the non-ribosomal peptide synthetase TxtB in the thaxtomin A biosynthetic pathway. *Molecular microbiology*, 73(3), 409-418.
- Joshi, M., Rong, X., Moll, S., Kers, J., Franco, C., & Loria, R. (2007a). *Streptomyces turgidiscabies* secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(6), 599-608.
- Joshi, M. V., & Loria, R. (2007b). *Streptomyces turgidiscabies* possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(7), 751-758.
- Joshi, M. V., Mann, S. G., Antelmann, H., Widdick, D. A., Fyans, J. K., Chandra, G., ... & Palmer, T. (2010). The twin arginine protein transport pathway exports multiple virulence proteins in the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *Molecular microbiology*, 77(1), 252-271.
- Jourdan, S., Francis, I. M., Kim, M. J., Salazar, J. J. C., Planckaert, S., Frère, J. M., ... & Rigali, S. (2016a). The CebE/MsiK transporter is a doorway to the cello-oligosaccharide-mediated induction of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Scientific reports*, 6, 27144.
- Jordaan, E., & Van der Waals, J. E. (2016b). *Streptomyces* species associated with common scab lesions of potatoes in South Africa. *European journal of plant pathology*, 144(3), 631-643.
- Jourdan, S., Francis, I. M., Deflandre, B., Loria, R., & Rigali, S. (2017). Tracking the subtle mutations driving host sensing by the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *mSphere*, 2(2), e00367-16.

- Katsir, L., Schillmiller, A. L., Staswick, P. E., He, S. Y., & Howe, G. A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), 7100-7105.
- Kaup, O., Gräfen, I., Zellermann, E. M., Eichenlaub, R., & Gartemann, K. H. (2005). Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(10), 1090-1098.
- Kers, J. A., Cameron, K. D., Joshi, M. V., Bukhalid, R. A., Morello, J. E., Wach, M. J., ... & Loria, R. (2005). A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Molecular microbiology*, 55(4), 1025-1033.
- Kers, J. A., Wach, M. J., Krasnoff, S. B., Widom, J., Cameron, K. D., Bukhalid, R. A., ... & Loria, R. (2004). Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature*, 429(6987), 79.
- Khatri, B. B., Tegg, R. S., Brown, P. H., & Wilson, C. R. (2011). Temporal association of potato tuber development with susceptibility to common scab and *Streptomyces scabiei*-induced responses in the potato periderm. *Plant Pathology*, 60(4), 776-786.
- Kim, I. S., Kang, S. G., & Lee, K. J. (1995). Physiological importance of trypsin-like protease during morphological differentiation of streptomycetes. *The Journal of Microbiology*, 33(4), 315-321.
- Kim, B. J., Kim, C. J., Chun, J., Koh, Y. H., Lee, S. H., Hyun, J. W., ... & Kook, Y. H. (2004). Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (rpoB) sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(2), 593-598.
- Kim, J. N., Kim, Y., Jeong, Y., Roe, J. H., Kim, B. G., & Cho, B. K. (2015). Comparative genomics reveals the core and accessory genomes of *Streptomyces* species. *J Microbiol Biotechnol*, 25(10), 1599-605.
- Kinashi, H., Someno, K., & Sakaguchi, K. (1984). Isolation and characterization of concanamycins A, B and C. *The Journal of antibiotics*, 37(11), 1333-1343.
- King, R. R., Lawrence, C. H., Clark, M. C., & Calhoun, L. A. (1989). Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (13), 849-850.
- King, R. R., Lawrence, C. H., & Clark, M. C. (1991). Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. *American Potato Journal*, 68(10), 675-680.
- King, R. R., Lawrence, C. H., Calhoun, L. A., & Ristaino, J. B. (1994). Isolation and characterization of thaxtomin-type phytotoxins associated with *Streptomyces ipomoeae*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(8), 1791-1794.
- King, R. R., & Calhoun, L. A. (2009). The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 70(7), 833-841.
- Kinkel, L. L., Bowers, J. H., Shimizu, K., Neeno-Eckwall, E. C., & Schottel, J. L. (1998). Quantitative relationships among thaxtomin A production, potato scab severity, and fatty acid composition in *Streptomyces*. *Canadian journal of microbiology*, 44(8), 768-776.

- Kinkel, L. L., Schlatter, D. C., Bakker, M. G., & Arenz, B. E. (2012). *Streptomyces* competition and co-evolution in relation to plant disease suppression. *Research in microbiology*, 163(8), 490-499.
- Komeil, D., Simao-Beaunoir, A. M., & Beaulieu, C. (2013). Detection of potential suberinase-encoding genes in *Streptomyces scabiei* strains and other actinobacteria. *Canadian journal of microbiology*, 59(5), 294-303.
- Labeda, D. P., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A. C., Lanoot, B., Vannanneyt, M., ... & Tamura, T. (2012). Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(1), 73-104.
- Lambert, D. H., & Loria, R. (1989a). *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(4), 387-392.
- Lambert, D. H., & Loria, R. (1989b). *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(4), 393-396.
- Lapaz, M. I., Verdier, E., & Pianzzola, M. J. (2012). First report regarding potato scab caused by *Streptomyces acidiscabies* in Uruguay. *Plant disease*, 96(7), 1064-1064.
- Lapaz, M. I. (2014). Estudio de las cepas de *Streptomyces* spp. causantes de sarna común en la papa en Uruguay. Tesis de Maestría.
- Lapaz, M. I., Huguet-Tapia, J. C., Siri, M. I., Verdier, E., Loria, R., & Pianzzola, M. J. (2017). Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant disease*, 101(8), 1362-1372.
- Larkin, R. P., Griffin, T. S., & Honeycutt, C. W. (2010). Rotation and cover crop effects on soilborne potato diseases, tuber yield, and soil microbial communities. *Plant Disease*, 94(12), 1491-1502.
- Larkin, R. P., Honeycutt, C. W., Griffin, T. S., Olanya, O. M., Halloran, J. M., & He, Z. (2011). Effects of different potato cropping system approaches and water management on soilborne diseases and soil microbial communities. *Phytopathology*, 101(1), 58-67.
- Lauzier, A., Simao-Beaunoir, A. M., Bourassa, S., Poirier, G. G., Talbot, B., & Beaulieu, C. (2008). Effect of potato suberin on *Streptomyces scabies* proteome. *Molecular plant pathology*, 9(6), 753-762.
- Law, J. W. F., Tan, K. X., Wong, S. H., Ab Mutalib, N. S., & Lee, L. H. (2018). Taxonomic and characterization methods of *Streptomyces*: a review. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 1(1).
- Lawrence, C. H., Clark, M. C., & King, R. R. (1990). Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology*, 80(7), 606-608.
- Legault, G. S., Lerat, S., Nicolas, P., & Beaulieu, C. (2011). Tryptophan regulates thaxtomin A and indole-3-acetic acid production in *Streptomyces scabiei* and modifies its interactions with radish seedlings. *Phytopathology*, 101(9), 1045-1051.
- Lee, L. H., Zainal, N., Azman, A. S., Eng, S. K., Goh, B. H., Yin, W. F., ... & Chan, K. G. (2014). Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Lehtonen, M. J., Rantala, H., Kreuze, J. F., Bång, H., Kuisma, L., Koski, P., ... & Valkonen, J. P. T. (2004). Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant pathology*, 53(3), 280-287.

- Leiminger, J., Frank, M., Wenk, C., Poschenrieder, G., Kellermann, A., & Schwarzfischer, A. (2013). Distribution and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Germany. *Plant Pathology*, 62(3), 611-623.
- Lerat, S., Forest, M., Lauzier, A., Grondin, G., Lacelle, S., & Beaulieu, C. (2009). Potato suberin induces differentiation and secondary metabolism in the genus *Streptomyces*. *Microbes and environments*, 1111240331-1111240331.
- Lerat, S., Simao-Beaunoir, A. M., Wu, R., Beaudoin, N., & Beaulieu, C. (2010). Involvement of the plant polymer suberin and the disaccharide cellobiose in triggering thaxtomin A biosynthesis, a phytotoxin produced by the pathogenic agent *Streptomyces scabies*. *Phytopathology*, 100(1), 91-96.
- Li, Y., Liu, J., Díaz-Cruz, G., Cheng, Z., & Bignell, D. R. (2019a). Virulence mechanisms of plant-pathogenic *Streptomyces* species: an updated review. *Microbiology*.
- Li, Y., Liu, J., Adekunle, D., Bown, L., Tahlan, K., & Bignell, D. R. (2019b). TxtH is a key component of the thaxtomin biosynthetic machinery in the potato common scab pathogen *Streptomyces scabies*. *Molecular plant pathology*.
- Lin, C. Y., Ni, H. F., & Huang, C. W. (2018). First Report of Common Scab on Potato Caused by *Streptomyces europaeiscabiei* in Taiwan. *Plant disease*, 102(4), 818-818.
- Lindholm, P., Kortemaa, H., Kokkola, M., Haahtela, K., Salkinoja-Salonen, M., & Valkonen, J. P. (1997). *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. *Plant Disease*, 81(11), 1317-1322.
- Locci, R. (1994). Actinomycetes as plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 100(3-4), 179-200.
- Lorang, J. M., Liu, D., Anderson, N. A., & Schottel, J. L. (1995). Identification of potato scab inducing and suppressive species of *Streptomyces*. *Phytopathology*, 85(3), 261-268.
- Loria, R., Bukhalid, R. A., Creath, R. A., Leiner, R. H., Olivier, M., & Steffens, J. C. (1995). Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species in vitro. *Phytopathology*, 85(5), 537-541.
- Loria, R., Bukhalid, R. A., Fry, B. A., & King, R. R. (1997). Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease*, 81(8), 836-846.
- Loria, R., Coombs, J., Yoshida, M., Kers, J., & Bukhalid, R. (2003). A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(2), 65-72.
- Loria, R., Kers, J., & Joshi, M. (2006). Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 469-487.
- Lugo, M. R., Lyons, B., Lento, C., Wilson, D. J., & Merrill, A. R. (2018). Dynamics of Scabin toxin. A proposal for the binding mode of the DNA substrate. *PloS one*, 13(3), e0194425.
- Lyons, B., Ravulapalli, R., Lanoue, J., Lugo, M. R., Dutta, D., Carlin, S., & Merrill, A. R. (2016). Scabin, a novel DNA-acting ADP-ribosyltransferase from *Streptomyces scabies*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(21), 11198-11215.

- Ma, K. W., & Ma, W. (2016). Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. *Plant molecular biology*, 91(6), 713-725.
- Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., & Göker, M. (2014). Taxonomic use of DNA G+ C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(2), 352-356.
- Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 101-122.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., ... & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100.
- Méndez, C., Brana, A. F., Manzanal, M. B., & Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Canadian journal of microbiology*, 31(5), 446-450.
- Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of cell biology*, 145(3), 515-525.
- Miyajima, K., Tanaka, F., Takeuchi, T., & Kuninaga, S. (1998). *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 495-502.
- Mun, H. S., Oh, E. J., Kim, H. J., Lee, K. H., Koh, Y. H., Kim, C. J., ... & Kim, B. J. (2007). Differentiation of *Streptomyces* spp. which cause potato scab disease on the basis of partial *rpoB* gene sequences. *Systematic and applied microbiology*, 30(5), 401-407.
- Natsume, M., Ryu, R., & Abe, H. (1996). Production of phytotoxins, concanamycins A and B by *Streptomyces* spp. causing potato scab. *Japanese Journal of Phytopathology*, 62(4), 411-413.
- Natsume, M., Yamada, A., Tashiro, N., & Abe, H. (1998). Differential production of the phytotoxins thaxtomin A and concanamycins A and B by potato common scab-causing *Streptomyces* spp. *Japanese Journal of Phytopathology*, 64(3), 202-204.
- Natsume, M., Mizuto, T. A. K. I., Tashiro, N., & Hiroshi, A. B. E. (2001). Phytotoxin production and aerial mycelium formation by *Streptomyces scabies* and *S. acidiscabies* in vitro. *Journal of general plant pathology*, 67(4), 299-302.
- Natsume, M., Komiya, M., Koyanagi, F., Tashiro, N., Kawaide, H., & Abe, H. (2005). Phytotoxin produced by *Streptomyces* sp. causing potato russet scab in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 71(5), 364-369.
- Natsume, M., Tashiro, N., Doi, A., Nishi, Y., & Kawaide, H. (2017). Effects of concanamycins produced by *Streptomyces scabies* on lesion type of common scab of potato. *Journal of general plant pathology*, 83(2), 78-82.
- Natsume, M., Nagagata, A., Aittamaa, M., Okaniwa, N., Somervuo, P., Fiedler, H. P., ... & Valkonen, J. P. (2018). Phytotoxin produced by the netted scab pathogen, *Streptomyces turgidiscabies* strain 65, isolated in Sweden. *Journal of general plant pathology*, 84(2), 108-117.
- Neeno-Eckwall, E. C., Kinkel, L. L., & Schottel, J. L. (2001). Competition and antibiosis in the biological control of potato scab. *Canadian journal of microbiology*, 47(4), 332-340.

- Nett, M., Ikeda, H., & Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural product reports*, 26(11), 1362-1384.
- Ndowora, T. C. R., Kinkel, L. L., Jones, R. K., & Anderson, N. A. (1996). Fatty acid analysis of pathogenic and suppressive strains of *Streptomyces* species isolated in Minnesota. *Phytopathology*, 86(2), 138-143.
- Padilla-Reynaud, R., Simao-Beaunoir, A. M., Lerat, S., Bernards, M. A., & Beaulieu, C. (2015). Suberin regulates the production of cellulolytic enzymes in *Streptomyces scabiei*, the causal agent of potato common scab. *Microbes and environments*, ME15034.
- Palazzo, L., Mikoč, A., & Ahel, I. (2017). ADP-ribosylation: new facets of an ancient modification. *The FEBS journal*, 284(18), 2932-2946.
- Park, D. H., Kim, J. S., Kwon, S. W., Wilson, C., Yu, Y. M., Hur, J. H., & Lim, C. K. (2003). *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 2049-2054.
- Patten, C. L., Blakney, A. J., & Coulson, T. J. (2013). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 39(4), 395-415.
- Pertry, I., Václavíková, K., Depuydt, S., Galuszka, P., Spíchal, L., Temmerman, W., ... & Strnad, M. (2009). Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 929-934.
- Peters, R. D., Sturz, A. V., Carter, M. R., & Sanderson, J. B. (2004). Influence of crop rotation and conservation tillage practices on the severity of soil-borne potato diseases in temperate humid agriculture. *Canadian Journal of Soil Science*, 84(4), 397-402.
- Powelson, M. L., & Rowe, R. C. (2008). Managing diseases caused by seedborne and soilborne fungi and fungus-like pathogens. *Potato health management*, 2183-2195.
- Pym, A. S., Brodin, P., Majlessi, L., Brosch, R., Demangel, C., Williams, A., ... & Cole, S. T. (2003). Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nature medicine*, 9(5), 533.
- Rigali, S., Nothaft, H., Noens, E. E., Schlicht, M., Colson, S., Müller, M., ... & Van Wezel, G. P. (2006). The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molecular microbiology*, 61(5), 1237-1251.
- Rong, X., Guo, Y., & Huang, Y. (2009). Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. *solvifaciens*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(5), 314-322.
- Rong, X., & Huang, Y. (2010). Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(3), 696-703.

- Rong, X., & Huang, Y. (2012). Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Systematic and applied microbiology*, 35(1), 7-18.
- Rong, X., Doroghazi, J. R., Cheng, K., Zhang, L., Buckley, D. H., & Huang, Y. (2013). Classification of *Streptomyces* phylogroup pratensis (Doroghazi and Buckley, 2010) based on genetic and phenotypic evidence, and proposal of *Streptomyces pratensis* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 36(6), 401-407.
- Sarwar, A., Latif, Z., & Cabaleiro, C. (2017). First report of *Streptomyces turgidiscabies* causing potato common scab in Spain. *Plant Disease*, 101(9), 1671-1671.
- Sarwar, A., Latif, Z., & Cabaleiro, C. (2018). First report of *Streptomyces bottropensis* causing potato common scab in Galicia, Spain. *Plant disease*, 102(7), 1445.
- Seipke, R. F., & Loria, R. (2008). *Streptomyces scabies* 87-22 possesses a functional tomatinase. *Journal of bacteriology*, 190(23), 7684-7692.
- Seipke, R. F., Kaltenpoth, M., & Hutchings, M. I. (2012). *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme?. *FEMS microbiology reviews*, 36(4), 862-876.
- Ser, H. L., Tan, L. T. H., Paanisamy, U. D., Abd Malek, S. N., Yin, W. F., Chan, K. G., ... & Lee, L. H. (2016). *Streptomyces antioxidans* sp. nov., a novel mangrove soil actinobacterium with antioxidative and neuroprotective potentials. *Frontiers in microbiology*, 7, 899.
- Sessitsch, A., Reiter, B., & Berg, G. (2004). Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian journal of microbiology*, 50(4), 239-249.
- Scheible, W. R., Fry, B., Kochevenko, A., Schindelasch, D., Zimmerli, L., Somerville, S., ... & Somerville, C. R. (2003). An *Arabidopsis* mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. *The Plant Cell*, 15(8), 1781-1794.
- Shirling, E. T., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*, 16(3), 313-340.
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1968). Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* III. Additional species descriptions from first and second studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 18(4), 279-392.
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1969). Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 19(4), 391-512.
- Sibbald, M. J. B., Ziebandt, A. K., Engelmann, S., Hecker, M., De Jong, A., Harmsen, H. J. M., ... & Van Dijk, J. M. (2006). Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(3), 755-788.
- Simon, N. C., Aktories, K., & Barbieri, J. T. (2014). Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. *Nature reviews Microbiology*, 12(9), 599.
- Song, J., Lee, S. C., Kang, J. W., Baek, H. J., & Suh, J. W. (2004). Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S–23S rDNA

- internally transcribed spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 203-209.
- Stanley, S. A., Raghavan, S., Hwang, W. W., & Cox, J. S. (2003). Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 13001-13006.
- St-Onge, R., Goyer, C., Coffin, R., & Fillion, M. (2008). Genetic diversity of *Streptomyces* spp. causing common scab of potato in eastern Canada. *Systematic and applied microbiology*, 31(6-8), 474-484.
- Sturz, A. V., Peters, R. D., Carter, M. R., Sanderson, J. B., Matheson, B. G., & Christie, B. R. (2005). Variation in antibiosis ability, against potato pathogens, of bacterial communities recovered from the endo-and exoroots of potato crops produced under conventional versus minimum tillage systems. *Canadian journal of microbiology*, 51(8), 643-654.
- Takamura-Enya, T., Watanabe, M., Totsuka, Y., Kanazawa, T., Matsushima-Hibiya, Y., Koyama, K., ... & Wakabayashi, K. (2001). Mono (ADP-ribosyl) ation of 2'-deoxyguanosine residue in DNA by an apoptosis-inducing protein, pierisin-1, from cabbage butterfly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12414-12419.
- Tan, L. T. H., Chan, K. G., Khan, T. M., Bukhari, S. I., Saokaew, S., Duangjai, A., ... & Goh, B. H. (2017). *Streptomyces* sp. MUM212 as a source of antioxidants with radical scavenging and metal chelating properties. *Frontiers in pharmacology*, 8, 276.
- Tegg, R. S., Melian, L., Wilson, C. R., & Shabala, S. (2005). Plant cell growth and ion flux responses to the streptomycete phytotoxin thaxtomin A: calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. *Plant and Cell Physiology*, 46(4), 638-648.
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in plant science*, 17(5), 260-270.
- Thapa, S. P., Davis, E. W., Lyu, Q., Weisberg, A. J., Stevens, D. M., Clarke, C. R., ... & Chang, J. H. (2019). The Evolution, Ecology, and Mechanisms of Infection by Gram-Positive, Plant-Associated Bacteria. *Annual review of phytopathology*, 57.
- Thwaites, R., Wale, S. J., Nelson, D., Munday, D., & Elphinstone, J. G. (2010). *Streptomyces turgidiscabies* and *S. acidiscabies*: two new causal agents of common scab of potato (*Solanum tuberosum*) in the UK. *Plant Pathology*, 59(4), 804-804.
- Tomihama, T., Nishi, Y., Sakai, M., Ikenaga, M., Okubo, T., & Ikeda, S. (2016). Draft genome sequences of *Streptomyces scabiei* S58, *Streptomyces turgidiscabies* T45, and *Streptomyces acidiscabies* a10, the pathogens of potato common scab, isolated in Japan. *Genome Announc.*, 4(2), e00062-16.
- Tóth, L., Maeda, M., Tanaka, F., & et al. (2001). Isolation and identification of pathogenic strains of *Streptomyces acidiscabies* from netted scab lesions of potato tubers in Hokkaido (Japan). *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 48(3-4), 575-585.
- Volff, J. N., & Altenbuchner, J. (1998). Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Molecular microbiology*, 27(2), 239-246.
- Wanner, L. A. (2004). Field isolates of *Streptomyces* differ in pathogenicity and virulence on radish. *Plant disease*, 88(8), 785-796.

- Wanner, L. A. (2006). A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. *Phytopathology*, 96(12), 1363-1371.
- Wanner, L. A. (2007). A new strain of *Streptomyces* causing common scab in potato. *Plant Disease*, 91(4), 352-359.
- Wanner, L. A. (2009). A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. *American Journal of Potato Research*, 86(4), 247-264.
- Wanner, L. A., & Kirk, W. W. (2015). *Streptomyces*—from basic microbiology to role as a plant pathogen. *American Journal of Potato Research*, 92(2), 236-242.
- Watanabe, M., Kono, T., Matsushima-Hibiya, Y., Kanazawa, T., Nishisaka, N., Kishimoto, T., ... & Wakabayashi, K. (1999). Molecular cloning of an apoptosis-inducing protein, pierisin, from cabbage butterfly: possible involvement of ADP-ribosylation in its activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(19), 10608-10613.
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. *Archives of microbiology*, 176(5), 386-390.
- Widdick, D. A., Dilks, K., Chandra, G., Bottrill, A., Naldrett, M., Pohlschröder, M., & Palmer, T. (2006). The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47), 17927-17932.
- Wiggins, B. E., & Kinkel, L. L. (2005). Green manures and crop sequences influence potato diseases and pathogen inhibitory activity of indigenous streptomycetes. *Phytopathology*, 95(2), 178-185.
- Wildermuth, H., & Hopwood, D. A. (1970). Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*, 60(1), 51-59.
- Xin, X. F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual review of phytopathology*, 51, 473-498.
- Yates, S. P., & Merrill, A. R. (2005). Characterization of oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) analogues using a high-pressure-liquid-chromatography-based NAD⁺-glycohydrolase assay and comparison with fluorescence-based measurements. *Analytical biochemistry*, 340(1), 41-51.
- Zhang, Y., Bignell, D. R., Zuo, R., Fan, Q., Huguet-Tapia, J. C., Ding, Y., & Loria, R. (2016). Promiscuous Pathogenicity Islands and Phylogeny of Pathogenic *Streptomyces* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(8), 640-650.
- Zhang, Y., & Loria, R. (2017). Emergence of novel pathogenic *Streptomyces* species by site-specific accretion and cis-mobilization of pathogenicity islands. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(1), 72-82.
- Zhang, Y., Jiang, G., Ding, Y., & Loria, R. (2018). Genetic background affects pathogenicity island function and pathogen emergence in *Streptomyces*. *Molecular plant pathology*, 19(7), 1733-1741.
- Zhao, W. Q., Yu, X. M., & Liu, D. Q. (2010). First report of *Streptomyces acidiscabies* causing potato scab in China. *Plant Pathology*, 59(2).

Zhou, B., Zhang, M. S., & Ma, X. K. (2017). First report of *Streptomyces bottropensis* causing potato common scab in Hebei Province, China. *Plant Disease*, 101(3), 502-502.

CAPÍTULO 2

Análisis genómico comparativo y filogenético de cepas de *Streptomyces* spp. causantes de sarna común en la papa en Uruguay

Parte del contenido de este capítulo está publicado en:

Lapaz, M. I., Huguet-Tapia, J. C., Siri, M. I., Verdier, E., Loria, R., & Pianzola, M. J. (2017). Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant disease*, 101(8), 1362-1372.

Lapaz, M. I., López, A., Huguet-Tapia, J. C., Pérez-Baldassari, M. F., Iglesias, C., Loria, R., ... & Pianzola, M. J. (2018). Isolation and structural characterization of a non-diketopiperazine phytotoxin from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. *Natural product research*, 33(20), 2951-2957.

Introducción

El género *Streptomyces* integra el orden Actinomycetales y se caracteriza por tener una espectacular diversidad en morfología, tamaño del genoma, contenido GC y secuencias codificantes. Las bacterias del género *Streptomyces* poseen un cromosoma lineal y de gran tamaño, entre 8.5-12 Mb con un alto contenido GC, entre 67-78% (Law *et al.*, 2018). Las cepas de este género están distribuidas en la naturaleza, particularmente en el suelo donde representan la mayor parte de la microflora y juegan un importante rol en el reciclado de nutrientes. Desde la década de los 40, cepas de este género han sido explotadas por su prodigiosa capacidad para producir una amplia gama de productos naturales, importantes para la salud del ser humano y animal, así como para uso en biotecnología (Barka *et al.*, 2016; Labeda, 2016). Sin embargo, un pequeño número de especies designadas *S. acidiscabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. niveiscabiei*, *S. puniscabiei*, *S. luridiscabiei*, *S. reticuliscabiei*, *S. scabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. turgidiscabiei* así como los grupos de *Streptomyces* sp. IdahoX y sp. SD3024, son reconocidas como patógenos de papa ocasionando la enfermedad denominada sarna común (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2009; Lambert & Loria, 1989a, b; Miyajima *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2003; Wanner, 2007). La patogenicidad provocada en la planta por el género *Streptomyces* se asocia generalmente a la presencia de la taxtomina A (King & Calhoun, 2009). El *cluster* de biosíntesis de la taxtomina A que contiene los genes *txtA* y *txtB* codificantes de sintetetasas de péptidos no ribosomales forma parte de una isla de patogenicidad (IPA) que además incluye a dos genes que codifican para una proteína necrogénica (*nec1*) y un homólogo de la tomatinasa (*tomA*) (Kers *et al.*, 2005; Seipke & Loria, 2008). Durante la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos en el género *Streptomyces* se produjo una “sobre” especiación que resultó en una clasificación excesiva del género (Kämpfer & Glaeser, 2012). Al presente, más de 800 especies de *Streptomyces* (<http://www.bacterio.net/streptomyces.html>, Euzéby, 1997) han sido descritas. El análisis de las secuencias del ARNr 16S fue utilizado como el enfoque estándar para determinar las relaciones evolutivas en este género (Kreuze *et al.*, 1999), pero las secuencias del 16S ARNr son muy similares entre las especies de *Streptomyces* limitando la utilidad de esta técnica (Labeda *et al.*, 2012). Por esta razón, otros genes como los que codifican la ADN polimerasa, la proteína ribosomal S1, SecY, o la GTPasa han sido utilizados para el análisis filogenético de *Streptomyces*. Sin embargo ninguno de estos genes por sí mismo resuelve totalmente la filogenia de este género (Alam *et al.*, 2010). Frente a esta dificultad se desarrolló el *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) para este género. Se utilizaron múltiples fragmentos internos a genes como los que codifican para la ATP sintasa F1 (subunidad- β ; *atpD*), ADN girasa (subunidad- β ; *gyrB*), recombinasa A (*recA*), ARN polimerasa (subunidad- β ; *rpoB*), y triptofano sintasa (subunidad- β ; *trpB*). Este abordaje resolvió con éxito la determinación de las

relaciones evolutivas de algunas especies de *Streptomyces* estrechamente relacionados (Guo *et al.*, 2008). Debido a los avances en las tecnologías de secuenciación y la disponibilidad de genomas de cepas de *Streptomyces* secuenciados se han realizado estudios filogenómicos. Éstos consisten en la concatenación de las secuencias de cientos de genes de copia única conservados en el conjunto de cepas analizadas. Estos análisis comparativos han permitido resolver eficientemente relaciones filogenéticas en dicho género (Zhang *et al.*, 2016, 2017). Por otra parte, la hibridación ADN-ADN (DDH) en el laboratorio sigue siendo considerada el método *gold standar* para determinación de especie. Sin embargo, se trata de un método tedioso y difícil de estandarizar (Achtman & Wagner, 2008). En contraste, métodos basados en la secuencia del genoma como *in silico* DNA-DNA Hibridization (isDDH) y Average nucleotide identity (ANI) son reproducibles y rápidos siempre que esté disponible la secuencia del genoma. El ANI de todos los genes compartidos por los aislamientos proporciona una buena estimación de la distancia evolutiva. En general un valor ANI del 95 al 96% y un valor del 70% isDDH corresponden al estándar de 70% DDH, por lo que ambos valores se utilizan como punto de corte en la discriminación de especies (Goris *et al.*, 2007; Meier-Kotloff *et al.*, 2013). Se cuenta con una colección de 70 cepas de *Streptomyces* patógenas caracterizadas en trabajos previos (Lapaz, 2014; Lapaz *et al.*, 2017). Durante la identificación de estos aislamientos se confirmó la presencia de las especies *S. scabiei*, *S. europaescabiei*, *S. acidiscabies* pero algunas cepas no se lograron identificar. De los métodos utilizados para la identificación, el MLSA realizado con 4 genes (*atpD*; *recA*, *rpoB* y *trpB*) fue el que obtuvo los mejores resultados. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos al incorporar el gen *gyrB* al método MLSA usado previamente en la identificación de especies del género *Streptomyces*. Además, se realizó un análisis genómico comparativo de 5 cepas representativas de nuestra colección. Se evaluó la similitud entre los genomas y se confirmó la identificación a nivel de especie utilizando los métodos de ANI e isDDH.

Objetivos

1. Realizar el análisis genómico comparativo de cepas de *Streptomyces* patógenas de papa aisladas en Uruguay.
2. Determinar la capacidad de resolución inter-específica del método *Multi Locus Sequence Analysis* para la identificación de aislamientos de especies del género *Streptomyces*.

Materiales y métodos

2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas utilizadas se enumeran en la Tabla 2.1. Estas 28 cepas de *Streptomyces* patógenas han sido previamente caracterizadas (Lapaz *et al.*, 2017). Las cepas fueron cultivadas en el medio *Yeast Malt Extract* (YME) a 28°C durante 2-3 días (Shirling & Gottlieb, 1966) y almacenadas como suspensión de micelio y esporas en glicerol al 20% (v/v) a -70°C.

Tabla 2.1. Características de cepas de *Streptomyces* spp. patógenas de papa aisladas en Uruguay utilizadas en este estudio.

Aislamiento	Origen		Muestra	Genes de IPA ^a			Género/Especie ^b
	Año	Lugar		<i>txtAB</i>	<i>nec1</i>	<i>toma</i>	
ST103	2010	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. acidiscabies</i>
ST105	2010	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. acidiscabies</i>
ST106	2010	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. acidiscabies</i>
ST107	2010	San José	Tubérculo	-	+	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST108	2010	San José	Tubérculo	-	-	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST109	2010	San José	Tubérculo	-	-	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST1011	2010	San José	Tubérculo	+	-	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST1013	2010	San José	Tubérculo	-	-	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST1015	2010	Canelones	Tubérculo	-	-	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST1018	2010	Canelones	Tubérculo	+	+	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST1020	2010	Canelones	Tubérculo	-	-	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST111	2011	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. acidiscabies</i>
ST112	2011	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. acidiscabies</i>
ST113	2011	Rocha	Tubérculo	+	+	+	<i>S. acidiscabies</i>
ST114	2011	Rocha	Tubérculo	+	+	+	<i>S. acidiscabies</i>
ST115	2011	Rocha	Tubérculo	+	+	+	<i>S. acidiscabies</i>
ST116	2011	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. acidiscabies</i>
ST119	2011	San José	Suelo	+	+	+	<i>Streptomyces</i> sp.
ST1113	2011	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. scabiei</i>
ST1134	2011	San José	Suelo	+	+	+	<i>Streptomyces</i> sp.
ST1140	2011	Semilla	Tubérculo	+	+	+	<i>Streptomyces</i> sp.
ST121	2012	San José	Tubérculo	+	-	+	<i>Streptomyces</i> sp.
ST124	2012	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. scabiei</i>
ST127	2012	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. scabiei</i>
ST129	2012	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. scabiei</i>
ST1218	2012	San José	Suelo	+	+	+	<i>Streptomyces</i> sp.
ST1229	2012	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. europaeiscabiei</i>
ST1232	2012	San José	Tubérculo	+	+	+	<i>S. scabiei</i>

^a Presencia (+), Ausencia (-) de genes asociados con la IPA de *Streptomyces*.

2.2 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de las cepas de *Streptomyces* se realizó según el método reportado por Sambrook y Russell (2001) con modificaciones. Las cepas se cultivaron en 5 ml de *Tryptic Soy Broth* (TSB) durante 2-3 días a 28°C. Dos ml del cultivo se centrifugaron a 10.000 *g*, el *pellet* resultante se resuspendió en 0.5 ml de buffer TE25S (25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8.0; 0.3 M sacarosa). Se agregó 2.5 µl de lisozima a una concentración de 100 mg/ml y se incubó a 37°C por 0.5-1 h. Posteriormente se agregó 5 µl de proteinasa K a una concentración de 20mg/ml y 65 µl de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%, y se incubó a 55°C por 1 h. A la suspensión de células se agregó 100 µl de NaCl 5 M, seguidos de 70 µl de una mezcla de *Cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) al 10%/NaCl 0.7 M y se incubó por 10 min a 55°C. Se agregó al lisado un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se incubó a temperatura ambiente por 0.5 h con frecuente inversión. La mezcla se centrifugó a 11000 *g* por 15 minutos y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. A la fase acuosa se agregó 2.5 µl de ARNasa A a una concentración de 10 mg/ml y se incubó a 37°C durante 0.5 h. El ADN se precipitó agregando 0.6 volúmenes de isopropanol frío y se centrifugó a 13000 *g* a 4°C durante 10 minutos. El ADN se lavó con 0.5 ml de etanol 70%, se secó y resuspendió en 50 µl de agua calidad MQ estéril. La cantidad y calidad de las preparaciones de ADN se midieron utilizando el equipo NanoDrop, Genova Nano (*Jenway*), se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con 0.5 µg/ml de Goodview (SBS Genetech Co., Ltd.) y se fotografiaron bajo luz UV. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C.

2.3 Secuenciación y Análisis de Genomas

Las 5 cepas patógenas de nuestra colección que fueron secuenciadas son: *S. acidiscabies* ST105, *S. scabiei* ST129, *S. europaescabiei* ST1229 y *Streptomyces* spp. ST1020 y ST1015. Los genomas fueron secuenciados en la empresa *Otogenetic corporation*, Atlanta, Estados Unidos por el laboratorio de la Dra. Loria en la *University of Florida* (Estados Unidos), utilizando el método de Illumina con la plataforma MiSeq. A partir de las secuencias genómicas se realizó el análisis, ensamblaje y anotación de los datos. La evaluación de calidad de las lecturas obtenidas (*reads*), se realizó mediante el programa FastQC versión 0.11.3 (Andrews, 2010). Posteriormente, se realizó el filtrado y limpieza de secuencias *reads*. El ensamblaje de genomas se realizó mediante el programa Spades 3.5 (Bankevich *et al.*, 2012). El análisis estadístico del ensamblaje se realizó mediante el programa *N50Stat.pl*. Luego los *contigs* con menos de 1000 pb se eliminaron. La edición de *contigs* se realizó con el programa Artemis V12 (Carver *et al.*, 2011). 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) y Glimmer (*Microbial Gene-Finding System*) versión

3.02 (Delcher *et al.*, 1999). Los programas Artemis V12 y ACT (*the Artemis Comparision Tool*) se utilizaron para la inspección de las anotaciones y comparaciones de secuencias con otros genomas (Carver *et al.*, 2005, 2011). Los genomas fueron depositados en la base de datos *NCBI Whole Genome Shotgun* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/wgs/>).

2.4 Comparación y Análisis filogenético de Genomas

La comparación de los 5 genomas secuenciados entre sí con 14 genomas de *Streptomyces* spp. del banco de datos GenBank, de los cuales 5 pertenecen a cepas patógenas de papa (*S. scabiei* NCPPB 4066, NCPPB 4086, 87-22, *S. turgidiscabies* Car8, *S. acidiscabies* 84-104), *S. ipomoeae* 91-03 patógena de boniato, 9 a cepas no patógenas (*S. avermitilis* MA-4680, *S. bingchenggensis* BCW-1, *S. flavogriseus* ATCC33331, *S. griseus* NBRC 13350, *S. hygroscopicus subsp. jinggangensis* 5008, *Streptomyces sp. sirexAA-E*, *S. violaceusniger* Tu 41113, *S. bottropensis* ATCC25435 y *S. coelicolor* A3(2)) y *Saccharopolyspora erythrae* NRRL-2338 (grupo externo), se realizó utilizando el programa OrthoMCL el cual analiza el contenido de genes (Li *et al.*, 2003). Mediante los datos obtenidos se generaron el pan-genoma, el genoma-core y la lista de genes que se comparten o no entre las distintas cepas. Se realizó un dendograma mediante el programa DendroUPGMA (Garcia-Vallve *et al.*, 1999) basado en la presencia o ausencia de genes, utilizando la tabla de contenido genético obtenida en el OrthoMCL para las 21 cepas. Se realizó el análisis filogenético de los genomas utilizando las secuencias concatenadas de los genes ortólogos presentes en todas las cepas y de copia única. Para filtrar estos genes se utilizó el programa *extract_orthologs.pl*. El árbol filogenético se construyó basándose en el algoritmo maximum likelihood RAxML (Stamatakis, 2006). Con el objetivo de identificar las cepas ST1015 y ST1020 se realizó un análisis filogenético incluyendo todos los genomas de cepas patógenas de papa de Bancos de datos reportados hasta el momento (31 cepas patógenas que abarcan un gran número de especies) y 9 cepas de *Streptomyces* spp. no patógenas, utilizando como grupo externo *Saccharopolyspora erythrae* NRRL-2338. Los datos de las secuencias de los genomas de *Streptomyces* utilizados en este estudio se detallan en la Tabla II.1 del ANEXO II.

2.5 Identidad Nucleotídica Media (ANI) e Hibridación ADN-ADN *in silico* (isDDH)

Para determinar los valores de ANI entre las cepas secuenciadas y las cepas tipo de las especies de *Streptomyces* spp. estrechamente relacionadas en base al análisis filogenético de genomas y el MLSA, los genomas de estas últimas fueron descargados del GenBank. Este índice se calculó a través de la plataforma ANI calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>). El punto de corte establecido para la definición de nuevas líneas filogenéticas es < 96% (Goris *et al.*, 2007). La estimación de la isDDH se realizó mediante el programa *Genome to Genome Distance*

Calculator (GGDC) (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) utilizando los mismos genomas de referencia que para ANI y la fórmula 2 fue aplicada, tal como se recomienda para el cálculo de *isDDH* cuando se utilizan genomas incompletos. Al igual que cuando se realiza la DDH de forma experimental, valores < 70% corresponden al punto de corte para la definición de nuevos taxones (Meier-Kotloff *et al.*, 2013). Por otro lado la diferencia del contenido GC no puede ser >1% para una misma especie (Meier-Kotloff *et al.*, 2014).

2.6 Multi Locus Sequence Analysis (MLSA)

2.6.1 Análisis del gen *gyrB*

Al análisis de MLSA previamente realizado con los genes *atpD*, *recA*, *rpoB* y *trpB* (Lapaz *et al.*, 2017), se incorporó el gen *housekeeping gyrB* (Labeda *et al.*, 2016). Se utilizaron los *primers* (*gyrBPFA*/*gyrBPAR*) (Tabla 2.2) y los parámetros para la PCR descritos en el protocolo de *Streptomyces* MLST disponible en *ARS Microbial Genomic Sequence Database server* <http://199.133.98.43> con modificaciones. Se utilizó para la reacción de PCR la enzima de alta fidelidad *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Thermo scientific, Estados Unidos) y el ciclo de amplificación utilizado fue el siguiente: un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 5 min; 35 ciclos repetidos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 72°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 90 s; y una etapa de extensión final a 72°C durante 10 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, EE.UU). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con 0.5 µg/ml de Goodview (SBS Genetech Co., Ltd.) y se fotografiaron bajo luz UV. Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific, EE.UU) para estimar el tamaño.

2.6.2 Purificación, secuenciado y edición de secuencias para el gen *gyrB*

Los productos de PCR del tamaño esperado (~1000pb) fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones por el Servicio MacroGen (Kumchun ku, Seúl, Corea) utilizando los *primers* *gyrBFA* y *gyrBRA* (Tabla 2.2). En el caso de que hubiera un producto inespecífico, previamente se purificó el fragmento de ADN del tamaño esperado mediante el kit QIAquick Gel Extraction, Qiagen (Alemania). Las secuencias fueron editadas y alineadas utilizando el algoritmo ClustalW en el programa Geneious Pro 4.8.5 (Biomatters, Auckland, New Zealand).

Tabla 2.2. Primers utilizados para amplificación y secuenciado del gen *gyrB*

Nombre del primer	Secuencia
gyrBPFA	TCGAGGGTCTGGACGCGGTCCGCAAGCGACCCGGTATGTA
gyrBPA	GAAGGTCTTCACCTCGGTGTTGCCCAGCTTCGTCTT
gyrBFA	GCAAGCGACCCGGTATGTAC
gyrBRA	GAGGTTGTCGTCCTTCTCGC

Todos los primers fueron diseñados por Rong *et al.*, 2009

2.6.3 Análisis filogenético

Se analizaron las secuencias de las 28 cepas de *Streptomyces* causantes de sarna común en Uruguay (Tabla 2.1) para los 5 genes analizados (*atpD*, *recA*, *rpoB*, *trpB* y *gyrB*). También fueron incluidas en este análisis secuencias depositadas en la base de datos *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), correspondientes a 10 especies de *Streptomyces* causantes de sarna en papa: *S. scabiei* 87.22, *S. acidiscabies* 84-104, *S. europaeiscabiei* NRRL B-24443, *S. luridiscabiei* LMG 21390, *S. niveiscabiei* NRRL B-24457, *S. caviscabies* AS 4.1836, *S. puniscabiei* NRRL B-24456, *S. reticuliscabiei* NRRL B-24446, *S. stelliscabiei* NRRL B-24447, *S. turgidiscabies* NRRL B-24078 y la especie *S. ipomoeae* NRRL B-12321 causante de sarna en el boniato. Por otro lado se incluyeron en el análisis las secuencias de *S. violaceusniger* CGMCC 4.1423 y *S. durhamensis* NRRL ISP-5539 depositadas en la base de datos de *Streptomyces* MLST disponible en ARS Microbial Genomic Sequence Database server- <http://199.133.98.43>. También se incluyeron en el análisis las 9 cepas de *Streptomyces* spp. no patógenas que se utilizaron para el análisis filogenético de genomas y se utilizó como grupo externo *Saccharopolyspora erythrae*. Por un lado se realizó el análisis filogenético del gen *gyrB* y posteriormente el análisis de la secuencia concatenada de los cinco genes *housekeeping*. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de maximum likelihood en el programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Los árboles resultantes y la topología fueron evaluados mediante el análisis de *bootstrap* basado en 1,000 repeticiones. En ambos árboles filogenéticos se consideraron *clusters* consistentes los que presentaban valores de *bootstrap* $\geq 70\%$ (Hillis & Bull, 1993). A partir del alineamiento de las secuencias concatenadas de los 5 genes se calculó la distancia evolutiva utilizando el modelo de dos parámetros Kimura (K2P) para secuencias de nucleótidos (Kimura, 1980).

Resultados

Secuenciación y Análisis de genomas

Los datos referentes a los ADNs de partida para la secuenciación de los genomas se recogen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Características de las muestras de ADN obtenidas aplicando el protocolo descrito anteriormente.

Cepa	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230	Volumen Total (μl)	Cantidad Total (μg)
ST129	266.53	1.94	1.99	50	13.33
ST1229	261.75	1.95	1.92	50	13.07
ST105	193.46	1.80	2.00	50	9.67
ST1015	433.47	1.91	2.09	50	21.67
ST1020	654.69	1.99	2.06	50	32.73

La concentración y las relaciones de valores de absorbancia 260/230 y 260/280 muestran la excelente calidad y pureza del ADN obtenido según los estándares aceptados para su utilización en los protocolos de secuenciación establecidos por la empresa *Otogenetic corporation*, según los cuales un ADN de buena calidad y pureza debe tener una relación de absorbancia 260/280 comprendido entre 1.8-2.0, una relación de absorbancia 260/230 comprendido entre 1.9-2.0, una concentración entre 20-500 ng/μl y una cantidad total de 2μg. Las muestras fueron enviadas a secuenciar a *Otogenetic corporation*, Atlanta, Estados Unidos. Los resultados obtenidos de la secuenciación utilizando la plataforma Illumina MiSeq-100 se recogen en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Rendimientos de secuenciación obtenidos con la plataforma Illumina MiSeq-100.

Cepa	Nº de reads	Longitud media (pb)	Cobertura estimada*	Índice Phred (Media)
ST129	5562266 (x2)	100	56X	35
ST1229	5137029 (x2)	100	51X	35
ST105	5421182 (x2)	100	54X	35
ST1015	4749844 (x2)	100	47X	35
ST1020	3270132 (x2)	106	33X	35

La cobertura estimada del genoma se calculó tomando en cuenta un tamaño estimado del genoma total para *Streptomyces* spp de 10Mb.

Los rendimientos de la secuenciación fueron buenos para todas las muestras debido a que la cobertura para todos los genomas fue mayor de 30x y las lecturas (*reads*) fueron de alta calidad según los parámetros evaluados en el programa FastQC. Se consideraron lecturas de alta calidad aquellas con índice de calidad Phred (Q) superior a 30. Este índice de calidad se otorga de forma

individual a cada nucleótido, y refleja la probabilidad de que ese determinado nucleótido sea erróneo (P). Un índice de calidad Phred 30 determina que esa probabilidad de error sea de 1 entre 1000, asegurando una precisión del 99.9%. El cálculo de Q refleja una relación logarítmica entre él mismo y P. $Q = -10 \log_{10} P$ (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green 1998).

Ensamblaje de genomas

El ensamblaje de *novo* se realizó con el programa Spades versión 3.5 (Bankevich *et al.*, 2012), donde se probaron diferentes tamaños de *K-mer* de manera de obtener el mejor ensamblaje. La calidad de los ensamblajes se evaluó mediante el programa N50Stat.pl. A continuación se detallan los datos obtenidos por el mejor ensamblaje para cada muestra (Tabla 2.5). Éste se seleccionó teniendo en cuenta la longitud del genoma total, %GC, el número de *contigs* y el estadístico N50 definido como la longitud de los *contigs* que ordenados de igual o mayor tamaño alcanza la mitad de los nucleótidos del genoma. El N50 se calcula ordenando todos los *contigs* obtenidos de mayor a menor, y determinando el conjunto mínimo de *contigs* cuyo tamaño sea el 50% de todo el genoma. Los genomas borrador fueron depositados en la base de datos *NCBI Whole Genome Shotgun* y los números de acceso se detallan en el siguiente tabla.

Tabla 2.5. Características del ensamblaje de los genomas.

Cepa	ST129	ST1229	ST105	ST1015	ST1020
Tamaño del genoma(Mb)	10.0	11.0	10.9	10.0	10.1
Contenido (G+C)	71.2	70.5	70.5	71.3	71.3
Número de <i>contigs</i>	1210	1071	997	1133	1013
<i>Contig</i> más largo	61205	119302	68807	70637	88619
N50 (pb)	13265	17127	18522	14127	17382
Número de acceso	PCGT000000000	PCGU000000000	PCGS000000000	LXWC000000000	LXWD000000000

Anotación de ensamblajes

La predicción de genes se realizó mediante la plataforma RAST. En la Tabla 2.6 se detallan los datos obtenidos de los posibles genes que codifican para ARNs y para proteínas (CDS), dentro de los últimos la cantidad de genes que corresponden a proteínas hipotéticas y los genes candidatos con una función conocida.

Tabla 2.6. Características de la anotación de los genomas.

Género/Especie	Cepa	Total CDS*	Proteínas		ARNs
			Hipotéticas	Función conocida	
<i>S. scabiei</i>	ST129	8735	3255	5480	70
<i>S. europaeiscabiei</i>	ST1229	9689	3623	6066	73
<i>S. acidiscabies</i>	ST105	9742	3465	6277	77
<i>Streptomyces sp.</i>	ST1015	8767	2989	5778	66
<i>Streptomyces sp.</i>	ST1020	8816	2993	5823	66

* Secuencia codificante. *Coding Sequence* (CDS)

Aproximadamente el 30% de los genes predichos que codifican para proteínas en los 5 genomas fueron clasificados por la herramienta RAST dentro de 21 categorías funcionales. En la siguiente Figura 2.1 se muestra la distribución de los genes dentro de los distintos grupos para cada cepa secuenciada.

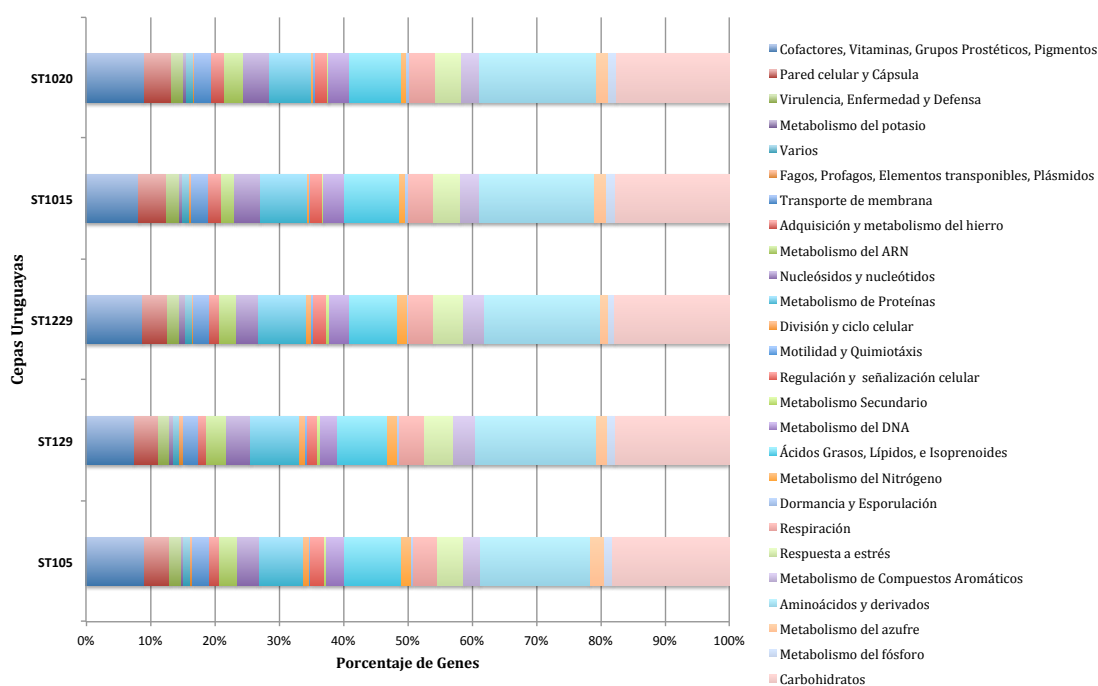


Figura 2.1. Distribución de genes dentro de categorías funcionales.

En la Figura 2.1 se aprecia que para los 5 genomas los porcentajes de genes dentro de cada categoría son similares. El mayor número de genes está relacionado con el metabolismo de carbohidratos (entre 17-18%) y el metabolismo de aminoácidos y sus derivados (entre 17-19%). Estos genes son seguidos en número por los relacionados con el metabolismo de cofactores, vitaminas, grupos prostéticos y pigmentos con un 8-9% y el metabolismo de proteínas con un 7-8%. Los grupos que contaron con un porcentaje de genes $\leq 1\%$ fueron los relacionados con el metabolismo del potasio, metabolismo secundario, dormancia y

esporulación, división y ciclo celular, motilidad y quimiotaxis, fagos, profagos, elementos transponibles y plásmidos. El grupo funcional que comprende virulencia, enfermedad y defensa contiene el 2% de genes relacionados, y todos estos están dentro de una subcategoría que pertenece a genes involucrados en la resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos.

Análisis Comparativo de Genomas

A partir de las secuencias genómicas se realizó el análisis comparativo del contenido de genes de las 5 cepas aisladas en Uruguay y de 15 cepas de *Streptomyces* spp. pertenecientes a diferentes especies utilizando el programa OrthoMCL. Se obtuvo una lista de genes que se comparten o no entre las distintas cepas a partir de la cual se pudieron determinar el pan-genoma y el core-genoma (genoma esencial). En la Figura 2.2 se observa mediante un gráfico de barras el contenido de secuencias codificantes de cada genoma. El gráfico con línea negra representa cuales son los genes que se conservan a medida que se incorpora un nuevo genoma y el gráfico con línea gris representa el aumento de nuevos genes cuando se incorpora un nuevo genoma. El core-genoma está constituido por 1,440 CDS y se observa que la línea de tendencia se estabiliza. El pan-genoma para este conjunto de cepas es de 28,016 CDS y se observa una línea de tendencia en aumento.

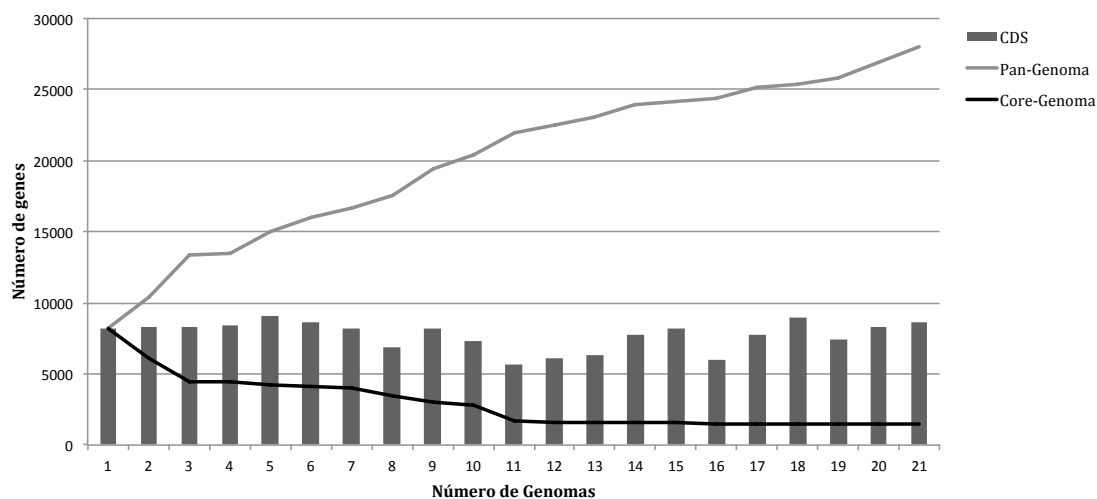


Figura 2.2. Análisis del pan-genoma (línea gris). Análisis del genoma core (línea negra). Contenido de genes (CDS) (Gráfico de Barras). El número de nuevos genes en el *Streptomyces* pan-genoma y genoma core son graficados vs el número de genomas que se agrega.

Se realizó un análisis comparativo de las 5 cepas secuenciadas el cual se representa mediante un diagrama de Venn (Figura 2.3). En el mismo se puede observar la cantidad de genes que se comparten o no entre las distintas cepas.

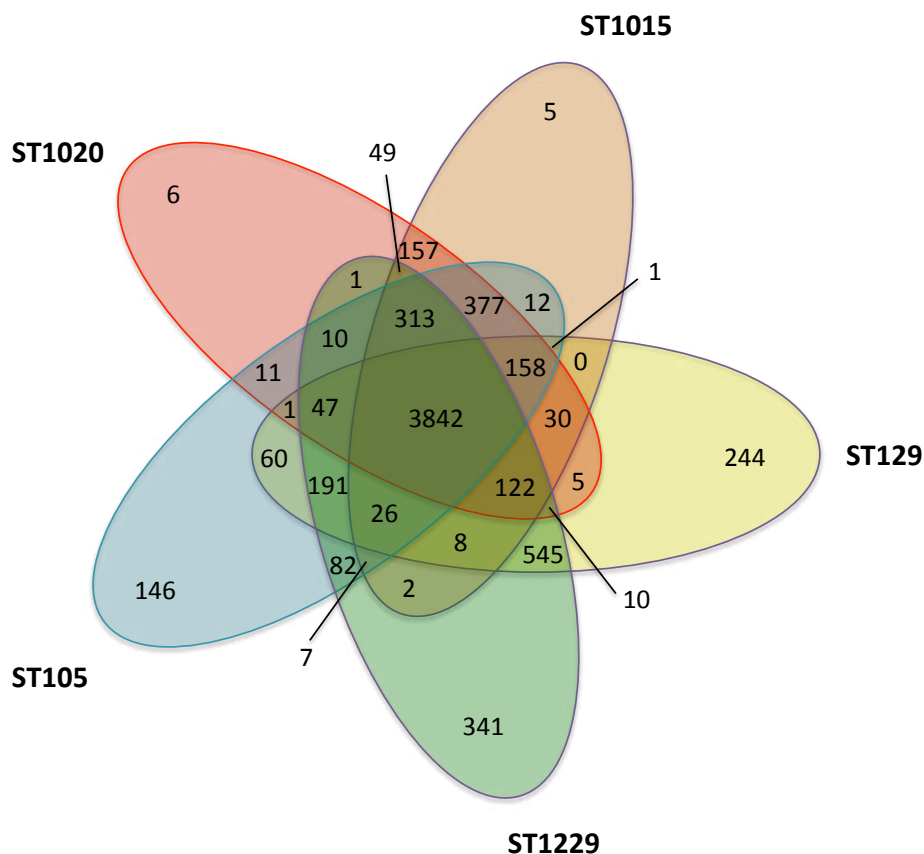


Figura 2.3. Genes comunes y únicos entre diferentes cepas. Diagrama de Venn para las 5 cepas secuenciadas.

Análisis filogenético y comparación de genomas

Se realizó el análisis comparativo y filogenético de los genomas mediante la comparación con 15 genomas de *Streptomyces* spp. del banco de datos GenBank, utilizando como grupo externo *Saccharopolyspora erythrae*. El análisis filogenético se realizó utilizando las secuencias concatenadas de los genes comunes de copia única (Figura 2.4 A). Por otra parte se construyó un dendograma basado en la comparación del contenido total de genes mediante el programa OrthoMCL (Figura 2.4 B) considerando la presencia o ausencia de genes.

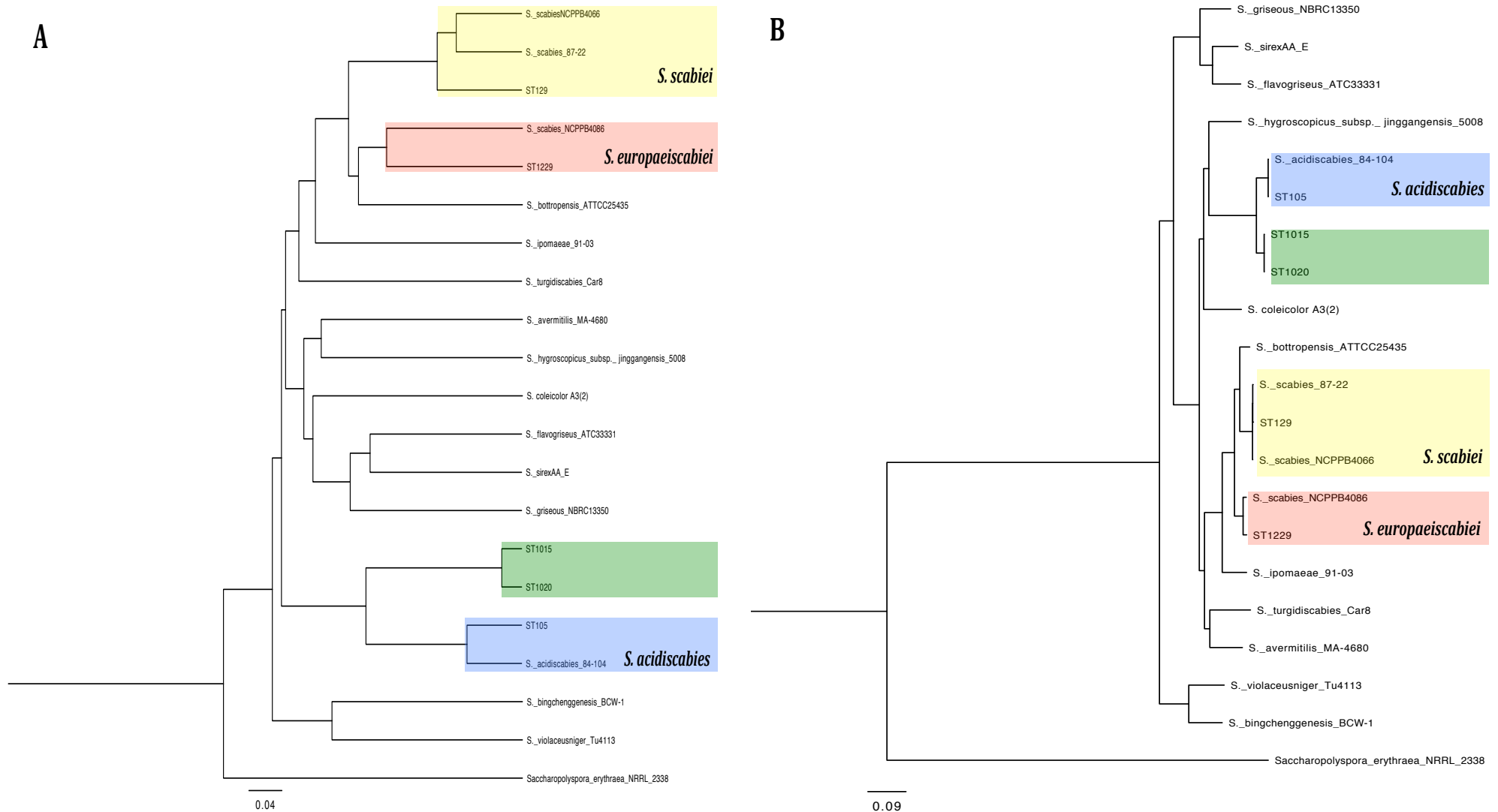


Figura 2.4. Análisis comparativo de *Streptomyces* spp. patógenos de plantas y *Streptomyces* spp no patógenos. **A.** El árbol se construyó con la secuencia concatenada de los genes comunes de copia única. **B.** Dendograma construido comparando el contenido de genes. Las secuencias de *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338 fueron utilizadas como outgroups.

A partir de los análisis realizados basados en estrategias diferentes (análisis filogenético y análisis comparativo del contenido de genes), se logró similar distribución de las cepas. Las 5 cepas uruguayas se encuentran distribuidas dentro de 4 grupos. Las cepas que habían sido previamente identificadas como *S. scabiei* y *S. acidiscabies* se asocian a cepas de la especie respectiva. Por otro lado la cepa ST1229 la cual se identificó como *S. europaescabiei* se encuentra asociada a una cepa de *S. scabiei* NCPPB4086. Sin embargo las cepas que no han sido identificadas *Streptomyces* spp. ST1015 y ST1020 forman un grupo aparte entre si pero cercano a las cepas de *S. acidiscabies*. Buscando asociar las cepas ST1015 y ST1020 a una especie patógena, se construyó un árbol filogenético con las cepas secuenciadas, todos los genomas de cepas patógenas registrados hasta dicho momento (31 genomas), 8 cepas de *Streptomyces* no patógenas y se utilizó como grupo externo *Saccharopolyspora erythrae*. El mismo se realizó con la secuencia concatenada de 404 genes de copia única (Figura 2.5).

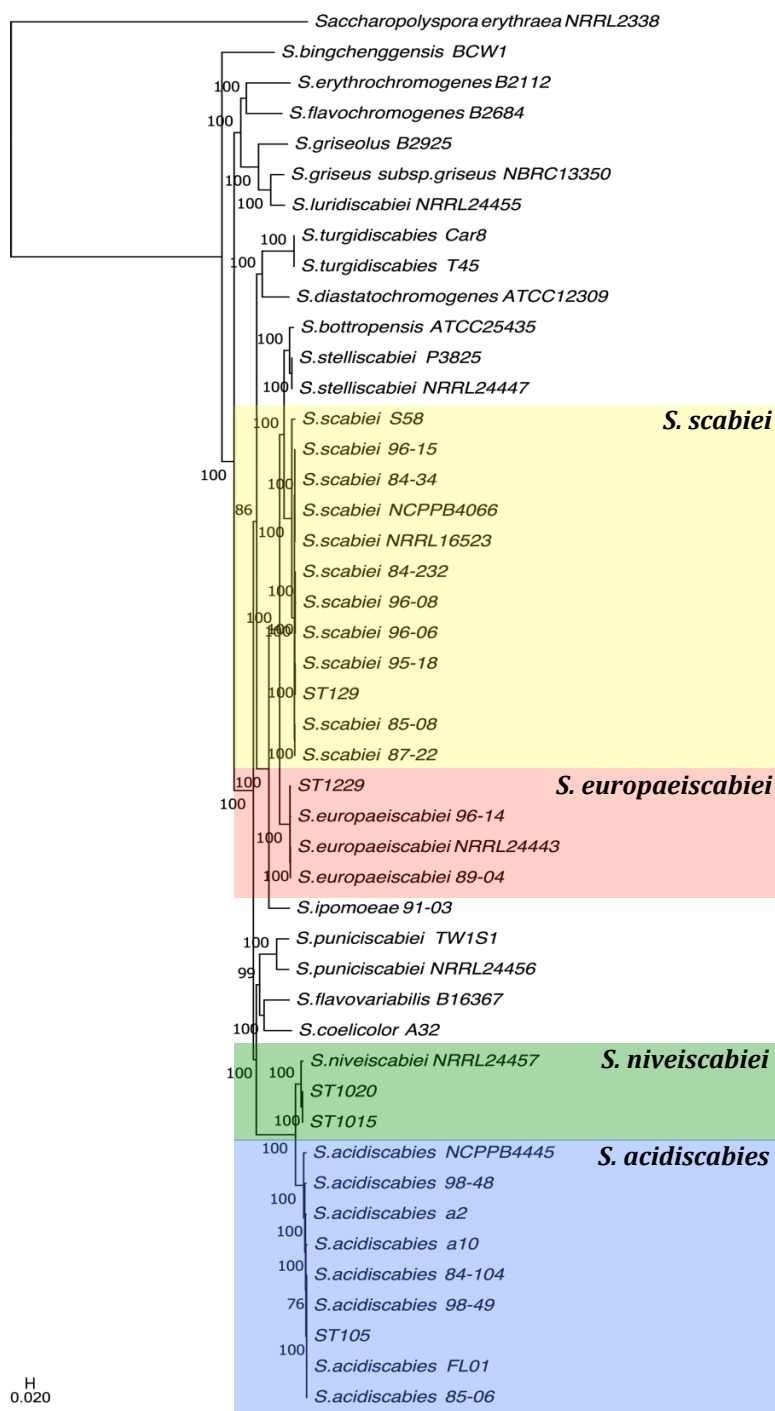


Figura 2.5. Análisis filogenético de *Streptomyces* spp. patógenos de plantas y *Streptomyces* spp. no patógenos. El árbol se construyó con la secuencia concatenada de 404 genes comunes de copia única. Las secuencias de *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338 fueron utilizadas como outgroups.

El análisis filogenético en la Figura 2.5 muestra a las 5 cepas distribuidas en 4 grupos. Las cepas que habían sido identificadas anteriormente se agrupan con cepas de la misma especie, mientras que las cepas que no habían sido identificadas hasta este momento, se asocian a la cepa *S. niveiscabiei* NRRL24457.

Comparación DNA-DNA *in silico*

Se compararon los genomas de las 5 cepas, utilizando el ANI y el DDHs (Tabla 2.7) con los genomas de las cepas tipo de las especies estrechamente relacionadas considerando las posiciones en los árboles filogenéticos construidos con los genomas (Figuras 2.5 y 2.4 A).

Tabla 2.7. Resultados de la comparación de los genomas de las 5 cepas secuenciadas con respecto de las especies estrechamente relacionadas en base al ANI y al DDHs.

Cepa	Cepa de Referencia	Número de accesión	% <i>isDDH</i> * estimado	Diferencia en %G+C	% ANI**
<i>Streptomyces</i> sp. ST1015	<i>S. niveiscabiei</i> NRRL24457	NZ_LIRL000000000.1	84.90	0.27	98.59
<i>Streptomyces</i> sp. ST1020	<i>S. niveiscabiei</i> NRRL24457	NZ_LIRL000000000.1	85.00	0.14	98.58
<i>Streptomyces</i> sp. ST1015	<i>S. acidiscabies</i> 84-104	NZ_AHBF000000000.1	49.80	0.69	93.38
<i>Streptomyces</i> sp. ST1020	<i>S. acidiscabies</i> 84-104	NZ_AHBF000000000.1	49.80	0.72	93.38
<i>S. acidiscabies</i> ST105	<i>S. acidiscabies</i> 84-104	NZ_AHBF000000000.1	99.40	0.11	99.97%
<i>S. scabiei</i> ST129	<i>S. scabiei</i> 87.22	NC_013929.1	96.10	0.20	99.62
<i>S. europaescabiei</i> ST1229	<i>S. europaescabiei</i> NRRL24443	NZ_LCTL01000001.1	94.40	0.04	99.51

* Hibridación ADN-ADN *in silico*

**Average Nucleotide Identity

Como se muestra en la Tabla 2.7, en todos los casos, para el ANI los valores fueron >96%, para la *isDDH* >70% y la diferencia del contenido GC fue menor al 1% para las cepas que habían sido previamente identificadas. Las cepas ST1015 y ST1020 se compararon con cepas de referencia de *S. acidiscabies* y *S. niveiscabiei* identificándose las mismas como *S. niveiscabiei*, con valores de ANI >96%, para la *isDDH* >70% y la diferencia del contenido GC menor al 1%.

Multi Locus Sequence Analysis (MLSA)

Se realizó un análisis MLSA incorporando el gen *gyrB* reportado por Labeda *et al.*, 2016 al sistema de *Multi Locus Sequence Analysis* realizado previamente con cuatro genes (Lapaz *et al.*, 2017). Las secuencias obtenidas se encuentran en el Anexo III. Se realizó el análisis filogenético para las secuencias parciales del gen *gyrB* (Figura 2.6 A) y para las secuencias parciales concatenadas de los 5 genes *housekeeping* (*atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* y *trpB*) (Figura 2.6 B) para 28 cepas de la colección uruguaya. Se utilizaron además secuencias obtenidas de *GenBank* de 10 cepas de referencia pertenecientes a distintas especies que causan sarna común, 9 cepas no patógenas y *Saccharopolyspora erythrae* como grupo externo. Además mediante la comparación de la secuencia concatenada de los 5 genes (2520pb) de las cepas mencionadas anteriormente con 266 secuencias pertenecientes a cepas del género *Streptomyces* depositadas en la base de datos *ARS Microbial Genomic Sequence Database* se seleccionaron las secuencias de las cepas *S. violaceusniger* CGMCC 4-1423 y *S. durhamensis* NRRL ISP-5539 para ser incluidas en los análisis filogenéticos Figuras 2.6 A y 2.6 B. La matriz de distancias evolutivas construida a partir del alineamiento de la secuencia concatenada de los 5 genes se encuentra en el Anexo II.

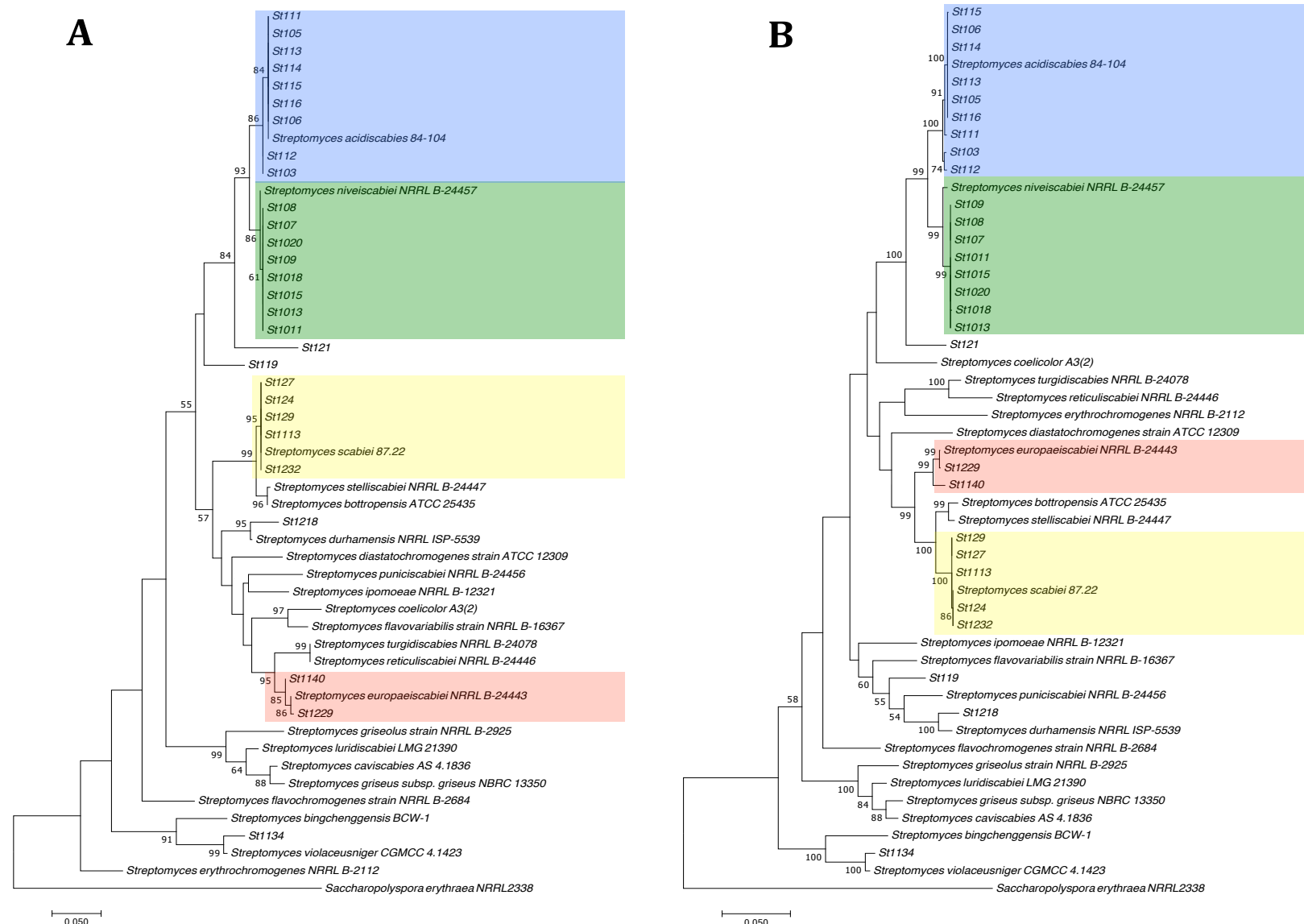


Figura 2.6. A. Árbol filogenético construido a partir de secuencias parciales del gen *gyrB* (415 pb) B. Árbol filogenético construido a partir del alineamiento de las secuencias parciales concatenadas de los cinco genes *housekeeping atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* y *trpB* (2520 pb en total). Se utilizó para ambos árboles el método *máximum-likelihood*. Valores de *bootstrap* >50% (basados en 1000 repeticiones) se encuentran en los nodos. La barra indica sustituciones por posición de nucleótido.

En las Figuras 2.6 A y 2.6 B se muestran los árboles filogenéticos contruidos a partir del análisis de la secuencia parcial del gen *gyrB* (415 pb) y el concatenado de las secuencias parciales de los genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* y *trpB* (2520pb), los cuales revelaron una gran variabilidad genética entre los aislamientos de *Streptomyces* spp. causantes de sarna en Uruguay. En el árbol de genes concatenados todas las especies se pueden diferenciar entre si, mientras que en el árbol construido con la secuencia parcial del gen *gyrB* no se logran diferenciar entre si las especies *S. turgidiscabies* y *S. reticuliscabies*. La distribución de las cepas en ambos árboles es similar, observándose la mayoría de las cepas en 4 grupos congruentes. El grupo señalado en azul está constituido por 9 aislamientos de *Streptomyces* patógenos (ST103, ST105, ST106, ST111, ST112, ST113, ST114, ST115 y ST116) que se agrupan consistentemente (bootstrap entre 74-100) con la cepa de referencia de *S. acidiscabies*. Las distancias evolutivas del grupo de cepas y la cepa de referencia se encuentran entre (0 - 0.002). Por otro lado, se distingue el Grupo verde constituido por 8 aislamientos de *Streptomyces* patógenos (ST107, ST108, ST109, ST1011, ST1013, ST1015, ST1018 y ST1020) que forman un cluster separado, que parecería estar más relacionado con la cepa de referencia de *S. niveiscabiei* NRRL B-24457. La distancia evolutiva de este grupo de cepas y la cepa de referencia de *S. niveiscabiei* es 0.002. Mientras que con la cepa de referencia de *S. acidiscabies* la distancias de cada cepa del grupo y la cepa de referencia es 0.004. El Grupo amarillo conformado por 5 aislamientos (ST1113, ST124, ST127, ST129 y ST1232) que se agrupan consistentemente (bootstrap entre 86-100) junto a la cepa de referencia de *S. scabiei*, con distancias evolutivas entre (0- 0.001). El grupo rojo en donde la cepa ST1229 se agrupa con la cepa de referencia de *S. europaeiscabiei* (bootstrap 99) con una distancia evolutiva de 0.001 y la cepa ST1140 se relaciona con una distancia de 0.002. Las cepa ST1218 se encuentra relacionada con la cepa de referencia de *S. durhamensis* con una distancia de 0.003 y la cepa ST1134 se encuentran relacionada con *S. violaceusniger* respectivamente con una distancias de 0.002. Por último las cepas ST121 y ST119 no se agruparon con ninguna cepa de referencia.

Discusión

En este Capítulo se presentó el análisis genómico comparativo de 5 cepas de *Streptomyces* patógenas de papa de forma de profundizar en el conocimiento de los aislamientos que constituyen la colección. Se seleccionaron para secuenciar una cepa de cada especie identificada (*S. acidiscabies* ST105, *S. scabiei* ST129, *S. europaescabiei* ST1229) y dos cepas que representan a un grupo de aislamientos atípicos que no pudo ser identificado (ST1020 y ST1015). Este grupo se consideró novedoso porque las cepas que lo integran no poseen los genes de patogenicidad característicos (*txtA*, *txtB*, *nec1* y *tomA*). Las secuencias genómicas de dichas cepas mostraron que los tamaños de los genomas se encontraban en el rango entre 10-11Mb y su contenido GC entre 70.5-71.3 % (Tabla 2.5), resultados dentro de lo esperado para este género (Law *et al.*, 2018). Mediante la anotación de los genomas se observó que el número de secuencias codificantes, el porcentaje de proteínas hipotéticas y de función conocida fue similar para los cinco genomas (Tabla 2.6). Aproximadamente el 30% de las CDS de los genomas se agruparon en 21 categorías funcionales, siendo similar la distribución en las categorías (Figura 2.1). El análisis comparativo del contenido de genes de los 5 genomas con los genomas de 15 cepas de *Streptomyces* spp. obtenidos del GenBank muestra que la línea de tendencia del genoma core se estabiliza en el genoma 11, lo que sugiere que la cantidad de genes esenciales para el género *Streptomyces* ronda en 1440 (Figura 2.2). Por otro lado, la línea de tendencia del pan-genoma continúa creciendo por lo que sería necesario incluir más genomas para lograr inferir el número total de genes que posee este género. Esto indica que el nivel de genes accesorios es grande (genes del pan-genoma menos genes del genoma core) y que al tener un pan-genoma abierto el género *Streptomyces* es rico en potenciales nuevos genes a ser identificados. La riqueza en genes accesorios del género *Streptomyces* se debe en gran medida a la inestabilidad del genoma ya que este género tiene una gran capacidad de incorporar y transferir genes (Volf & Altenbuchner, 1998). Se ha reportado que la parte central del cromosoma lineal de los *Streptomyces* de aproximadamente 4.5-6Mb contiene los genes necesarios para el crecimiento y metabolismo (Chater *et al.*, 2010), mientras que múltiples *operones* y *clusters* de biosíntesis que codifican para metabolitos secundarios se encuentran en los 2-3Mb de los extremos del cromosoma. Muchos de estos grupos de genes están flaqueados por pequeñas secuencias repetidas, secuencias de inserción y sitios de integración de fagos lo que sugiere que han sido y pueden ser transferidos entre los genomas de *Streptomyces* (Wanner & Kirk, 2015). Se realizó el análisis comparativo y filogenético de los genomas mediante la comparación con 15 genomas de *Streptomyces* spp. de GenBank, utilizando como grupo externo *Saccharopolyspora erythrae*. Se observó que la distribución de las cepas en el dendrograma basado en la comparación del contenido total de genes y el análisis filogenómico (realizado mediante el concatenado de los

genes pertenecientes al genoma core), fue similar (Figura 2.4 A y B). Las cepas *S. acidiscabies* ST105, *S. scabiei* ST129 se agruparon con cepas de su respectiva especie, mientras que la cepa *S. europaescabiei* ST1229 se agrupó con la cepa identificada en ese momento como *S. scabiei* NCPPB4086. Esta cepa se reclasificó nuevamente por Zhang *et al.*, 2016 como *S. europaescabiei* NCPPB4086. Las cepas de *Streptomyces* spp. ST1015 y ST1020 se agrupan juntas en un *cluster* cercano al de las cepas de *S. acidiscabies*. Mediante el análisis filogenómico que se muestra en la Figura 2.5, construido con todos los genomas de cepas patógenas registrados hasta dicho momento (31 genomas), 8 cepas de *Streptomyces* no patógenas y utilizando como grupo externo *Saccharopolyspora erythrae* se observó que las cepas *S. acidiscabies* ST105, *S. scabiei* ST129 y *S. europaescabiei* ST1229 se agrupan con cepas de su respectiva especie. Las cepas de *Streptomyces* spp. ST1020 y ST1015 se agrupan con la especie *S. niveiscabiei*. Por tanto, el análisis filogenómico permitió diferenciar todas las especies analizadas lo que demuestra una capacidad de resolución inter-específica alta. De manera de confirmar la identidad de las cepas a nivel de especie se realizaron comparaciones de los genomas con el de cada cepa de referencia que se agrupa en el árbol filogenético Figura 2.5. Se calcularon los valores ANI, *isDDH* y la diferencia en el porcentaje de GC. Para los genomas de las cepas *S. acidiscabies* ST105, *S. scabiei* ST129 y *S. europaescabiei* ST1229 se obtuvieron valores de ANI >95%, valores de *isDDH* > 70% y diferencias de contenido GC <1% por lo que se confirma la identidad de las cepas. Para las cepas *Streptomyces* spp ST1015 y ST1020 las cuales fueron comparadas con la cepas de referencia *S. acidiscabies* 84-104 y *S. niveiscabiei* NRRL-24457 donde se obtuvieron con la última valores de ANI >95%, *isDDH* > 70% y diferencias de contenido GC <1% por lo cual dichas cepas se identificaron como *S. niveiscabiei* representando el primer reporte de esta especie patógena en Uruguay. Esta especie fue aislada por primera vez en Corea por Park *et al.*, 2003 y no se ha reportado en otro país. En el análisis filogenético de las 28 cepas patógenas de *Streptomyces* aisladas en Uruguay, utilizando el gen *gyrB* se observó que la secuencia parcial de este único gen no permite diferenciar todas las especies analizadas, por ejemplo, la especie *S. turgidiscabies* no se llega a diferenciar de la especie *S. reticuliscabiei*. El esquema de MLSA utilizado en este trabajo fue establecido por Guo *et al.*, 2008, ha sido aplicado en varios estudios para resolver las relaciones filogenéticas de especies de *Streptomyces* estrechamente relacionadas que no pudieron diferenciarse en función de la filogenia de la secuencia del gen 16S rARN y resulta una alternativa valiosa al método *gold standar* DDH. Varios estudios demuestran que existe una alta correlación entre DDH y MLSA (Rong & Huang, 2014). Si se utiliza el esquema de MLSA basado en cinco genes se ha demostrado que una distancia evolutiva de 0.007 corresponde al valor DDH de 70% como punto de corte para la determinación de las especies del género *Streptomyces* (Rong & Huang, 2010, 2012; Glaeser & Kämpfer, 2015; Law *et al.*, 2018). Por consiguiente, en este estudio, las 6 cepas de *Streptomyces* (ST107, ST108, ST109, ST1011,

ST1013 y ST1018) que se agrupan con las cepas *S. niveiscabiei* ST1015 y ST1020 con las que tienen una distancia evolutiva en un rango de 0-0.001 se consideran de la misma especie. Según bibliografía el punto de corte para definir por MLSA que dos cepas del género *Streptomyces* no pertenecen a la misma especie, corresponde a distancias igual o mayores a 0.007 (Rong & Huang, 2012). Sin embargo al analizar la matriz de distancias evolutivas en este estudio, se observa que cepas de distintas especies poseen distancias evolutivas menores a 0.007. Por ejemplo, la distancia evolutiva es 0.004 entre los pares de las secuencias de cepas de referencia *S. acidiscabies*/*S. nivesicabiei*, *S. stelliscabiei*/*S. europaescabiei* y 0.002 entre *S. stelliscabiei*/*S. bottropensis*. En base a lo antedicho, la cepa ST1140 que se agrupa con las cepas de *S. europaescabiei*, con una distancia evolutiva de 0.002 requeriría de algún método de identificación complementario de confirmación para considerarla de dicha especie. Las cepas ST1228 y ST1134 las cuales se agrupan con las especies *S. durhamensis* y *S. violaceusniger* respectivamente, tanto como las cepas ST121 y ST119 que no se agrupan con ninguna cepa de referencia son novedosas debido a que no están asociadas a ninguna especie patógena reportada. Nuestros resultados dejan en evidencia que dado que el género *Streptomyces* es muy diverso sería necesario un análisis más completo para determinar cual es el punto de corte para identificar una especie por el método MLSA. Por consiguiente, por el momento el MLSA no puede sustituir al método *gold estándar* DDH. Este estudio permite concluir que en un marco de identificación polifásica, el MLSA es una muy buena herramienta para la identificación a nivel de especie.

Bibliografía

- Achtman, M., & Wagner, M. (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 431.
- Alam, M. T., Merlo, M. E., Takano, E., & Breitling, R. (2010). Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives. *Molecular phylogenetics and evolution*, 54(3), 763-772.
- Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., ... & Meyer, F. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1), 75.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., et al. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80(1), 1-43.
- Bouchek-Mechiche, K., Gardan, L., Normand, P., & Jouan, B. (2000). DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(1), 91-99.
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M. A., Barrell, B. G., & Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics*, 21(16), 3422-3423.
- Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J., & McQuillan, J. A. (2011). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, 28(4), 464-469.
- Chater, K. F., Biro, S., Lee, K. J., Palmer, T., & Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), 171-198.
- Delcher, A. L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., & Salzberg, S. L. (1999). Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic acids research*, 27(23), 4636-4641.
- Euzéby, J. P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 590-592.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome research*, 8(3), 175-185.
- Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research*, 8(3), 186-194.
- Garcia-Vallvé, S., Palau, J., & Romeu, A. (1999). Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16(9), 1125-1134.

- Glaeser SP and Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol* 2015; 38(4): 237- 245.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), 81-91.
- Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., & Huang, Y. (2008). A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(1), 149-159.
- Braun, S., Gevens, A., Charkowski, A., Allen, C., & Jansky, S. (2017). Potato common scab: A review of the causal pathogens, management practices, varietal resistance screening methods, and host resistance. *American journal of potato research*, 94(4), 283-296.
- Hao, J. J., Meng, Q. X., Yin, J. F., & Kirk, W. W. (2009). Characterization of a new *Streptomyces* strain, DS3024, that causes potato common scab. *Plant disease*, 93(12), 1329-1334.
- Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology*, 42(2), 182-192.
- Kämpfer, P., & Glaeser, S. P. (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era—the polyphasic approach revisited. *Environmental microbiology*, 14(2), 291-317.
- Kers, J. A., Cameron, K. D., Joshi, M. V., Bukhalid, R. A., Morello, J. E., Wach, M. J., ... & Loria, R. (2005). A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Molecular microbiology*, 55(4), 1025-1033.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- King, R. R., & Calhoun, L. A. (2009). The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 70(7), 833-841.
- Kreuze, J. F., Suomalainen, S., Paulin, L., & Valkonen, J. P. (1999). Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the *nec1* gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland. *Phytopathology*, 89(6), 462-469.
- Labeda, D. P., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A. C., Lanoot, B., Vannanneyt, M., ... & Tamura, T. (2012). Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(1), 73-104.
- Labeda, D. P. (2016). Taxonomic evaluation of putative *Streptomyces scabiei* strains held in the ARS Culture Collection (NRRL) using multi-locus sequence analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109(3), 349-356.
- Lambert, D. H., & Loria, R. (1989a). *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(4), 387-392.
- Lambert, D. H., & Loria, R. (1989b). *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(4), 393-396.
- Lapaz, M. I. (2014). Estudio de las cepas de *Streptomyces* spp. causantes de sarna común en la papa en Uruguay. Tesis de Maestría.

- Lapaz, M. I., Huguet-Tapia, J. C., Siri, M. I., Verdier, E., Loria, R., & Pianzzola, M. J. (2017). Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant disease*, 101(8), 1362-1372.
- Law, J. W. F., Tan, K. X., Wong, S. H., Ab Mutalib, N. S., & Lee, L. H. (2018). Taxonomic and Characterization Methods of *Streptomyces*: A Review. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 1(1).
- Li, L., Stoeckert, C. J., & Roos, D. S. (2003). OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome research*, 13(9), 2178-2189.
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics*, 14(1), 60.
- Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., & Göker, M. (2014). Taxonomic use of DNA G+ C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(2), 352-356.
- Miyajima, K., Tanaka, F., Takeuchi, T., & Kuninaga, S. (1998). *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 495-502.
- Park, D. H., Kim, J. S., Kwon, S. W., Wilson, C., Yu, Y. M., Hur, J. H., & Lim, C. K. (2003). *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 2049-2054.
- Rong, X., Guo, Y., & Huang, Y. (2009). Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. *solvifaciens*. *Systematic and applied microbiology*, 32(5), 314-322.
- Rong X and Huang Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three sub- species as 11 genomic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010; 60(3): 696-703.
- Rong, X., & Huang, Y. (2012). Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Systematic and applied microbiology*, 35(1), 7-18.
- Rong, X., & Huang, Y. (2014). Multi-locus sequence analysis: taking prokaryotic systematics to the next level. In *Methods in microbiology* (Vol. 41, pp. 221-251). Academic Press.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Seemann, T. 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30:2068-2069.
- Shirling, E. T., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*, 16(3), 313-340.
- Seipke, R. F., & Loria, R. (2008). *Streptomyces scabies* 87-22 possesses a functional tomatinase. *Journal of bacteriology*, 190(23), 7684-7692.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), 2688-2690.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Volff, J. N., & Altenbuchner, J. (1998). Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Molecular microbiology*, 27(2), 239-246.
- Wanner, L. A. (2007). High proportions of nonpathogenic *Streptomyces* are associated with common scab-resistant potato lines and less severe disease. *Canadian journal of microbiology*, 53(9), 1062-1075.
- Wanner, L. A., & Kirk, W. W. (2015). *Streptomyces*—from basic microbiology to role as a plant pathogen. *American Journal of Potato Research*, 92(2), 236-242.
- Zhang, Y., Bignell, D. R., Zuo, R., Fan, Q., Huguet-Tapia, J. C., Ding, Y., & Loria, R. (2016). Promiscuous Pathogenicity Islands and Phylogeny of Pathogenic *Streptomyces* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(8), 640-650.
- Zhang, Y., & Loria, R. (2017). Emergence of novel pathogenic *Streptomyces* species by site-specific accretion and cis-mobilization of pathogenicity islands. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(1), 72-82.
- Zhang, Y., Jiang, G., Ding, Y., & Loria, R. (2018). Genetic background affects pathogenicity island function and pathogen emergence in *Streptomyces*. *Molecular plant pathology*, 19(7), 1733-1741.

CAPÍTULO 3

Caracterización de la patogenicidad y del potencial para la transferencia horizontal en cepas de *Streptomyces* spp. causantes de sarna común de papa en Uruguay

Parte del contenido de este capítulo está publicado en:

Lapaz, M. I., Huguet-Tapia, J. C., Siri, M. I., Verdier, E., Loria, R., & Pianzzola, M. J. (2017). Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant disease*, 101(8), 1362-1372.

Lapaz, M. I., López, A., Huguet-Tapia, J. C., Pérez-Baldassari, M. F., Iglesias, C., Loria, R., ... & Pianzzola, M. J. (2018). Isolation and structural characterization of a non-diketopiperazine phytotoxin from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. *Natural product research*, 33(20), 2951-2957.

Introducción

La papa es el hospedero más importante afectado por la enfermedad de la sarna común, aunque los cultivos como la remolacha, el rábano y la zanahoria también son susceptibles (Goyer & Beaulieu, 1997). Los patógenos que causan SC no son ni tejido ni huésped específicos, y además de provocar la enfermedad en raíces y tubérculos, pueden infectar plántulas de monocotiledóneas y dicotiledóneas causando atrofia y necrosis tisular de raíces y brotes (Loria *et al.*, 1997). La sarna común puede ser ocasionada por diferentes especies de *Streptomyces*. La patogenicidad en planta de *Streptomyces* se asocia generalmente con la producción de taxtominas, un grupo de metabolitos secundarios fitotóxicos que son dipéptidos cíclicos (2,5 dicetopiperazina) derivados de L-fenilalanina y L-4-nitrotriptofano. La taxtomina A (TxtA) es el miembro de este grupo que se produce mayoritariamente en especies como *S. scabiei*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, y al menos en otras cuatro especies o cepas patógenas (*S. stelliscabiei*, *S. niveiscabiei*, *Streptomyces* sp. IdahoX y *Streptomyces* sp. DS3024) (Bignell *et al.*, 2014; King & Calhoun, 2009). La producción de moléculas de la familia de taxtominas es exclusiva de *Streptomyces* spp. patógenos de plantas e involucra un *cluster* de genes de biosíntesis que está altamente conservado en estas especies (Huguet-Tapia *et al.*, 2016). El *cluster* está constituido por 7 genes, de los cuales 6 (*txtA*, *txtB*, *txtC*, *txtD*, *txtE* y *txtH*), codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis del metabolito y uno (*txtR*) para un regulador de la producción de la fitotoxina (Bignell *et al.*, 2014; Huguet-Tapia *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). La conservación del *cluster* de biosíntesis de la taxtomina entre *Streptomyces* spp. filogenéticamente distintos sugiere que la transferencia horizontal de genes ha desempeñado un papel en la aparición de nuevas especies de *Streptomyces* fitopatógenas en entornos agrícolas (Huguet-Tapia *et al.*, 2016; Loria *et al.*, 2006). En *S. turgidiscabies* Car8, los genes de biosíntesis de la taxtomina, junto con otros factores de virulencia como *nec1*, *tomA* y el operón *fas*, se localizan en una isla de patogenicidad (IPAS_t) de 674 kb. Ésta se puede transferir a otras especies de *Streptomyces* e integrarse por recombinación sitio específica y se ha demostrado que la transferencia de la IPAS_t completa confiere un fenotipo patogénico en la especie no patógena *S. diastatochromogenes* (Huguet-Tapia *et al.*, 2014; Kers *et al.*, 2005). En cepas de *S. scabiei*, *S. acidiscabies*, *S. europaescabiei* y *S. stelleiscabiei*, los genes de virulencia encontrados en IPAS_t, con la excepción del operón *fas*, están localizados en dos regiones separadas en el cromosoma, llamadas región toxicogénica (TR) y región de colonización (CR). Los genes de biosíntesis de la TxtA se encuentran en la TR, mientras que otros genes de virulencia, como *nec1* y *tomA*, se encuentran en la CR (Huguet-Tapia *et al.*, 2014; Lerat *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2016). La TR de *S. scabiei* 87-22 puede dividirse además en 2 sub-regiones (TR1 y TR2) que están flanqueadas por dos sitios de integración (*att*) y están separadas por un sitio interno *att*. La sub-

región TR1, tiene un tamaño de 20 kb y contiene el *cluster* de genes de TxtA, mientras la sub-región TR2, con un tamaño de 157 kb incluye elementos integrativos y de conjugación putativos (Chapleau *et al.*, 2016). Zhang y colegas demostraron que CR y TR1 se encuentran en varias especies diferentes de *Streptomyces* patógenos, mientras que TR2 sólo se conserva en cepas de *S. scabiei*, *S. acidiscabies* a10, *S. stelliscabiei* P3825 y en una cepa patógena *Streptomyces* sp. (96–12) aislada en Egipto (Zhang *et al.*, 2016, Zhang & Loria, 2017). Todo el TR o solo el TR1 están integrados en el extremo 3' del gen *aviXI* que codifica para una proteína putativa de unión a ATP/GTP (Chapleau *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Se ha comprobado que cuando el TR fue transferido a los genomas de cepas receptoras no patógenas, no todas se tornaron patógenas (Chapleau *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016, 2018). Estos estudios han dejado en evidencia que el trasfondo genético de las cepas que adquieren el grupo de genes de taxtomina en la TR y IPAS^t influye en la capacidad de las cepas receptoras para producir taxtomina A (Bignell *et al.*, 2010; Kers *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2018). Esto explicaría por qué la aparición de nuevos patógenos de plantas es relativamente poco frecuente en los sistemas agrícolas (Loria *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2018). En este Capítulo presentamos los resultados de la caracterización fenotípica y genotípica de la patogenicidad, así como el potencial de transferencia de islas de patogenicidad en la colección de las 70 cepas patógenas aisladas en Uruguay.

Objetivos

1. Completar la caracterización fenotípica y genotípica de la patogenicidad de las cepas de *Streptomyces* de la colección generada en trabajos previos.
2. Determinar el potencial de estas cepas para la transferencia horizontal de genes asociados a la patogenicidad

Materiales y Métodos

3.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En este capítulo se utilizaron 70 cepas patógenas de la colección Uruguay de *Streptomyces* reportada por Lapaz *et al.*, 2017 y 5 cepas de referencia que representan las especies más estudiadas asociadas con la sarna común: *S. scabiei* DSM41658^T (T, type strain); *S. stelliscabiei* DSM41803^T; *S. europaeiscabiei* DSM41802^T; *S. acidiscabies* DSM41668^T; y *S. turgidiscabies* DSM41838^T. Las cepas fueron adquiridas de la colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares DSMZ. Las condiciones de cultivo y almacenamiento se encuentran en la

Sección	2.1	del	Capítulo	2.
---------	-----	-----	----------	----

3.2 Ensayo de patogenicidad en rabanito

Desde el punto de vista fenotípico el potencial patogénico de las cepas de la colección se determinó por ensayos de virulencia en rabanito. El test de rabanito realizado se describe en Lapaz *et al.*, 2017. La preparación de las semillas de rabanito (*Raphanus sativus*) variedad redondo rojo se inició mediante la desinfección en etanol al 70% durante 5 minutos. Luego se retiró el alcohol y se agregó hipoclorito de sodio al 15% vol/vol durante 10 minutos. Se retiró el hipoclorito de sodio y se enjuagó 5 veces con agua destilada estéril. Se colocaron las semillas separadas en una placa de Petri que contenía un papel de filtro whatman #4 previamente humedecido con 2 ml de agua estéril. Se selló la placa con parafilm y se incubaron las semillas para su germinación por 24-36 horas a 28°C en la oscuridad. Por otro lado, en placas de Petri que contenían 50 ml de agar agua al 15% se realizaron 6 hoyos de 9mm de diámetro y se colocó una semilla germinada en cada uno de ellos. Se inoculó cada semilla con 200 µl de una suspensión de células de $DO_{600} = 1$. El inóculo se preparó a partir de un cultivo de *Streptomyces* sp. en 5 ml de TSB incubado durante 2 a 3 días a 28°C en *shaker* a 200rpm. Se tomó una alícuota de 2ml en un tubo eppendorf y se centrifugó a 10.000 *g* por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se lavó con agua destilada estéril. Se midió la absorbancia a 600nm y se llevó a una $DO_{600} = 1$. Se utilizó una placa por cepa y se realizó un control negativo con agua destilada estéril. Las placas inoculadas se cerraron con parafilm y se incubaron durante 6 días a 25°C con un fotoperíodo de 12-16hs. Luego se determinó el largo de las raíces con respecto a los controles positivo y negativo.

3.3 Extracción y Detección de taxtomina A

La extracción y detección del compuesto taxtomina A fue llevado a cabo siguiendo el protocolo descrito por Johnson *et al.*, (2007) con pequeñas modificaciones. Las cepas de *Streptomyces* fueron cultivadas en 5ml de medio TSB durante 48-72 hs. Las células se centrifugaron a 10.000 *g*, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en 1 ml de agua estéril. Para el análisis de la producción de taxtomina se utilizó el medio *oat bran broth* (OBB), el cual es inductor de la producción de dicha toxina. Se inocularon tres matraces de 50 ml con medio OBB con 200 µl de una suspensión de células de $DO_{600} = 1$. Los cultivos fueron incubados durante 7 días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación a ~ 150 rpm. Se tomó una alícuota de 15 ml en un tubo falcon y se dejó a -20°C durante la noche. La alícuota se descongeló y se centrifugó a 4000 *g* durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. La taxtomina A se purificó a partir de los sobrenadantes utilizando una columna Discovery® C18 SPS. Previamente la columna fue acondicionada aplicando 1ml 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 luego se agregó 1 ml de

metanol al 25%. Por último se eluyó la taxtomina A agregando 1 ml de metanol al 100%. Para la detección de la toxina se utilizó un HPLC Shimadzu Prominence LC-20AT equipado con un detector de arreglos de diodo SPD-M20A y equipado con una columna Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (4.6 x 250 mm, tamaño de partícula 5 µm). Los extractos fueron cargados en la columna de HPLC, se eluyeron con una fase móvil isocrática (40% de acetonitrilo y 60% de agua) a un caudal constante de 1,0 ml/min y se monitorizaron a 380 nm. La taxtomina A se identificó por comparación de su tiempo de retención con el de un estándar obtenido a partir de una cepa productora de la toxina (Material otorgado por Laboratorio Dra. Loria, University of Florida, EE.UU).

3.4 Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico de las cepas de *Streptomyces* se realizó según el método reportado por Sambrook y Russell (2001) con modificaciones, detallado en materiales y métodos del Capítulo 2, Sección 2.2.

3.5 Determinación de la presencia de genes asociados a la patogenicidad (*txtA*, *fas4* y *fas5*)

Para todas las cepas patógenas de la colección, una cepa no patógena, *Streptomyces* sp. ST101 y las 5 cepas de referencia se realizó la amplificación de la región del operón *fas* que abarca parcialmente los genes *fas4* y *fas5* que codifican para una Isopentenil transferasa y una citoquinina oxidasa respectivamente. Se utilizaron los *primers* JH279 y JH280 (previamente diseñados por Dr. José Huguet Tapia, co-tutor de esta tesis) (Tabla 3.1). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25µl, cada una conteniendo 1X de Buffer de reacción, 1.5mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.4µM de cada *primer*, 10% v/v de DMSO, 1.25U de la enzima *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen, EE.UU) y 50ng de ADN genómico. Para las cepas patógenas de *Streptomyces* spp. y las 5 cepas de referencia se realizó la amplificación del gen *txtA* que codifica para una sintetasa involucrada en la biosíntesis de la taxtomina A. Se utilizaron los cebadores *txtA_F* y *txtA_R* diseñados por Chapleau *et al.*, 2016 (Tabla 3.1). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25µl, cada una conteniendo 1X de Buffer de reacción, 1.5mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.5µM de cada cebador, 10% v/v de DMSO, 1.0U de la enzima *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen, EE.UU) y 1µl de ADN genómico. Las condiciones del ciclo de reacción para ambas reacciones fueron: 94°C/3min, [95°C/45seg, temperatura de *annealing* (Tabla 3.1)/30seg, 72°C/90seg]/30 ciclos, 72°C/10min, 20°C/10min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, EE.UU). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de

agarosa al 1% (p/v) con 0.5 µg/ml de Goodview (SBS Genetech Co., Ltd.) y se fotografiaron bajo luz UV. Para estimar el tamaño se utilizó como referencia el marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, EE.UU).

3.6 Determinación de la presencia de genes involucrados en la movilidad de las islas de patogenicidad

La presencia de estos genes se determinó para toda la colección de cepas patógenas, la cepa no patógena ST101 y 5 cepas de referencia. La amplificación por PCR del gen de la integrasa *IntSt* se realizó utilizando los *primers* IntF y IntX diseñados por Huguet-Tapia *et al.*, 2014. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25µl, cada una conteniendo 1X de Buffer de reacción, 1.5mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.4µM de cada cebador, 1.25U de la enzima Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen, EE.UU) y 1µl de ADN genómico. Por otro lado se optimizaron las reacciones de PCR para la amplificación de los genes que intervienen en la movilización del *cluster* de taxtomina A y se encuentran en la región TR2 (Chapleau *et al.*, 2016). Estos son los genes *Int*, que codifica para una integrasa, y el gen *SCAB_32001* que codifica para una proteína hipotética conservada en el genoma de *S. scabiei* 87-22, que forma parte del *cluster* de biosíntesis de un lantibiótico (péptido antimicrobiano) y que en esta tesis denominaremos *Lan*. Las reacciones para ambos genes se realizaron en un volumen total de 25µl, cada una conteniendo 1X de Buffer de reacción, 1.5mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.5µM de cada *primer* (Tabla 3.1), 10% v/v de DMSO, 1.0U de la enzima Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen, EE.UU) y 50ng de ADN genómico. Las condiciones del ciclo de reacción para la amplificación de los tres genes mencionados fueron: 94°C/3min, [94°C/45seg, temperatura de *annealing* (Tabla 3.1)/30seg, 72°C/1min]/30 ciclos, 72°C/10min, 20°C/10min. Las reacciones de amplificación fueron optimizadas mediante PCR en gradiente en el termociclador Gradient Palm-Cycler (Corbett). Las amplificaciones de rutina se realizaron tanto en este termociclador como en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, EE.UU). Los productos obtenidos en las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1% p/v) con GoodView y se fotografiaron bajo luz UV. Para estimar el tamaño se utilizó como referencia el marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, EE.UU). Se seleccionaron algunos productos de PCR del tamaño esperado para ser secuenciados.

Tabla 3.1. Primers utilizados en el Capítulo 3

Gen	Primer	Secuencia 5'–3'	Ta*°C	Producto (pb)	Referencia
Involucrado en patogenicidad					
fas4- fas5	JH279	GAGTTCCGTCATGTCCAGC	50	1000	1
	JH280	CGTCAGCGCAGCGGGGACTAC			
txtA	txtA_F	GGTACTCGTGCCACATCTGCATCT	65	978	2
	txtA_R	AACGAACTCAGCCGCTATCGCTAC			
Involucrado en TGH					
IntSt	IntF	GGTCGACATATGCCCTACATCGAGTGG	60	700	3
	IntX	C AGTGAAGCTTCTATGACCACTTAGCCT TG			
Int	Int20_F	GTAGCGAAGGCGAGAGTCTCACTG	65	655	2
	Int20_R	GAGCCGACGAACAAGTACTACCCG			
Lan	lantCF	TGTCCTGACACGCATTTCATC	58	368	2
	lantCR	GTCATGGTCTTGGCGAATCT			

Referencias: (1) José Huguet-Tapia, (2) Chapleau *et al.*, 2016 y (3) Huguet-Tapia *et al.*, 2014.

*Ta= Temperatura de *annealing*

3.7 Secuenciado y Análisis de secuencias

Los productos de PCR del tamaño esperado fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones por el Servicio MacroGen (Kumchun ku, Seúl, Corea). Las secuencias fueron editadas utilizando el programa Geneious Pro 4.8.5 (Biomatters, Auckland, New Zealand) y comparadas en NCBI BLAST Database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.8 Búsqueda y Comparación de Islas genómicas de patogenicidad reportadas

En los 5 genomas secuenciados y analizados en el Capítulo 2 (Acceso GenBank No: PCGT000000000, PCGU000000000, PCGS000000000, LXWC000000000, LXWD000000000) se realizó la búsqueda de islas de patogenicidad ya descritas para *Streptomyces* patógenos de papa. Las comparaciones genómicas se llevaron a cabo utilizando los programas BLAST y el *Algorithm Based Automatic Contiguation of Assembled Sequences* (ABACAS) el cual mapea los *contigs* con la secuencia de referencia, orienta y ordena. Los resultados de las comparaciones se visualizaron en el programa ACT. Se utilizó como referencia el genoma de *Streptomyces turgidiscabies* Car8 (Acceso GenBank No: AEJB000000000) para la búsqueda de la isla reportada previamente (Huguet-Tapia *et al.*, 2011). Para realizar las comparaciones se utilizó un fragmento de dicha isla al cual denominamos IPAS (IPA en *S. turgidiscabies* Car8) y que abarca la región del genoma desde 1432323pb hasta 2107293pb. Por otro lado se realizó la comparación de la

región TR de 177 kb reportada para *S. scabiei* 87-22 por Chapleau *et al.*, 2016. Esta región contiene las subregiones TR1 y TR2 (que en esta tesis se denomina IPASsc y que corresponde a la región TR en *S. scabiei* 87-22) y abarca la región del genoma desde la base 6374014 hasta la base número 6551096 (Acceso GenBank No: NC_013929, Bignell *et al.*, 2010). Una vez encontradas dichas islas en las cepas secuenciadas, se ordenaron los *contigs* que la forman en una pseudomolécula, la cual se anotó mediante la plataforma RAST. Por último se compararon las pseudomoléculas de las islas encontradas entre si mediante BLAST.

Resultados

Potencial patogénico de los aislamientos de la colección

Ensayo de patogenicidad en rabanito

Se realizaron los ensayos de virulencia en rabanito para 70 cepas de la colección, las 5 cepas de referencia y una cepa no patógena *Streptomyces* sp. ST101. La inhibición del crecimiento de las raíces y los brotes en rabanito confirmó la virulencia de las 70 cepas de la colección y las 5 cepas de referencia. Por el contrario, tanto en los controles negativos (cepa no patógena) como en el agua estéril se observó crecimiento de raíz. En la Figura 3.1 se muestran a modo de ejemplo plantas inoculadas con una cepa patógena, una no patógena y el control negativo (agua). En la Tabla 3.2 se detallan datos sobre las cepas utilizadas y el resultado del ensayo de patogenicidad.

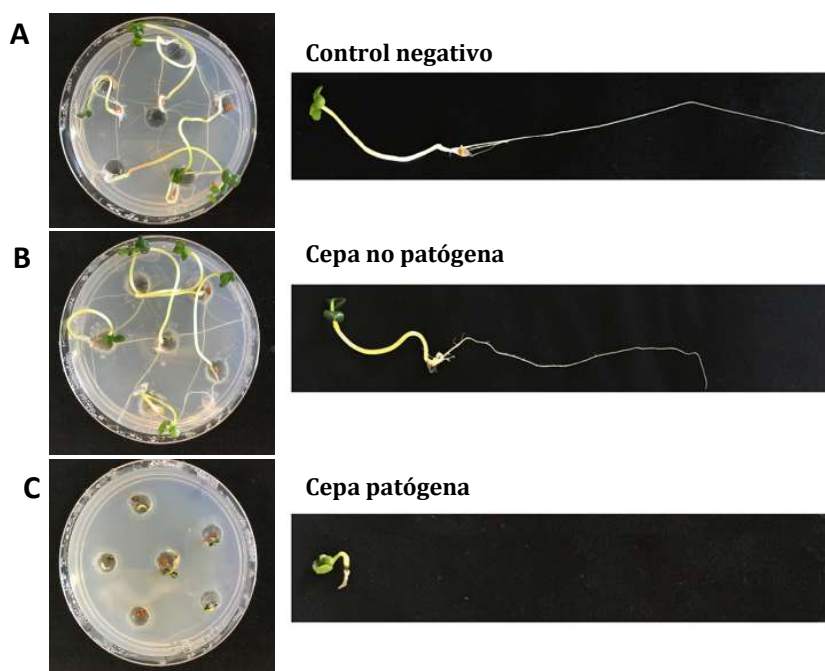


Figura 3.1. Ensayo de patogenicidad en rabanito. A la izquierda se observan las placas donde se inocularon las 6 plantas y a la derecha una planta representativa de cada placa. **A.** Se inoculó con agua. **B.** Se inoculó el control negativo cepa ST101 y en **C.** Se inoculó con el control positivo *S. acidiscabiei* DSM41668.

Extracción y detección de taxtomina A por HPLC

Se optimizó la extracción y determinación de la producción de taxtomina A (TxtA) por HPLC. Se realizó el ensayo para la detección de taxtomina A en 23 cepas de la colección incluyendo las 5 cepas secuenciadas, una cepa de *Streptomyces* sp. no patógena ST101 y tres cepas de referencia *S. scabiei* DSM41658, *S. acidiscabies* DSM41668 y *S. stelliscabiei* DSM41803. Se detectó la producción de taxtomina en 11 de las 22 cepas patógenas analizadas. Estas cepas corresponden a 4 *S. acidiscabies* (ST105, ST106, ST113 y ST116), 5 *S. scabiei* (ST1113, ST124, ST127, ST129 y ST1232), una *S. europaescabiei* ST1229 y una cepa de *Streptomyces* sp. ST1213. Se detectó la taxtomina en las 3 cepas de referencia analizadas y no se detectó en la cepa no patógena *Streptomyces* sp. ST101. No se detectó la TxtA en ninguna de las 6 cepas de *S. niveiscabiei* analizadas (ST109, ST1011, ST1015, ST1016, ST1017 y ST1020), en *S. acidiscabies* ST112, y las cepas *Streptomyces* spp. ST1125, ST1127, ST1135 y ST1218. En la Tabla 3.2 se detalla el resultado de la producción de taxtomina para las cepas analizadas. En la Figura 3.2 se muestran a modo de ejemplo espectros de HPLC obtenidos a 380nm del control negativo metanol, control positivo (extracto estándar de TxtA) y dos de las cepas analizadas: una que produce TxtA (ST1229) y otra que no la produce (ST1015).

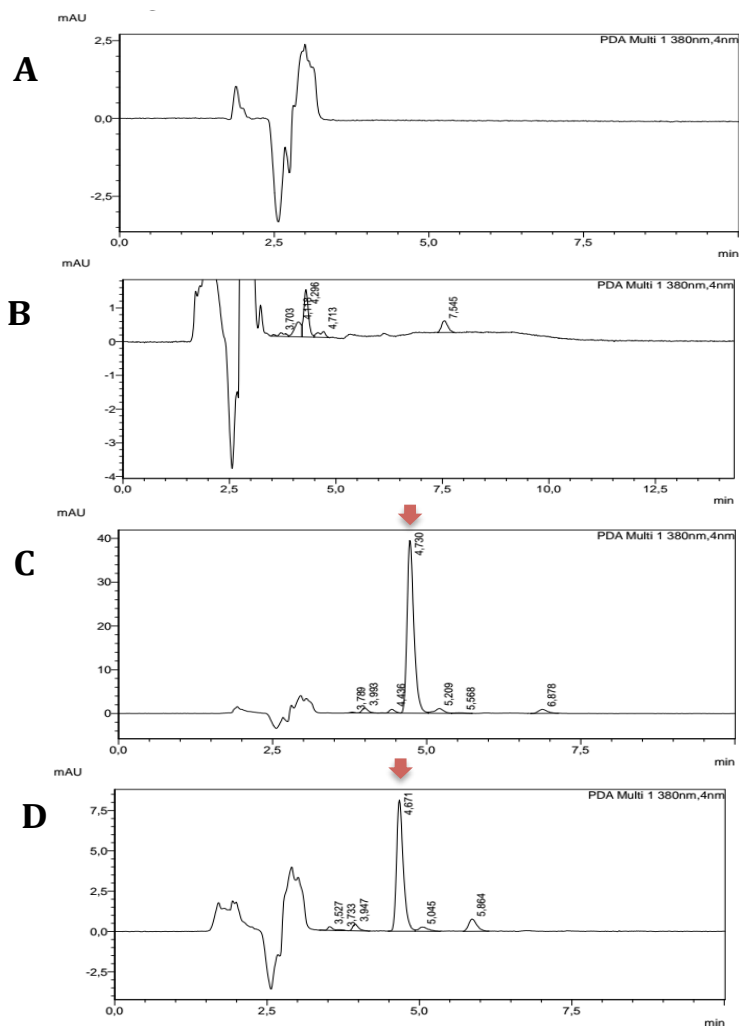


Figura 3.2. Espectros obtenidos a 380nm a partir de la extracción de taxtomina de los sobrenadantes del cultivo de cepas en medio OBB. Con las flechas rojas se señala el pico correspondiente a la toxina el cual corresponde a un tiempo de retención de ~4.7 min. **A.** Metanol como blanco. **B.** Cepa ST1015. **C.** Estándar de taxtomina 0.5mg/ml. **D.** Cepa ST1229.

Potencial de los aislamientos patógenos de papa para la transferencia horizontal de genes involucrados en la patogenicidad

Genes involucrados en la patogenicidad y transferencia de islas genómicas

Se realizó la detección mediante PCR de genes involucrados en la patogenicidad y en la transferencia de islas de patogenicidad a toda la colección de aislamientos patógenos, a un aislamiento de *Streptomyces* sp. no patógeno y a las cinco cepas de referencia. Se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado (~978pb) para el gen *txtA* perteneciente al *cluster* de biosíntesis de la taxtomina A para las 5 cepas de referencia y 29 cepas patógenas, de estos amplicones 15 fueron secuenciados confirmando la presencia de dicho gen. Las 29 cepas que amplificaron el gen *txtA* son: 8 cepas de *S. acidiscabies* (ST104, ST105, ST106, ST112, ST113, ST114, ST115 y ST116), 2 cepas de *S. niveiscabiei* (ST108 y ST1016), 12 cepas de *S. scabiei*

(ST1113, ST1114, ST124, ST125, ST126, ST127, ST128, ST129, ST1210, ST1230, ST1232 y ST1236), *S. europaescabiei* ST1229 y 5 cepas *Streptomyces* sp. (ST119, ST1136, ST1140, ST123, ST1227 y ST1213) Respecto a los genes que forman parte del operón *fas*, se amplificaron fragmentos del tamaño esperado (~1000pb) para las 15 cepas de la especie *S. niveiscabiei* y la cepa de referencia de *S. turgidiscabies* DSM41838. Los productos de amplificación fueron secuenciados y analizados, confirmando la presencia de dichos genes para *S. turgidiscabies* DSM41838 y no así para el caso de las cepas de *S. niveiscabiei*, para las cuáles se obtuvieron productos de amplificación inespecíficos. Para el gen de la integrasa *IntST* se observó amplificación del tamaño esperado (~700pb) únicamente para la cepa de referencia de *S. turgidiscabies* DSM41838, confirmada por secuenciado. Finalmente se amplificaron los genes *int* y *Lan* presentes en la región donde se encuentran los genes candidatos con funciones conocidas en recombinación, replicación y transferencia. Se observaron productos de amplificación del tamaño esperado para el gen *int* en 13 cepas (10 *S. scabiei* (ST1113, ST1114, ST125, ST126, ST127, ST128, ST129, ST1210, ST1230 y ST1236), 2 *Streptomyces* spp. (ST1140 y ST1227) y *S. niveiscabiei* ST1016) y para el gen *Lan* en 11 cepas de la colección (10 *S. scabiei* (ST1113, ST1114, ST125, ST126, ST127, ST128, ST129, ST1210, ST1230 y ST1236) y *Streptomyces* spp. ST1140) los cuales fueron confirmados por secuenciado. Las secuencias y los resultados del análisis de las mismas mediante BLASTx utilizando la base de datos NCBI se encuentran en el ANEXO III y II respectivamente. En la Tabla 3.2 se presentan los resultados en conjunto, los cuales pueden ser agrupados en 4 grupos teniendo en cuenta la presencia o ausencia de los 3 genes evaluados para la región TR de las IPAs. Para 41 cepas de la colección no se observó amplificación para ninguno de los 3 genes por lo cual no existe la región TR en estas cepas. Para 16 cepas se detectó únicamente el gen *txtA* de la región TR1. Por otro lado un grupo de 11 cepas posee tanto los genes de la región TR1 como de la región TR2. Diez de estas cepas pertenecen a la especie *S. scabiei* y la cepa ST1140 esta filogenéticamente emparentada con *S. europaescabiei*. Por último las cepas *Streptomyces* sp. ST1227 y *S. niveiscabiei* ST1016 poseen los genes *txtA* e *int*.

Tabla 3.2. Características de las cepas respecto a su patogenicidad y potencial de transferencia horizontal.

Cepa	^a Género/ especie	^b Patogenicidad en rabanito	^c <i>fas4</i> <i>/fas5</i>	^c <i>intSt</i>	^d Producción de TxtA	Región TR (IPA Ssc/Sac)		
						^c <i>txtA</i> (TR1)	^c <i>Int</i> (TR2)	^c <i>Lan</i> (TR2)
ST101	Ssp	-	-	-	-	-	-	-
ST103	Sac	+	-	-	ND	-	-	-
ST104	Sac	+	-	-	ND	+	-	-
ST105	Sac	+	-	-	+	+	-	-
ST106	Sac	+	-	-	+	+	-	-
ST107	Sniv	+	-	-	ND	-	-	-
ST108	Sniv	+	-	-	ND	+	-	-
ST109	Sniv	+	-	-	-	-	-	-
ST1010	Sniv	+	-	-	ND	-	-	-
ST1011	Sniv	+	-	-	-	-	-	-
ST1012	Sniv	+	-	-	ND	-	-	-
ST1013	Sniv	+	-	-	ND	-	-	-
ST1014	Sniv	+	-	-	ND	-	-	-
ST1015	Sniv	+	-	-	-	-	-	-
ST1016	Sniv	+	-	-	-	+	+	-
ST1017	Sniv	+	-	-	-	-	-	-
ST1018	Sniv	+	-	-	ND	-	-	-
ST1019	Sniv	+	-	-	ND	-	-	-
ST1020	Sniv	+	-	-	-	-	-	-
ST1021	Sniv	+	-	-	ND	-	-	-
ST111	Sac	+	-	-	ND	-	-	-
ST112	Sac	+	-	-	-	+	-	-
ST113	Sac	+	-	-	+	+	-	-
ST114	Sac	+	-	-	ND	+	-	-
ST115	Sac	+	-	-	ND	+	-	-
ST116	Sac	+	-	-	+	+	-	-
ST119	Ssp	+	-	-	ND	+	-	-
ST1113	Ssc	+	-	-	+	+	+	+
ST1114	Ssc	+	-	-	ND	+	+	+
ST1116	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1118	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1119	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1121	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1123	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1124	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1125	Ssp	+	-	-	-	-	-	-
ST1127	Ssp	+	-	-	-	-	-	-
ST1128	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-

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

^(b) Patógeno en rabanito (+). No patógeno en rabanito (-).

^(c) Presencia (+) o ausencia (-) del gen. Los casilleros que se encuentran coloreados en gris representan la confirmación por secuenciado.

^(d) Producción de taxtomina A (+). No producción de taxtomina A. No determinado (ND).

Tabla 3.2 (Continua). Características de las cepas con respecto a su patogenicidad y potencial de transferencia horizontal.

Región TR (IPA Sturg)					Región TR (IPA Ssc/Sac)			
Cepa	^a Género /especie	^b Patogenicidad en rabanito	^c fas4 /fas5	^c intSt	^d Producción de TxtA	^c txtA (TR1)	^c Int (TR2)	^c Lan (TR2)
ST1131	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1133	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1134	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1135	Ssp	+	-	-	-	-	-	-
ST1136	Ssp	+	-	-	ND	+	-	-
ST1137	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1140	Ssp	+	-	-	ND	+	+	+
ST1142	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST121	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST123	Ssp	+	-	-	ND	+	-	-
ST124	Ssc	+	-	-	+	+	-	-
ST125	Ssc	+	-	-	ND	+	+	+
ST126	Ssc	+	-	-	ND	+	+	+
ST127	Ssc	+	-	-	+	+	+	+
ST128	Ssc	+	-	-	ND	+	+	+
ST129	Ssc	+	-	-	+	+	+	+
ST1210	Ssc	+	-	-	ND	+	+	+
ST1211	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1212	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1213	Ssp	+	-	-	+	+	-	-
ST1214	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1218	Ssp	+	-	-	-	-	-	-
ST1221	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1222	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1224	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1225	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1227	Ssp	+	-	-	ND	+	+	-
ST1228	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1229	Seu	+	-	-	+	+	-	-
ST1230	Ssc	+	-	-	ND	+	+	+
ST1232	Ssc	+	-	-	+	+	-	-
ST1234	Ssp	+	-	-	ND	-	-	-
ST1236	Ssc	+	-	-	ND	+	+	+
DSM41658	Ssc	+	-	-	+	+	-	-
DSM41803	Sst	+	-	-	+	+	-	-
DSM41802	Seu	+	-	-	ND	+	-	-
DSM41668	Sac	+	-	-	+	+	-	-
DSM41838	Stu	+	+	+	ND	+	-	-

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

^(b) Patógeno en rabanito (+). No patógeno en rabanito (-).

^(c) Presencia (+) o ausencia (-) del gen. Los casilleros que se encuentran coloreados en gris representan la confirmación por secuenciado.

^(d) Producción de taxtomina A (+). No producción de taxtomina A. No determinado (ND).

Búsqueda y Comparación de Islas de patogenicidad

En los genomas secuenciados se realizó la búsqueda e identificación de factores de virulencia y genes involucrados en la movilidad de islas de patogenicidad (IPA). Para la caracterización de las islas se realizó la comparación de 5 genomas secuenciados con la secuencia perteneciente a la IPA de *S. turgidiscabies* Car 8 (IPAst) y la secuencia que pertenece a la región TR de la isla de *S. scabiei* 87-22 (IPAssc). Los resultados de la comparación de los genomas y las secuencias mencionadas mediante los programas BLAST y ABACAS determinaron que las cepas ST105, ST129 y ST1229 poseen islas de patogenicidad mientras que para las cepas ST1015 y ST1020 no se encontraron rastros de las mismas en su genoma. En la Tabla 3.3 se muestran en orden, los *contigs* que forman parte de las regiones CR y TR de las islas de las cepas ST105, ST129 y ST1229. La comparación de las regiones se realiza de manera separada debido a que se encuentran distantes en los genomas de las especies en estudio (~4.9MB).

Tabla 3.3. *Contigs* en orden que forman parte de las diferentes regiones en las islas de patogenicidad para las cepas ST105, ST129 y ST1229.

Especie	Cepa	Región CR	Región TR
<i>S. acidiscabies</i>	ST105	19, 8 y 968	490 y 23
<i>S. scabiei</i>	ST129	182, 5 y 30	14, 8, 58, 20 y 51
<i>S. europeiscabiei</i>	ST1229	247, 8 y 21	40

A partir de los resultados anteriores se construyeron las pseudomoléculas de cada región de las islas para cada cepa. Esto se realizó uniendo los *contigs* en el orden que se detallan en la Tabla 3.3. Las pseudomoléculas fueron comparadas con la secuencias IPAst y IPAssc mediante ABACAS y BLAST, los resultados fueron visualizados en el programa ACT. En la Figura 3.3 se muestran como ejemplo los resultados de las comparaciones de las pseudomoléculas de la región CR de la isla de las 3 cepas con la secuencia de la IPA de *S. turgidiscabies* Car8. Se observa que esta región está bastante conservada pero no es 100% idéntica

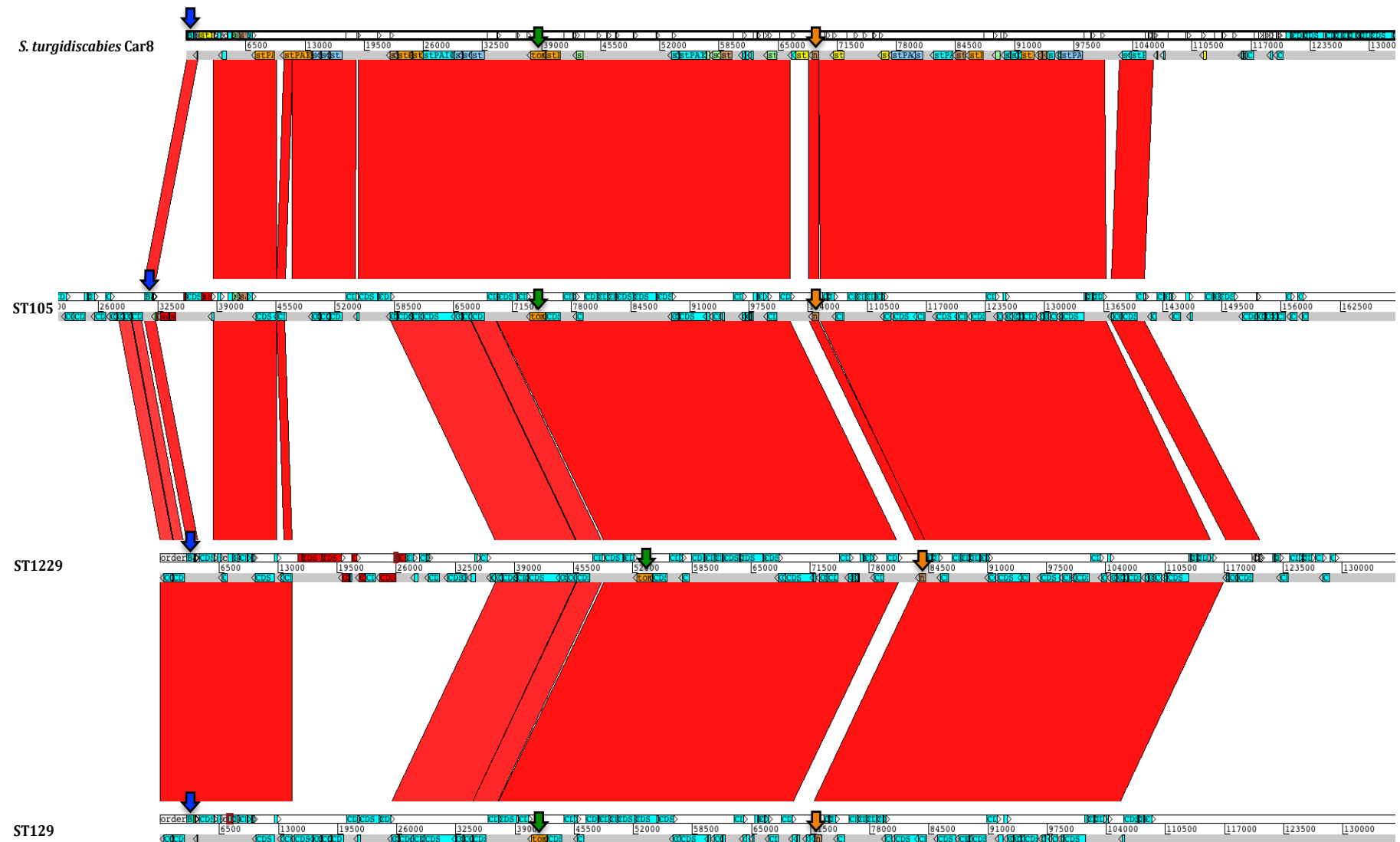


Figura 3.3. Comparación de la regiones CR de las IPAs de *S. turgidiscabies* Car8, ST105, ST1229 y ST129. Mediante flechas se indican los genes *bacA* (azul), *tomA* (verde) y *nec1* (naranja).

Para realizar la comparación detallada de las islas se realizó la búsqueda de genes involucrados en la patogenicidad y en la movilización de las mismas mediante BLASTn en los genomas secuenciados. Los genes buscados y los resultados para cada cepa se detallan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Resultados del BLASTn de genes que forman parte de las IPA reportadas en los 5 genomas secuenciados.

			ST105		ST129		ST1229		ST1015		ST1020	
			% Identidad	Ubicación en el genoma (Nombre del Contig)	% Identidad	Ubicación en el genoma (Nombre del Contig)	% Identidad	Ubicación en el genoma (Nombre del Contig)	% Identidad	Ubicación en el genoma (Nombre del Contig)	% Identidad	Ubicación en el genoma (Nombre del Contig)
Nombre del gen	Possible Función	Secuencia utilizada como Referencia										
Región TR1	<i>IntST</i>	Integrasa	STRTUCAR8_02003									
	<i>Xis</i>	Excisionasa	STRTUCAR8_02002									
	<i>fas6</i>	Lisina Descarboxilasa	STRTUCAR8_01741									
	<i>fas1</i>	Citocromo P450	STRTUCAR8_01737									
	<i>fas2</i>	Ferredoxina α Piruvato Descarboxilasa	STRTUCAR8_01736									
	<i>fas3</i>	α Piruvato Descarboxilasa	STRTUCAR8_01735									
	<i>fas4</i>	Isopentenil transferasa	STRTUCAR8_01734									
	<i>fas5</i>	Citoquinina Oxidasa	STRTUCAR8_01733									
	<i>txtC</i>	P450 monooxigenasa	SCAB_31761	100.00	23	100.00	51	99.75	40			
	<i>txtH</i>	Proteína MbtH	SCAB_31771	100.00	23	100.00	51	100.00	40			
	<i>txtB</i>	Taxtomina sintetasa B	SCAB_31781	100.00	23	100.00	51	99.87	40			
	<i>txtA</i>	Taxtomina sintetasa A	SCAB_31791	100.00	23	99.98	51	99.77	40			
	<i>txtR</i>	Proteína Reguladora	SCAB_31801	100.00	23	100.00	20	99.41	40			
	<i>txtE</i>	P450 monooxigenasa	SCAB_31831	100.00	490	100.00	20	99.67	40			
	<i>txtD</i>	Oxido Nitríco Sintetasa	SCAB_31841	99.91	490	100.00	20	99.83	40			
Región TR2	<i>int</i>	Integrasa	SCAB_31871			100.00	20					
		Factor de recombinación direccional	SCAB_31881			100.00	20					
	<i>lanK</i>	Proteína Hipotética Conservada	SCAB_31961			100.00	20					
	<i>lanR</i>	Proteína Hipotética Conservada	SCAB_31981			100.00	20	90.85	60			
	<i>lanB</i>	Putativa Lantibiótico deshidratasa	SCAB_32031			99.90	20					
	<i>lanC</i>	Proteína putativa lantionina sintetasa C	SCAB_32041			100.00	20					
	<i>lanA</i>	Proteína Hipotética Conservada	SCAB_32051			100.00	20					
		Proteína Hipotética Conservada	SCAB_32241	84.64	18	100.00	20	90.93	182			
		Relaxasa	SCAB_32301			100.00	58					
		Relaxasa	SCAB_32311	75.66	571	99.89	58	88.61	228			
		Proteína Hidrofóbica	SCAB_32341	79.90	301	100.00	58	91.25	228			
		Proteína Hidrofóbica	SCAB_32361			100.00	58	91.78	228			
		Proteína de membrana	SCAB_32791	85.14	563	100.00	8	90.68	83			
		ATPasa	SCAB_32961			99.94	8					
		Proteína Hidrofóbica	SCAB_33121			99.87	14	90.13	9			
		Proteína de acoplamiento	SCAB_33161	83.48	328	99.94	14	86.98	9			
		Hidrolasa	SCAB_33181			100.00	14	92.32	9			
		Proteína Hidrofóbica	SCAB_33281			99.63	14	85.45	9			
	<i>AviX1</i>	Proteína putativa de unión a ATP/GTP	SCAB_33441	91.93	490	99.82	14	94.31	40	90.20	57	90.20 9
Región CR	<i>nec1</i>	Proteína Necrogénica	STRTUCAR8_10194	100.00	968	99.85	30	100.00	21			
	<i>tomA</i>	Tomatina	STRTUCAR8_01372	99.81	8	100.00	5	100.00	8			
	<i>bacA</i>	Proteína de resistencia a la bacitracina	STRTUCAR8_01342	84.51	19	87.34	182	87.57	247	82.59	38	82.59 1

Las secuencias de referencia se extrajeron de los genomas reportados de *S. turgidiscabies* Car8 (STRTUCAR8_) y el genoma de *S. scabiei* 87-22 (SCAB_). Los espacios en blanco de la tabla se deben a que no se encuentra una secuencia similar al gen comparado dentro de los genomas.

Estos resultados se resumen en un esquema que muestra la organización genética de las Islas en las cepas secuenciadas y en los genomas utilizados como referencia (Figura 3.4).

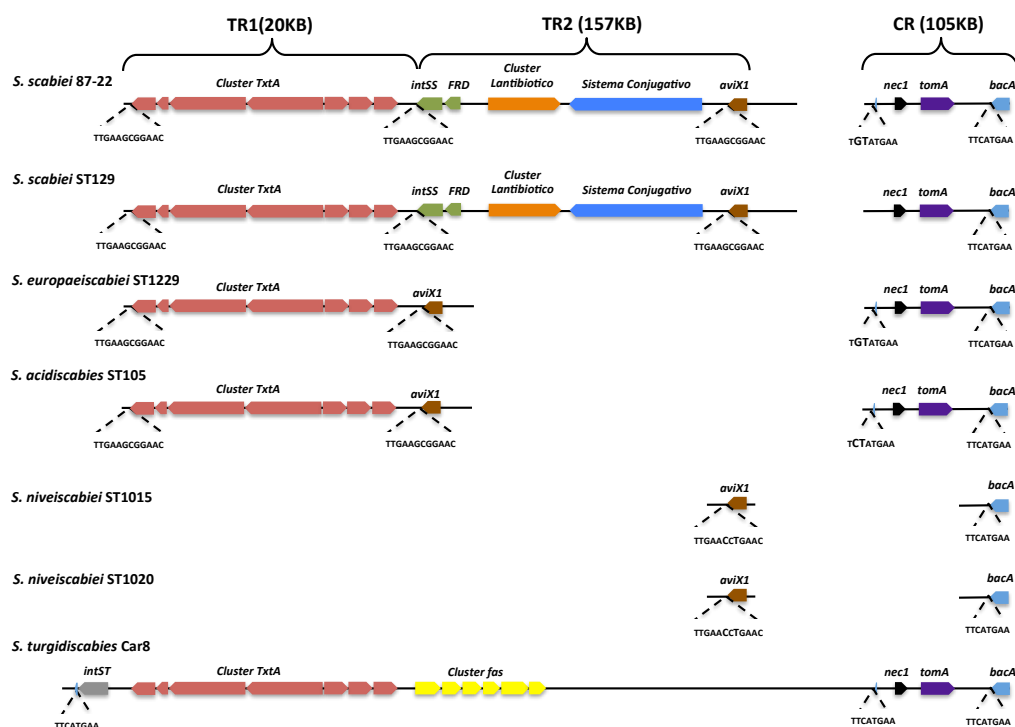


Figura 3.4. Organización genética de las islas de patogenicidad de cepas Uruguayas. Como referencia en la Figura se muestran las estructuras de las islas de patogenicidad de *S. turgidiscabies* Car8 y *S. scabiei* 87-22. En la región de colonización (CR) se encuentran los genes *tomA* que codifica para un homólogo de la tomatinasa, *nec1* para una proteína necrogénica y el gen *bacA* para una proteína de resistencia a bacitracina. En la región toxicogénica TR1 se encuentra el cluster TxA que incluye los genes de biosíntesis para la taxtomina A, en el caso de la cepa de *S. turgidiscabies* además se encuentra el cluster *fas* que codifica para una fitohormona citoquinina y el gen *intSt* que codifica para una integrasa. En la región TR2 se encuentra el cluster Lan que codifica para un lantipéptido, el gen *int* para una integrasa, el gen *FRD* para un factor de recombinación direccional, el gen *aviX1* para una proteína putativa de unión a ATP/GTP y el sistema conjugativo posee presuntos genes involucrados en la transferencia del cluster TxA. Las regiones de las islas están delimitadas por secuencias palindrómicas (*att*), donde la recombinación y la escisión ocurren.

Para las cepas de *S. acidiscabies* ST105 y *S. europaeiscabiei* ST1229 se observó que las islas poseen la región CR y la región TR1. No se constató la presencia de genes involucrados en la movilización de estas islas. En el caso de las cepas de *S. niveiscabiei* ST1015 y ST1020 no se observaron genes pertenecientes a las islas de patogenicidad reportadas. En dichos genomas se encuentran el gen *bacA* con su sitio *att* intacto y el gen *AviX1* posee el sitio *att* diferente al observado para las cepas reportadas que poseen la región TR. Para la cepa de *S. scabiei* ST129 se observó que la isla posee la región CR mientras que la región TR posee tanto la región TR1 y todos los genes presuntamente involucrados en la movilización del cluster de taxtomina A (TxA) que forman parte de la región TR2. Por lo tanto, la cepa de *S. scabiei* aislada en Uruguay posee potencial para movilizar dicho cluster.

Discusión

El presente trabajo constituye el primer estudio en Uruguay respecto al potencial de transferencia de la patogenicidad en cepas de *Streptomyces* causantes de sarna común. La transferencia horizontal de genes es un mecanismo importante para la evolución de los genomas microbianos. Se sabe que las islas de patogenicidad, son elementos genéticos móviles que contribuyen a los rápidos cambios en el potencial de virulencia, y a la evolución del genoma en muchos patógenos bacterianos (Dobrindt *et al.*, 2004). La patogenicidad de las 70 cepas de la colección generada en trabajos previos, se confirmó mediante ensayo en rabanito, el cual es más sensible que el ensayo en discos de papa utilizado en una primera instancia (Lapaz *et al.*, 2017). Se realizó la extracción y detección de taxtomina A por HPLC a 22 de las 70 cepas. Esta fitotoxina es considerada el principal factor de virulencia en el género *Streptomyces*. En 11 de las 22 cepas patógenas analizadas se detectó TxtA y de las 11 cepas que no producen TxtA, 6 fueron identificadas como *S. niveiscabiei*, una como *S. acidiscabies* y 4 no pudieron ser identificadas a nivel de especie. Esto es interesante debido a que en las especies *S. niveiscabiei* y *S. acidiscabies* anteriormente se reportó la producción de taxtomina (Park *et al.*, 2003; Bukhalid *et al.*, 2018). Estos resultados indican que la colección no sólo posee diversidad a nivel de especie, sino que también incluye cepas variadas en su patogenicidad. No es frecuente el reporte de cepas de *Streptomyces* causantes de sarna común que no produzcan TxtA, lo que hace a nuestra colección un recurso valioso para conocer nuevos factores involucrados en el desarrollo de la sarna común (Cao *et al.*, 2012; Fyans *et al.*, 2016; Natsume *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2003). Además de detectar la producción de taxtomina A se realizó la amplificación de uno de los genes involucrados en su biosíntesis (*txtA*). Todas las cepas productoras de taxtomina presentaron el gen *txtA*. Sin embargo, para las cepas *S. niveiscabiei* ST1016 y *S. acidiscabiei* ST112 si bien poseían el gen *txtA* no hubo producción del compuesto en las condiciones ensayadas. Por lo tanto la presencia del gen *txtA* no garantiza que el metabolito se produzca. Para 41 de las 70 cepas de la colección no se detectó la presencia del gen *txtA*. Esto se puede deber a que no lo poseen o a que los *primers* utilizados fueron dirigidos al gen *txtA* para algunas especies y al ser este género tan diverso genéticamente los *primers* disponibles no son óptimos para todas las cepas patógenas. Esto ha sido corroborado en nuestra colección en un trabajo previo (Lapaz *et al.*, 2017). Para analizar el potencial de transferencia de genes se comenzó por la detección de la presencia de la integrasa involucrada en la movilización de la IPAS_t y reportada en la cepa de *S. turgidiscabies* Car8 (Huguet-Tapia *et al.*, 2014). No se encontró esta integrasa en ninguna de las cepas analizadas. Por otro lado se amplificaron los genes *Lan* e *int* que se encuentran en la región de movilización TR2 reportada en cepas de *S. scabiei*, *S. acidiscabies* a10, *S. stelliscabiei* P3825 y una cepa de *Streptomyces* sp. (96-12) (Zhang & Loria, 2017). Los resultados de este

trabajo determinaron que de los 12 *S. scabiei* de la colección, 10 poseen los tres genes de la región TR analizados; el gen *txtA* que se encuentra en la región TR1, la integrasa *int* y el gen *Lan* que se encuentran en la región TR2. Por lo tanto, estas cepas poseen el potencial para transferir genes. Zhang y colaboradores han observado que hay diferentes estructuras de IPAs entre especies de *Streptomyces* y aún dentro de cepas de la misma especie, lo que evidencia la inestabilidad de la región TR (Zhang & Loria, 2017). Previos estudios han mostrado que las islas genómicas se pueden perder en ausencia de una presión selectiva (Bellanger *et al.*, 2011; Lechner *et al.* 2009). Sin embargo y de acuerdo al estudio de Zhang y Loria (2017), las cepas de *S. scabiei* de la colección mostraron poseer poca diversidad respecto a la región TR, por lo que como ellos sugieren, TR codificaría funciones que proporcionarían ventajas selectivas para la especie. Por otro lado, la cepa de *Streptomyces* sp. ST1140 que se agrupa filogenéticamente muy cerca de *S. europaescabiei*, también posee los 3 genes (*txtA* (TR1), *int* y *Lan* (TR2)), lo cual es novedoso, porque sólo se ha reportado la región TR2 de movilización en cepas de *S. scabiei*, *S. acidiscabies* a10, *S. stelliscabiei* P3825 y una cepa de *Streptomyces* sp. (96–12) (Zhang & Loria, 2017). Mediante el análisis detallado de islas de patogenicidad en los genomas secuenciados se demostró que las cepas de *S. niveiscabiei* ST1015 y ST1020 (que no producen taxtomina) no tienen ningún remanente de las islas de patogenicidad conocidas, pero sí poseen el gen de la bacitracina (*bacA*) en el cual se inserta la IPAS en *S. turgidiscabies* con la secuencia de inserción de 8 pb intacta (TTCATGAA). Sin embargo, el sitio de integración *att* de 12 pb (TTGAACCTGAAC) que se encuentra dentro del gen *aviXI* varía en dos bases con respecto al sitio *att* reportado (TTGAAGCGGAAC), el cual se supone es reconocido por la integrasa para la inserción de la región TR en las cepas que poseen esta región completa o sus módulos (Zhang & Loria, 2017). Esto sugiere que estas cepas no pueden recibir la región TR que posee los genes de biosíntesis de la taxtomina. Por lo que son novedosas debido a que poseerían otros determinantes de patogenia por elucidar. Es interesante que la cepa de *S. niveiscabiei* aislada en Corea y para la que se encuentra el genoma disponible posea la región TR1 y es productora de TxtA, mientras que en las cepas aisladas en Uruguay 13 no poseen el gen *txtA* que se encuentra en la región toxicogénica TR1 y 2 poseen el gen *txtA* pero no la producen en las condiciones ensayadas. Por otra parte, uno de los aislamientos que posee el gen *txtA* posee además el gen de la integrasa. Estos aislamientos de la misma especie pero diversos confirmarían la inestabilidad de la región TR. Respecto a la cepa secuenciada *S. acidiscabiei* ST105 para la cual se detectó la taxtomina A posee además la región de colonización CR con los genes *nec1* y *tomA*. Dentro de esta región se observan los dos sitios palindrómicos de 8 pares de bases *attL* y *attR* que la flanquean. Sin embargo el sitio *attL* (TCTATGAA) no se encuentra intacto sino que difiere en 2 pares de bases respecto a la secuencia reportada en *S. turgidiscabies* Car8 (TTCATGAA), lo que indicaría que esta región carece de capacidad para movilizarse. En el caso de la región TR se

conserva solo la región TR1 por lo cual tampoco tiene posibilidad para movilizar el *cluster* de TxtA. Sólo para la cepa de *S. acidiscabies* a10 se han reportado las dos regiones TR1 y TR2. La cepa de *S. europaescabiei* ST1229 posee la región CR pero al igual que la cepa de *S. acidiscabies* uno de los sitios *att* tiene dos pares de bases diferentes (TGTATGAA) por lo cual esta región tampoco tiene la capacidad para moverse. Con respecto a la región TR solo posee la región TR1 con los sitios *att* intactos, pero no posee la región TR2 para movilizar el *cluster* de TxtA. En el caso de la cepa *S. scabiei* ST129 la región CR también se encuentra fija en el cromosoma debido a que solo se encuentra el sitio *attR* que flanquea uno de sus extremos. Además conserva todo los genes de la región TR reportada en *S. scabiei* 87-22, los sitios *att* que flanquean dicha región y los que dividen la misma en sub-regiones TR1 y TR2 se encuentran intactos. Las características descritas para esta cepa de *S. scabiei* aislada en Uruguay le confieren la capacidad para movilizar el *cluster* de taxtomina A, o sea, el determinante de patogenicidad más importante, por lo que posee el potencial para generar patógenos emergentes en nuestros sistemas agrícolas. Debido a que el género *Streptomyces* es ubicuo en suelo, que la especie que conserva la región TR es *S. scabiei* el cual se cree es el patógeno más antiguo de este género y está distribuido mundialmente (Bukhalid *et al.*, 2002), nuestro estudio sugiere que el *cluster* de biosíntesis de TxtA se puede seguir expandiendo y generar nuevas especies de *Streptomyces* patógenos.

Bibliografía

- Bellanger, X., Morel, C., Gonot, F., Puymège, A., Decaris, B., & Guédon, G. (2011). Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to cis mobilization and gene capture. *Molecular microbiology*, 81(4), 912-925.
- Bignell, D. R., Seipke, R. F., Huguet-Tapia, J. C., Chambers, A. H., Parry, R. J., & Loria, R. (2010). *Streptomyces scabies* 87-22 contains a coronafacic acid-like biosynthetic cluster that contributes to plant-microbe interactions. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(2), 161-175.
- Bignell, D. R. D., Fyans, J. K., & Cheng, Z. (2014). Phytotoxins produced by plant pathogenic *S. streptomyces* species. *Journal of applied microbiology*, 116(2), 223-235.
- Bukhalid, R. A., Chung, S. Y., & Loria, R. (1998). *nec1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(10), 960-967.
- Bukhalid, R. A., Takeuchi, T., Labeda, D., and Loria, R. 2002. Horizontal transfer of the plant virulence gene, *nec1*, and flanking sequences among genetically distinct *Streptomyces* strains in the Diastatochromogenes cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:738-744.
- Cao, Z., Khodakaramian, G., Arakawa, K., & Kinashi, H. (2012). Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(2), 353-357.
- Chapleau, M., Guertin, J. F., Farrokhi, A., Lerat, S., Burrus, V., & Beaulieu, C. (2016). Identification of genetic and environmental factors stimulating excision from *S. streptomyces scabiei* chromosome of the toxicogenic region responsible for pathogenicity. *Molecular plant pathology*, 17(4), 501-509.
- Fyans, J. K., Bown, L., & Bignell, D. R. (2016). Isolation and characterization of plant-pathogenic *Streptomyces* species associated with common scab-infected potato tubers in Newfoundland. *Phytopathology*, 106(2), 123-131.
- Goyer, C., & Beaulieu, C. (1997). Host range of streptomycete strains causing common scab. *Plant Disease*, 81(8), 901-904.
- Huguet-Tapia, J. C., Badger, J. H., Loria, R., & Pettis, G. S. (2011). *Streptomyces turgidiscabies* Car8 contains a modular pathogenicity island that shares virulence genes with other actinobacterial plant pathogens. *Plasmid*, 65(2), 118-124.
- Huguet-Tapia, J. C., Bignell, D. R., & Loria, R. (2014). Characterization of the integration and modular excision of the integrative conjugative element PAISt in *Streptomyces turgidiscabies* Car8. *PloS one*, 9(6), e99345.
- Huguet-Tapia, J. C., Lefebure, T., Badger, J. H., Guan, D., Pettis, G. S., Stanhope, M. J., & Loria, R. (2016). Genome content and phylogenomics reveal both ancestral and lateral evolutionary pathways in plant-pathogenic *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(7), 2146-2155.
- Johnson, E. G., Joshi, M. V., Gibson, D. M., & Loria, R. (2007). Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-causing *Streptomyces* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(1-3), 18-25.

- Kers, J. A., Cameron, K. D., Joshi, M. V., Bukhalid, R. A., Morello, J. E., Wach, M. J., ... & Loria, R. (2005). A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Molecular microbiology*, 55(4), 1025-1033.
- King, R. R., & Calhoun, L. A. (2009). The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 70(7), 833-841.
- Lapaz, M. I., Huguet-Tapia, J. C., Siri, M. I., Verdier, E., Loria, R., & Pianzzola, M. J. (2017). Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant disease*, 101(8), 1362-1372.
- Lechner, M., Schmitt, K., Bauer, S., Hot, D., Hubans, C., Levillain, E., ... & Gross, R. (2009). Genomic island excisions in *Bordetella petrii*. *BMC microbiology*, 9(1), 141.
- Lerat, S., SIMAO-BEAUNOIR, A. M., & Beaulieu, C. (2009). Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Molecular plant pathology*, 10(5), 579-585.
- Li, Y., Liu, J., Díaz-Cruz, G., Cheng, Z., & Bignell, D. R. (2019). Virulence mechanisms of plant-pathogenic *Streptomyces* species: an updated review. *Microbiology*.
- Loria, R., Bukhalid, R. A., Fry, B. A., & King, R. R. (1997). Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease*, 81(8), 836-846.
- Loria, R., Kers, J., & Joshi, M. (2006). Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 469-487.
- Natsume, M., Komiya, M., Koyanagi, F., Tashiro, N., Kawaide, H., & Abe, H. (2005). Phytotoxin produced by *Streptomyces* sp. causing potato russet scab in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 71(5), 364-369.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Seemann, T. 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068-2069.
- Park, D. H., Yu, Y. M., Kim, J. S., Cho, J. M., Hur, J. H., & Lim, C. K. (2003). Characterization of streptomycetes causing potato common scab in Korea. *Plant Disease*, 87(11), 1290-1296.
- Zhang, Y., Bignell, D. R., Zuo, R., Fan, Q., Huguet-Tapia, J. C., Ding, Y., & Loria, R. (2016). Promiscuous Pathogenicity Islands and Phylogeny of Pathogenic *Streptomyces* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(8), 640-650.
- Zhang, Y., & Loria, R. (2017). Emergence of novel pathogenic *Streptomyces* species by site-specific accretion and cis-mobilization of pathogenicity islands. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(1), 72-82.
- Zhang, Y., Jiang, G., Ding, Y., & Loria, R. (2018). Genetic background affects pathogenicity island function and pathogen emergence in *Streptomyces*. *Molecular plant pathology*, 19(7), 1733-1741.

CAPÍTULO 4

Búsqueda de nuevos factores de patogenicidad asociados a cepas de *Streptomyces* causantes de sarna común en papa

Parte del contenido de este capítulo está publicado en:

Lapaz, M. I., López, A., Huguet-Tapia, J. C., Pérez-Baldassari, M. F., Iglesias, C., Loria, R., ... & Pianzzola, M. J. (2018). Isolation and structural characterization of a non-diketopiperazine phytotoxin from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. *Natural product research*, 33(20), 2951-2957.

Introducción

El género *Streptomyces* está constituido por bacterias gram-positivas, filamentosas, saprófitas, conocidas por su complejidad morfológica y su capacidad para producir metabolitos secundarios bioactivos de importancia en medicina y agricultura, entre otras áreas. Por el contrario, un atributo raro entre las especies de este género es la capacidad de infectar tejidos vegetales y causar enfermedades de cultivos, como la sarna común (SC) (Loria *et al.*, 2006). Esta enfermedad de importancia en la papa se caracteriza por la presencia de lesiones necróticas con una textura corchosa en la superficie de los tubérculos (Loria *et al.*, 1997). La patogenicidad en planta de *Streptomyces* se asocia generalmente con la producción de taxtominas, un grupo de metabolitos secundarios fitotóxicos, siendo la taxtomina A (TxtA) el miembro de este grupo que se produce mayoritariamente en especies de *Streptomyces* que causan sarna en la papa (Bignell *et al.*, 2014; King & Calhoun, 2009). Esta toxina actúa como inhibidor de la biosíntesis de la celulosa, permitiendo la penetración del patógeno en tejidos en expansión durante su colonización (Loria *et al.*, 2008). Si bien la TxtA es el principal factor de virulencia producido por estos patógenos, otras fitotoxinas, así como fitohormonas y proteínas secretadas, pueden participar en el desarrollo y/o gravedad de la enfermedad (Li *et al.*, 2019). Se han reportado cepas patógenas de *Streptomyces* que no producen taxtominas (Cao *et al.*, 2012; Fyans *et al.*, 2016; Natsume *et al.*, 2005), y que carecen de los genes *txtA* y *txtB* necesarios para su biosíntesis (Jordaan & van der Waals 2016; Lapaz *et al.*, 2017; Pánková *et al.*, 2012; Wanner, 2004). De hecho, se han descrito otros metabolitos fitotóxicos que pueden contribuir a los síntomas comunes de la sarna, como las concanamicinas A y B, fitotoxinas derivadas de coronafacoil, el FD-891, la borrelidina, y la fridamicina E (Bignell *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2012; Natsume *et al.*, 1996, 1998, 2005, 2018). Queda por determinar si las fitotoxinas FD-891, borrelidina y fridamicina E son determinantes de patogenicidad esenciales para los organismos productores, pero la ausencia de producción de taxtomina sugiere que múltiples metabolitos fitotóxicos especializados contribuyen al fenotipo patógeno en estas cepas de *Streptomyces* spp. (Li *et al.*, 2019). En un estudio previo se realizó la caracterización de una colección de cepas de *Streptomyces* patógenas aisladas de tubérculos de papa y muestras de suelo en Uruguay (Lapaz, 2014; Lapaz *et al.*, 2017). Se determinó que el 17% de los aislamientos no contenían ninguno de los genes *txtA*, *txtB* involucrados en la biosíntesis de TxtA, y los genes *nec1* y *tomA* que codifican para una proteína necrogénica y un homólogo de la tomatinasa, respectivamente. Por esta razón, este trabajo se dirigió a la búsqueda de nuevos factores de virulencia que explicaran la patogenicidad de esas cepas. En particular, el interés se centró en las cepas *S. niveiscabiei* ST1015 y ST1020 representativas de un grupo de cepas patógenas que no poseen ninguno de los factores de virulencia antes reportados.

Objetivo

Buscar nuevos factores de virulencia en cepas patógenas de papa del género *Streptomyces*.

Materiales y Métodos

4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas patógenas de *Streptomyces* utilizadas en este capítulo son cinco cepas del género *Streptomyces* aisladas a partir de tubérculos con lesiones de sarna común e identificadas en Lapaz *et al.*, 2017. Estas cepas se denominaron: *Streptomyces acidiscabies* ST105, *S. scabiei* ST129, *S. europaeiscabiei* ST1229, *S. niveiscabiei* ST1015, y *S. niveiscabiei* ST1020. Como controles se utilizó la cepa de *Streptomyces* sp. ST101 no patógena (también aislada en estudios previos), y las cepas de referencia *S. scabiei* DSM 41658 y *S. acidiscabies* DSM 41668 de la colección de cultivos DSMZ (Braunschweig, Alemania). Las condiciones de cultivo y almacenamiento se encuentran en la Sección 2.1 de materiales y métodos del Capítulo 2.

4.2 Búsqueda de compuestos bioactivos excretados

Previo a evaluar la bioactividad de los sobrenadantes de las cepas en estudio y de manera de confirmar que mantenían la patogenicidad, se realizaron ensayos de patogenicidad en discos de papa, plantas de rabanito e infiltración en hojas de tabaco (cada ensayo se describe detalladamente en los ítems descritos subsiguientes). Se analizó la bioactividad de los sobrenadantes de las cepas según lo reportado recientemente por Fyans y colaboradores (2016) con modificaciones. Las cepas de *Streptomyces* spp. se cultivaron en medio OBB como se describió anteriormente para la producción de taxtomina A (Sección 3.3 de materiales y métodos del Capítulo 3). Las células se sedimentaron por centrifugación a 10.000 *g*. Los sobrenadantes se filtraron utilizando filtros de 0,45 μ m. Para determinar la bioactividad de los sobrenadantes se analizaron alícuotas de 25 μ l utilizando el bioensayo de plantas de rabanito, el bioensayo de infiltración en hojas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) y el ensayo en discos de papa (los ensayos se describen detalladamente más abajo). Para los ensayos de patogenicidad de las cepas se utilizaron como controles positivos las cepas de referencia de *S. scabiei* DSM 41658 y *S. acidiscabies* DSM 41668. Como controles negativos se utilizó agua estéril y la cepa no patógena *Streptomyces* sp. ST101. Para los ensayos de bioactividad de los sobrenadantes se utilizaron como controles negativos el medio OBB sin inocular, agua estéril y el sobrenadante del cultivo de la cepa ST101, mientras que los controles positivos fueron sobrenadantes de *S. scabiei* DSM 41658 y *S. acidiscabies* DSM 41668. Para determinar si la sustancia fitotóxica

producida por las cepas era soluble en disolvente orgánico, los sobrenadantes de cultivo OBB (4 ml) se extrajeron tres veces con 2 ml de acetato de etilo o hexano, los extractos resultantes se combinaron, secaron y resuspendieron en 1 ml de metanol al 100%. Los extractos (25 µl) se inocularon en el ensayo de disco papa (como se describe más abajo), se utilizó metanol al 100% como control negativo y el extracto del sobrenadante del cultivo en OBB de *S. scabies* DSM 41658 como control positivo.

4.3 Ensayo de patogenicidad y bioactividad en rabanito

El ensayo de patogenicidad de las cepas y bioactividad de los sobrenadantes se realizó como se describe en la Sección 3.2 de materiales y métodos del Capítulo 3. Los rabanitos fueron inoculados con 200 µl de una suspensión de células de $DO_{600} = 1$, para el ensayo de patogenicidad y para la evaluación de la bioactividad de los sobrenadantes se inocularon 25 µl del sobrenadante filtrado o igual volumen de los extractos resultantes del mismo disueltos en agua. Luego se determinó el largo de las raíces con respecto a los controles positivo y negativo.

4.4 Ensayo de patogenicidad y bioactividad en discos de papa

La patogenicidad de las cepas y la bioactividad de los sobrenadantes se caracterizó adicionalmente utilizando el bioensayo en discos de papa como se describió anteriormente (Loria *et al.*, 1995). Se desinfectó el tubérculo sano con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto y se enjuagó con agua estéril durante 4 minutos. Los discos de papa se prepararon asépticamente, en rodajas de aproximadamente 1cm de espesor y se colocaron sobre papel de filtro previamente humedecido (Whatman #4, 90 mm) en placas de Petri profundas (25 mm). Los discos de tubérculo (5 en total) se inocularon luego con 25 µl de una suspensión de células a una $DO_{600}=1$ preparados de igual forma que en la Sección 3.2 de materiales y métodos del Capítulo 3 en el caso del ensayo de patogenicidad. Para el ensayo de bioactividad se inocularon los discos con 25 µl del sobrenadante filtrado o extractos del mismo. Las placas de Petri se envolvieron con Parafilm y se incubaron a 28 ± 2 °C durante 5 días en oscuridad. Luego se determinó la necrosis en el tejido con respecto a los controles positivo y negativo.

4.5 Ensayos de patogenicidad y bioactividad en hojas de tabaco

El bioensayo de infiltración de hojas se realizó para evaluar la patogenicidad de las cepas y la bioactividad de los sobrenadantes. En un principio se preparó el inóculo de 10^7 esporas/ml a ser infiltrado de la siguiente manera: a partir de un cultivo puro en placa de *Streptomyces* sp. se

inocularon 5 mL de medio TSB y se incubó el cultivo a 28 °C y ~200 rpm. Al cabo de dos o tres días se tomó una alícuota de 1ml del cultivo, se centrifugó a 12.000 *g* por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se lavaron las células con 1 ml de agua destilada estéril 3 veces. Las células se resuspendieron en un volumen de 300-500 µl de agua (lo suficiente para lograr una baja viscosidad). Se tomaron 100 µl de la suspensión que se distribuyeron en una placa de medio *International Streptomyces Project Medium 4* (ISP-4). Luego se incubó a 28 °C durante 7 días o hasta observar el crecimiento de esporas. Dos ml de agua destilada estéril se añadieron a la placa esporulada y con ansa estéril se resuspendieron las esporas. Se midió la absorbancia de la suspensión a 600 nm y se ajustó el inóculo a una $DO_{600} = 0.5$ en 1 ml de agua estéril. Las hojas de las plantas de *N. benthamiana* de aproximadamente 5 semanas de edad se infiltraron con 20 µl del inóculo de esporas o con sobrenadante. Después de la infiltración, las plantas se incubaron a 24 ± 2 °C en un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad durante 5 días para los sobrenadantes y 11 días para las cepas. Luego se determinó la necrosis en la hoja con respecto a los controles positivo y negativo.

4.6 Estudio de perfiles metabolómicos de sobrenadantes

Se realizó un análisis de los perfiles metabolómicos para las cepas ST1015 y ST1020 que no producen TxtA y para la cepa de referencia productora de TxtA *S. acidiscabies* DSM41668. Para llevarlo a cabo, 10 ml del sobrenadante liofilizado de cada cepa se resuspendió en 700 µl de D₂O. Los experimentos de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron realizados en un espectrómetro Bruker AVANCE III 500, operando a frecuencias de ¹H de 500.13 MHz. Los experimentos fueron realizados utilizando los parámetros por defecto y 64 barridos. Estos ensayos se realizaron en el laboratorio del Departamento de Química del Litoral (DQL), CENUR Litoral Norte, UdelaR, bajo la supervisión del Dr. Guillermo Moyna. Una vez obtenidos los espectros se realizó el procesamiento de los mismos utilizando MNova (*version 11.0, Mestrelab Research, S.L., Santiago de Compostela, España*). Se realizó la corrección manual de fase y línea de base. Para la calibración de los desplazamientos químicos se utilizó ácido 2,2,3,3-*d*₄-3-(trimetilsilil)propionico (TSP, $\delta = 0.00$ ppm) como referencia, el mismo fue añadido previamente en una concentración de 0.05 mg/ml de D₂O. Posteriormente se realizó la identificación de las señales.

4.7 Aislamiento del compuesto bioactivo

Se cultivó *S. niveiscabiei* ST1015 en medio OBB como se describió previamente para la producción de taxtomina A. Las células se sedimentaron por centrifugación a 10.000 *g* durante

15 minutos, el sobrenadante se filtró usando membranas de 0,45 µm y se liofilizó. Se disolvieron 20 mg del material liofilizado en una pequeña cantidad de CH₃OH absoluto y se sometieron a *Thin Layer Chromatography* (TLC) preparativa llevada a cabo en placas de silica gel 60G F₂₅₄ usando como fase móvil EtOAc/CH₂Cl₂ (75:25). La banda del compuesto fue visualizada bajo luz UV y extraída desde la sílica con EtOAc/MeOH/CH₂Cl₂ (50:35:15). Se verificó su pureza por GC-MS y se evaluó la bioactividad del compuesto en solución acuosa por medio de ensayos de bioactividad en rabanito y disuelto en metanol en discos de papa como se mencionó anteriormente para los sobrenadantes y extractos.

4.8 Elucidación estructural y caracterización del compuesto fitotóxico

La elucidación estructural y la caracterización del compuesto fitotóxico se realizó en colaboración con el Dr. Guillermo Moyna y el Q.F. Andres López del DQL, CENUR Litoral Norte, UdelaR. Para caracterizar química y estructuralmente al compuesto fitotóxico, los puntos de fusión se determinaron en un equipo Electrothermal IA9100. Los espectros infrarrojos se obtuvieron en un espectrofotómetro Shimadzu IRAffinity-1 FT-IR con un accesorio PIKE MIRacle™ ATR de reflexión simple. Las rotaciones ópticas se registraron en un polarímetro Bellingham-Stanley ADP440+ equipado con una celda de acero inoxidable de 5 × 50 mm. Los experimentos de RMN se llevaron a cabo en espectrómetros Bruker AVANCE III 500 y 400 que funcionan a frecuencias de ¹H de 500.13 y 400.13 MHz, y frecuencias de ¹³C de 125.76 y 100.62 MHz, respectivamente. Los espectros COSY, HSQC y HMBC se adquirieron utilizando secuencias de pulso estándar provistas con los instrumentos. Los datos de HR-ESIMS y ESIMS2 se recopilaron en espectrómetros de masas Bruker Daltonik Apex VI FT-ICR y AB SCIEX 4000 QTrap, respectivamente.

4.9 Evaluación de la actividad del nuevo compuesto fitotóxico en comparación con la taxtomina A

Para comparar las actividades sobre papa de la taxtomina A y el nuevo compuesto, se evaluaron ambos sobre discos de papa, utilizando las soluciones de CH₃OH de ambos compuestos en concentraciones que oscilaron entre 0,01 y 10,0 mg/ml.

4.10 Evaluación de la producción del compuesto en diferentes medios de cultivo y diferentes tiempos

Se evaluó la producción del compuesto en medio mínimo *Thaxtomin Defined Medium* (TDM) con

diferentes azúcares y polisacáridos como fuente de carbono (glucosa, xilosa, celobiosa, celulosa, carboximetilcelulosa, almidón y xilano). Por otro lado, se evaluó la producción del compuesto en medios complejos como el TSB, OBB y PMB (*Potato Mashed Broth*). Para el análisis de la producción del compuesto en los diferentes medios, 50 ml de medio se inocularon con 200 µl de una suspensión de células de $DO_{600} = 1$. Los cultivos fueron incubados durante 7 días a 28 ± 2 °C con agitación a ~200 rpm. Luego se recuperaron y filtraron los sobrenadantes y se evaluó su fitotoxicidad utilizando el ensayo de rabanito inoculando 200 µl de los mismos. Se inocularon rabanitos usando medios sin inocular como controles. Para la evaluación de la producción del compuesto en el tiempo se seleccionaron los medios OBB, PMB y TSB. Se tomaron alícuotas en los días 1, 3, 5 y 7 post inoculación y se evaluaron los sobrenadantes filtrados en el ensayo de rabanito como se describe en la sección 4.3 y por RMN como se describe en la sección 4.6 de este capítulo.

Resultados

Ensayo de patogenicidad en plantas

Los ensayos de patogenicidad se realizaron para las cepas ST105, ST1015, ST1020, ST129, y ST1229, utilizando como controles negativos agua destilada estéril y la cepa de *Streptomyces* ST101 no patógena. Se utilizaron como controles positivos las cepas de referencia *S. scabiei* DSM41658 y *S. acidiscabies* DSM41668. En la Figura 4.1 se observan imágenes con resultados de los ensayos.

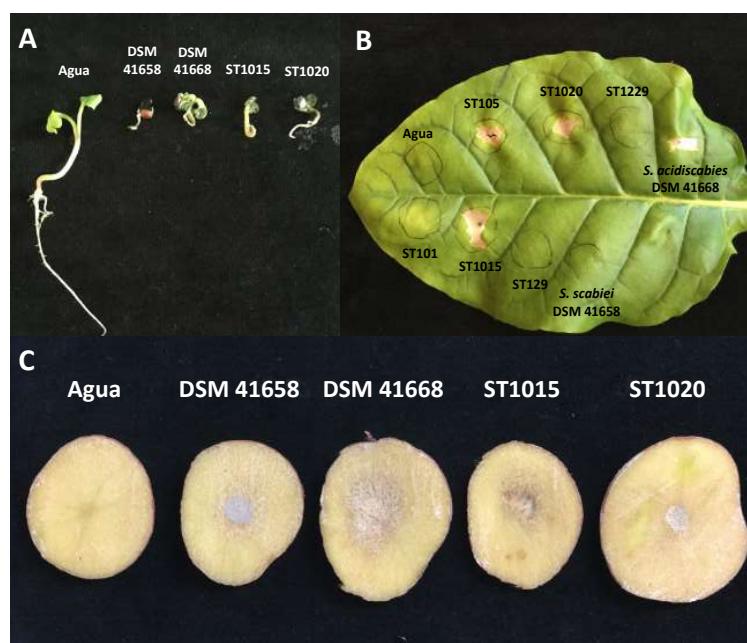


Figura 4.1. (A) Plántulas de rabanito inoculadas con cepas y agua como control (-). **(B)** Infiltración de inóculos de esporas en hoja de tabaco usando agua como control (-). **(C)** Ensayo de patogenicidad de cepas de *Streptomyces* en discos de papa usando agua como control (-).

En la Figura 4.1A se muestran los resultados del test de patogenicidad en rabanito. La actividad patogénica se evidencia al comparar el crecimiento de una plántula de rabanito expuesta a las cepas de *Streptomyces* con potencial patogénico con el control negativo. En presencia de cepas patógenas, el crecimiento de la plántula, principalmente su raíz, es notoriamente menor, en comparación con los controles negativos. La Figura 4.2B muestra la actividad de las cepas luego de su infiltración en hojas de tabaco. Se observa que el control negativo no provoca alteración alguna a diferencia de algunas cepas, que generan la muerte del tejido. En la Figura 4.3C se observa claramente la diferencia entre los ensayos utilizando las cepas con potencial patogénico y el control negativo. La fitotoxicidad de la cepa se manifiesta generando una lesión necrótica en la zona donde se encuentra el inóculo de células. Para el ensayo de patogenicidad en rabanito se observó que todas las cepas a excepción de la cepa no patógena ST101 inhibieron el crecimiento

de la planta. En el ensayo de discos de papa las cepas que causaron necrosis fueron ST105, ST1015, ST1020, ST129 y *S. acidiscabies* DSM 41668. En el ensayo de tabaco las cepas que produjeron necrosis en la hoja fueron las cepas ST105, ST1015, ST1020 y *S. acidiscabies* DSM 41668. Los resultados de estos ensayos se resumen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Test de patogenicidad de cepas de *Streptomyces* spp.

Ensayo de Patogenicidad			
Cepa	Rabanito ¹	Papa ²	Tabaco ³
ST101	-	-	-
ST105	+	+	+
ST1015	+	+	+
ST1020	+	+	+
ST129	+	+	-
ST1229	+	-	-
<i>S. acidiscabies</i> DSM 41668	+	+	+
<i>S. scabiei</i> DSM 41658	+	-	-

1. Ensayo de rabanito: (+) no hay crecimiento de raíz; (-) hay crecimiento de raíz.

2. Ensayo en disco de papa: (+) necrosis en el tejido; (-) no hay necrosis en el tejido.

3. Ensayo en tabaco: (+) necrosis en el tejido; (-) no hay necrosis en el tejido.

Ensayos para determinar bioactividad en los sobrenadantes de los cultivos

De la misma forma que con la suspensión de células, se llevaron a cabo los ensayos de bioactividad para los sobrenadantes provenientes de los cultivos en medio OBB de las cepas ST101 no-patógena (control negativo), ST105, ST1015, ST1020, ST129, ST1229, y las cepas de referencia utilizadas como controles positivos (*S. scabiei* DSM41658 , y *S. acidiscabies* DSM41668). Como control negativo se utilizó medio OBB y agua. En la Figura 4.2 se observan imágenes de los resultados de los ensayos.

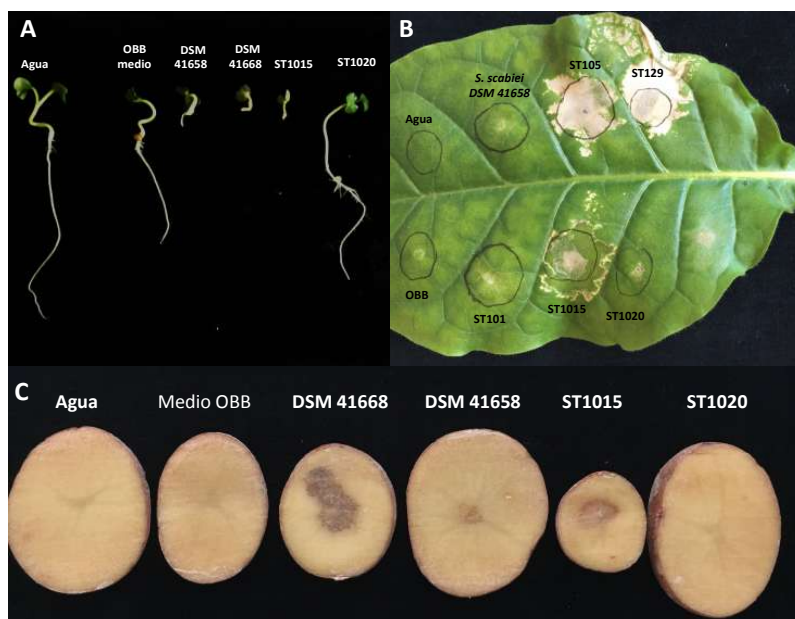


Figura 4.2. (A) Plántulas de rabanito luego de su inoculación con sobrenadantes de cultivos de cepas en medio OBB. Como controles negativos se utilizaron medio OBB y agua. (B) Infiltración de hojas de tabaco con sobrenadantes de cultivos de cepas en medio OBB, como controles negativos se utilizaron medio OBB y agua. (C) Ensayo de bioactividad en discos de papa inoculados con sobrenadantes de cultivos de cepas en medio OBB, como controles negativos se utilizaron medio OBB y agua.

En la Tabla 4.2 se detallan los resultados obtenidos en los ensayos de bioactividad utilizando los sobrenadantes de los cultivos de las cepas en medio OBB.

Tabla 4.2. Ensayos de bioactividad de los sobrenadantes en OBB

Ensayo de bioactividad			
Cepa	Rabanito ¹	Papa ²	Tabaco ³
ST101	-	-	-
ST105	+	+	+
ST1015	+	+	+
ST1020	-	-	-
ST129	+	+	+
ST1229	+	+	ND
<i>S. acidiscabies</i> DSM 41668	+	+	-
<i>S. scabiei</i> DSM 41658	+	+	-

1. Ensayo de rabanito: (+) no hay crecimiento de raíz; (-) hay crecimiento de raíz.

2. Ensayo en disco de papa: (+) necrosis en el tejido; (-) no hay necrosis en el tejido.

3. Ensayo en tabaco: (+) necrosis en el tejido; (-) no hay necrosis en el tejido.

Los sobrenadantes que mostraron bioactividad tanto en el ensayo en rabanito como en discos de papa fueron los obtenidos a partir del cultivo de las cepas ST105, ST1015, ST129, ST1229 y las cepas de referencia *S. acidiscabies* DSM 41668 y *S. scabiei* DSM 41658. En el ensayo en hojas de tabaco los sobrenadantes que mostraron bioactividad fueron los correspondientes a las cepas ST105, ST1015 y ST129. Los extractos realizados con acetato de etilo y hexano a partir de los sobrenadantes se inocularon en el ensayo de disco de papa y no se observó bioactividad para

ninguna de las cepas. En la Figura 4.3 se muestran los resultados obtenidos para los sobrenadantes fitotóxicos de la cepa de referencia *S. acidiscabies* DSM 41668 y la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 no productora de Taxtomina A.

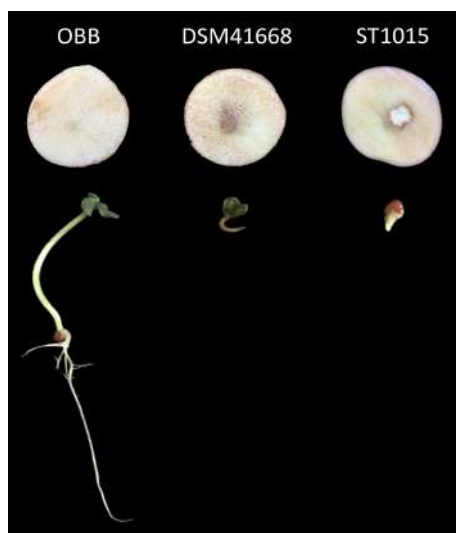


Figura 4.3. Actividad fitotóxica de los sobrenadantes de *S. acidiscabies* DSM41668 y *S. niveiscabiei* ST1015 en discos de papa (arriba) y plantas de rabanito (abajo). Medio OBB estéril y sin inocular se incluyó como control negativo.

Estudio de perfiles metabolómicos de sobrendantes

Se analizaron los perfiles metabolómicos de los sobrenadantes obtenidos a partir de los cultivos en medio OBB para las cepas patógenas *S. niveiscabiei* ST1020 y ST1015 no productoras de taxtomina A, y la cepa de referencia *S. acidiscabies* DSM 41668 productora de TxtA utilizando como control el medio de cultivo OBB sin inocular. En la Figura 4.4 se muestran los espectros de ^1H del RMN. Lo que podemos observar a grandes rasgos es que los espectros están dominados por señales en la zona entre 4.5 y 3.5 ppm correspondientes a los azúcares del medio de cultivo. Para el sobrenadante de la cepa ST1020 no se observan grandes cambios con respecto al control. Sin embargo en la zona de los aromáticos con desplazamientos en el rango de 6.5 a 8.5 ppm se observan picos para la cepa ST1015 y para la cepa *S. acidiscabies* DSM 41668. Para una mejor visualización del espectro en dicha zona se realizó una ampliación del mismo (Figura 4.5). Para la cepa de *S. acidiscabies* DSM 41668 se observan picos característicos reportados para el espectro de RMN de la taxtomina A (King *et al.*, 1989), a desplazamientos de 7.95, 7.79 (doblete de doblete), 7.38 (triplete), 7.25 (triplete), 6.93 (singulete), 6.75 (multiplete), y a 6.70 ppm (multiplete). Sin embargo para la cepa ST1015 no observamos picos característicos de la TxtA, pero se observan otros picos en la zona del desplazamiento de los aromáticos.

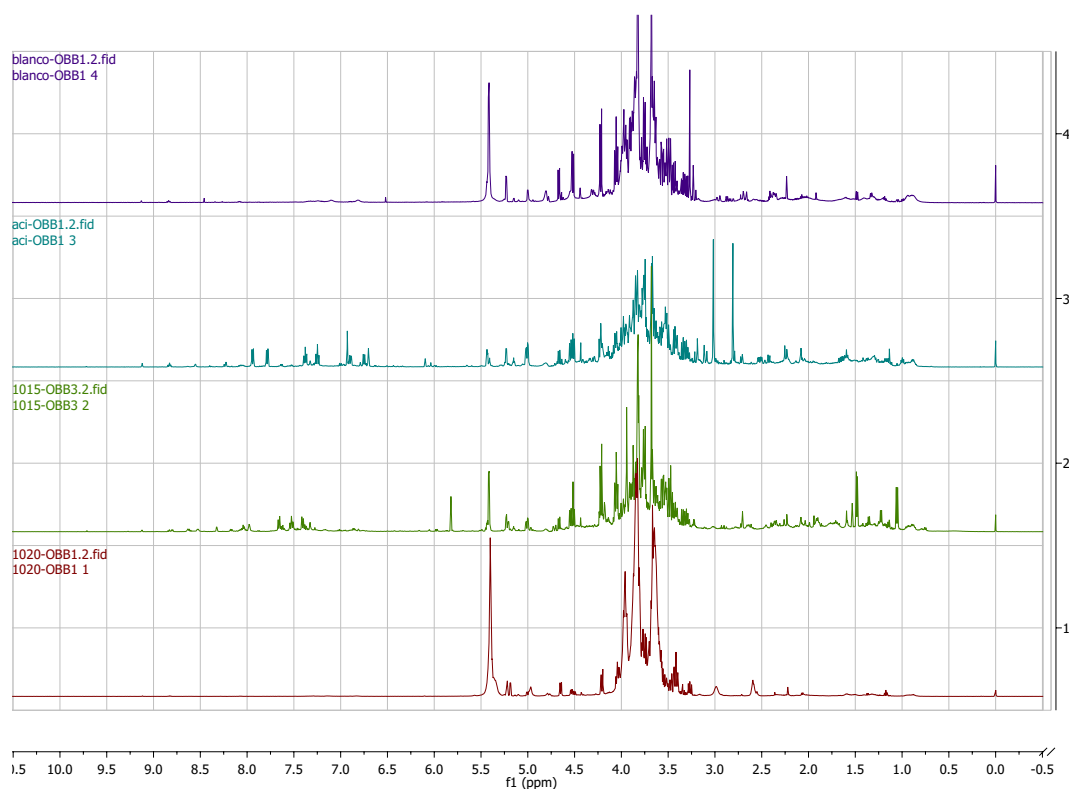


Figura 4.4. Espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en D_2O . Desde arriba se muestran los espectros del blanco (medio OBB sin inocular), los sobrenadantes de los cultivos de las cepas *S. acidiscabies* DSM 41668, ST1015 y ST1020 en medio OBB.

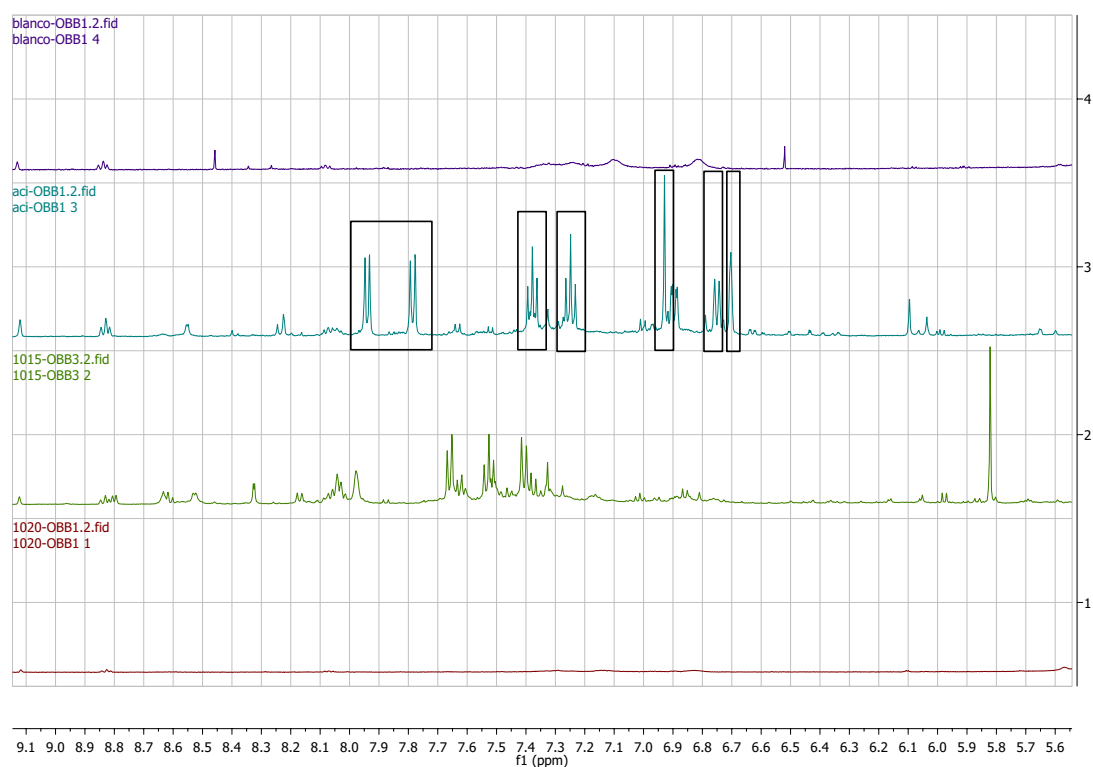


Figura 4.5. Ampliación de los espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en D_2O entre el rango de desplazamiento químico de 9.1 a 5.6 ppm. Desde arriba se muestran los espectros del blanco

(medio OBB sin inocular), los sobrenadantes de las cepas *S. acidiscabies* DSM 41668, ST1015 y ST1020 en medio OBB. Los picos característicos de la TxtA se encuentran recuadrados.

Aislamiento y caracterización del compuesto fitotóxico de la cepa ST1015

Se estandarizaron las condiciones de la TLC para el estudio de los compuestos que se encuentran en el sobrenadante del cultivo de la cepa ST1015. Para dicha estandarización se utilizaron los sobrenadantes liofilizados de cultivos en medio OBB de la cepa ST1015 y la cepa de referencia productora de taxtomina A *S. acidiscabies* DSM41668 y un estándar del compuesto taxtomina A. Para el sobrenadante de la cepa ST1015 se observaron varias bandas en la TLC en la cual ninguna poseía una relación de frente (Rf) similar a la taxtomina A $R_f = 0.17$ en las condiciones utilizadas (fase móvil EtOAc/CH₂Cl₂ 75:25). Se realizó una TLC preparativa con 20 mg del sobrenadante de la cepa ST1015 liofilizado y se purificaron los compuestos de las diferentes bandas observadas. La actividad fitotóxica de los compuestos extraídos fue analizada por medio de ensayos en discos de papa y rabanito. El único compuesto que fue fitotóxico se extrajo de la banda mayoritaria de la TLC con un $R_f = 0.5$, para el cual se obtuvo un rendimiento de 17.5% (3.5 mg) que corresponden a 201.3 mg/l de medio de cultivo (Figura 4.6).

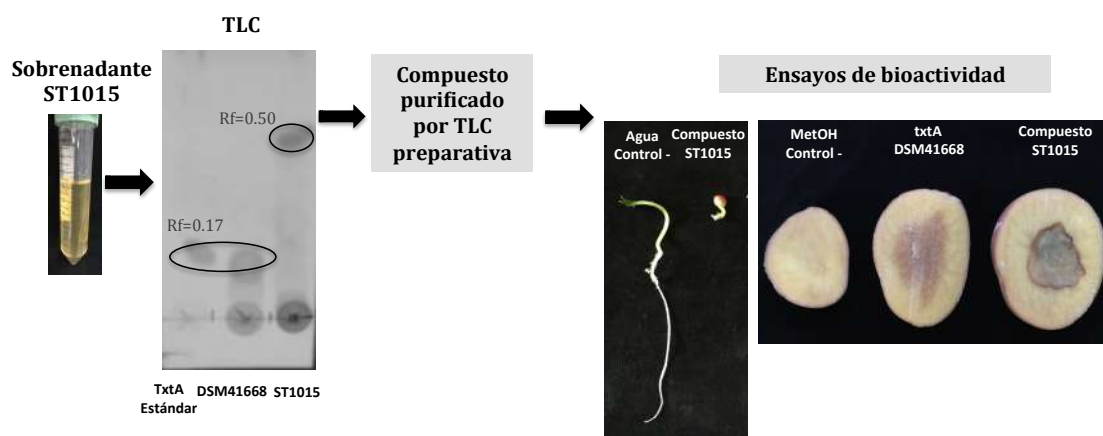


Figura 4.6. Esquema de la extracción del compuesto puro y la evaluación de su fitotoxidad en planta.

Elucidación del compuesto fitotóxico

El compuesto fitotóxico presentó picos de iones moleculares protonados y con sodio a 407.1324 y 429.1143 m/z en el espectro HR-ESIMS, ambos son compatibles con la fórmula molecular C₂₀H₂₂O₉ (calculada para C₂₀H₂₃O₉ y C₂₀H₂₂O₉Na: 407.1337 y 429.1156, respectivamente). Una señal prominente correspondiente al ion dimérico [2M+Na]⁺ a 835.2420 m/z fue también observada. El espectro ESIMS² del ion [M+H]⁺ a 407 m/z presentó transiciones a 407→425, 407→389, 406→371, y 406→353 m/z , las cuales fueron tentativamente asignadas a los iones

$[M+H_2O+H]^+$, $[M-H_2O+H]^+$, $[M-2H_2O+H]^+$, y $[M-3H_2O+H]^+$, respectivamente (Figura 4.15 (1-3)). El espectro ^1H RMN en $CDCl_3$ reveló la presencia de un anillo aromático 1,2,3-trisustituido (Tabla 4.3, Figura 4.9). Además, y de acuerdo con la fórmula molecular deducida a partir de los datos de HR-ESIMS y el patrón de ionización observado en el espectro ESIMS², las señales restantes de ^1H y ^{13}C están en campos relativamente bajos y sugieren un esqueleto carbonado altamente oxigenado. La absorción a 3447 cm^{-1} en el espectro IR también sugiere la presencia de grupos hidroxilo. Las resonancias de ^1H a 4.86, 4.68, 3.75, y 3.64 ppm no tienen correlación con los átomos de ^{13}C en el espectro de HSQC y desaparecen cuando los experimentos son realizados en CD_3OD (Tabla 4.4, Figura 4.11). Esto revela que hay cuatro alcoholes, y el análisis de los espectros COSY y HMBC muestra que uno de ellos es cuaternario y los 3 restantes son terciarios. Las resonancias de ^{13}C a 208.2 y 192.8 ppm y las bandas de IR a 1723 y 1688 cm^{-1} son consistentes con cetonas alifáticas y aromáticas, respectivamente. Las otras cuatro insaturaciones se deben exclusivamente a los anillos y basados en el corrimiento químico y las constantes de acoplamiento, dos de estos corresponden a oxiranos. Las correlaciones homo y heteronucleares indican que uno de éstos forma un sistema de anillos con puentes con las señales de ^{13}C a 65.3 y 63.4 ppm, y el otro es parte de un fragmento de óxido de butenonilo con resonancia de ^{13}C a 58.0, 56.8, y 17.8 ppm, y sus correspondientes señales de ^1H a 3.96, 3.10, y 1.49 ppm. Un análisis más detallado de los datos, y en particular del espectro HMBC, confirmó las asignaciones resumidas arriba y nos permitió asignar la estructura del compuesto fitotóxico como a la de la desmetilmensacarcina (Figura 4.7). Esto se confirmó por comparación con los datos de rotación óptica, IR y RMN reportados para este policétido por Arnold (2002), el cual fue aislado por este autor de una cepa de *S. bottropensis* encontrada en una muestra de suelo de Alemania.

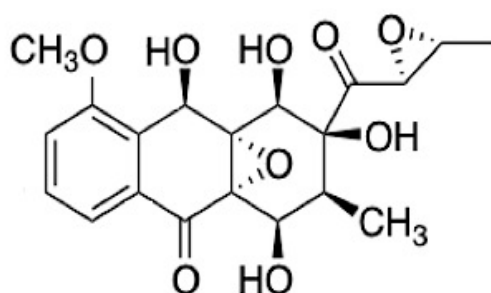


Figura 4.7. Estructura de la desmetilmensacarcina.

Las características de la desmetilmensacarcina son las siguientes: sólido cristalino amarillo pálido. Rf: 0.50 (EtOAc/ CH_2Cl_2 , 75:25). M.p.: $134.0\text{ }^{\circ}C$ (dec.). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3447, 2926, 1723, 1688, 1597, 1456, 1438, 1259, 1117, 1072, 946, 756 (ver Figura 4.8). $[\alpha]_D^{22}$: -67.0 ($c = 0.18$, CH_3OH). ^1H y ^{13}C NMR: ver Tabla 4.3, Tabla 4.4, y Figuras 4.9-4.14. HR-ESIMS: 407.1324

m/z $[M+H]^+$ (calcd. para $C_{20}H_{23}O_9$: 407.1337), 429.1143 $[M+Na]^+$ (calcd. para $C_{20}H_{22}O_9Na$: 429.1156), 835.2403 $[2M+Na]^+$ (calcd. para $C_{40}H_{44}O_{18}Na$: 835.2420) (ver Figura 4.15). ESIMS² (407 $\rightarrow$): 425, 389, 371, 353 (ver Figura 4.16).

Tabla 4.3. Datos de ^1H (500 MHz) y ^{13}C RMN (100 MHz) para la desmetilmensacarcina en $CDCl_3$ (δ en ppm, J en Hz).

Posición	δ_H	δ_C	HMBC
1	4.57 (d, $J = 6.7$, 1H)	70.9	C-10, C-10a, C-4a
2	-	83.1	-
3	2.33 (dq, $J = 7.2$, $J = 3.4$, 1H)	32.1	C-15
4	4.74 (dd, $J = 4.0$, $J = 3.4$, 1H)	68.4	C-4a, C-2
4a	-	63.4	-
5	-	192.8	-
5a	-	128.4	-
6	7.71 (dd, $J = 7.9$, $J = 1.1$, 1H)	120.3	C-8, C-5, C-5a
7	7.48 (dd, $J = 8.3$, $J = 7.9$, 1H)	129.6	C-9, C-9a, C-8, C-6
8	7.24 (dd, $J = 8.3$, $J = 1.1$, 1H)	116.6	C-9, C-6, C-5a
9	-	157.6	-
9a	-	129.4	-
10	5.82 (d, $J = 1.8$, 1H)	63.7	C-9, C-5a
10a	-	65.3	-
11	-	208.2	-
12	3.96 (d, $J = 1.9$, 1H)	58.0	C-13, C-11
13	3.10 (dq, $J = 5.1$, $J = 1.9$, 1H)	56.8	C-14
14	1.49 (d, $J = 5.1$, 3H)	17.8	C-13
15	1.13 (d, $J = 7.2$, 3H)	10.9	C-4, C-3, C-2
1-OH	3.64 (d, $J = 6.7$, 1H)	-	C-2
2-OH	4.86 (s, 1H)	-	C-11, C-3, C-2
4-OH	3.75 (d, $J = 4.0$, 1H)	-	C-3
10-OH	4.68 (d, $J = 1.8$, 1H)	-	C-10a
9-OMe	4.01 (s, 3H)	56.2	C-9

Tabla 4.4. Datos de ^1H (500 MHz) y ^{13}C RMN (100 MHz) para la desmetilmentsacarcina en CD_3OD (δ en ppm, J en Hz).

Posición	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1	4.35 (s, 1H)	70.8	C-11, C-10a, C-5, C-4a
2	-	83.8	-
3	2.16 (dq, $J = 7.1, J = 3.1$, 1H)	31.8	C-15
4	4.67 (d, $J = 3.1$, 1H)	67.1	C-10a, C-4a, C-2
4a	-	64.1	-
5	-	189.9	-
5a	-	129.3	-
6	7.68 (dd, $J = 7.9, J = 0.9$, 1H)	118.5	C-8, C-5, C5a
7	7.48 (dd, $J = 8.1, J = 7.9$, 1H)	129.0	C-9, C-5a
8	7.36 (dd, $J = 8.1, J = 0.9$, 1H)	116.2	C-9, C-8, C-6
9	-	158.5	-
9a	-	129.6	-
10	5.87 (s, 1H)	60.1	C-9, C5a
10a	-	66.5	-
11	-	210.6	-
12	4.08 (d, $J = 1.9$, 1H)	58.2	C-13, C-11
13	3.02 (dq, $J = 5.1, J = 1.9$, 1H)	56.5	C-14
14	1.44 (d, $J = 5.1$, 3H)	16.5	C-13, C-12
15	1.06 (d, $J = 7.1$, 3H)	10.2	C-4, C-3, C-2
9-OMe	3.98 (s, 3H)	55.1	C-9

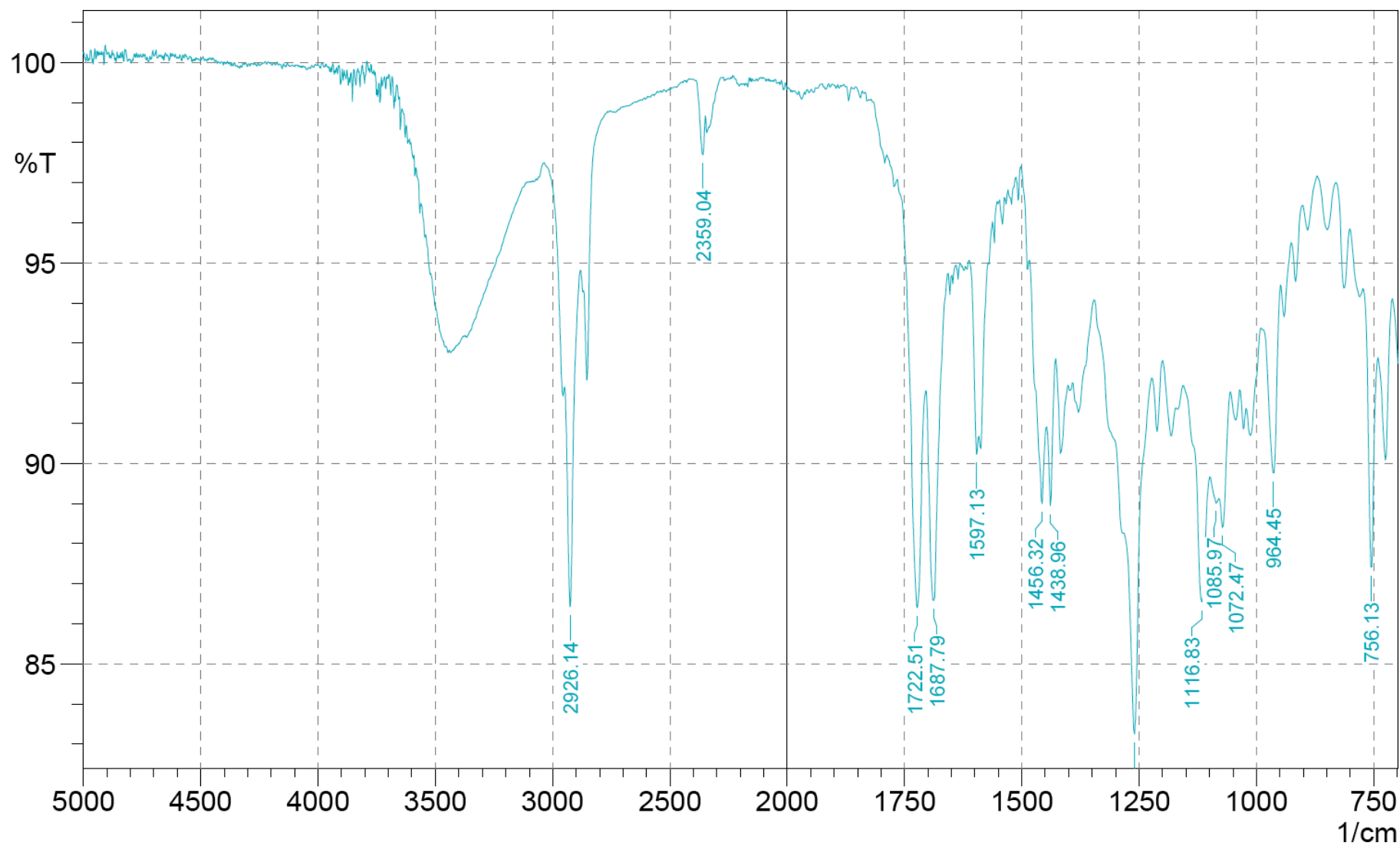


Figure 4.8. Espectro IR (ATR) de la desmetilensacarina.

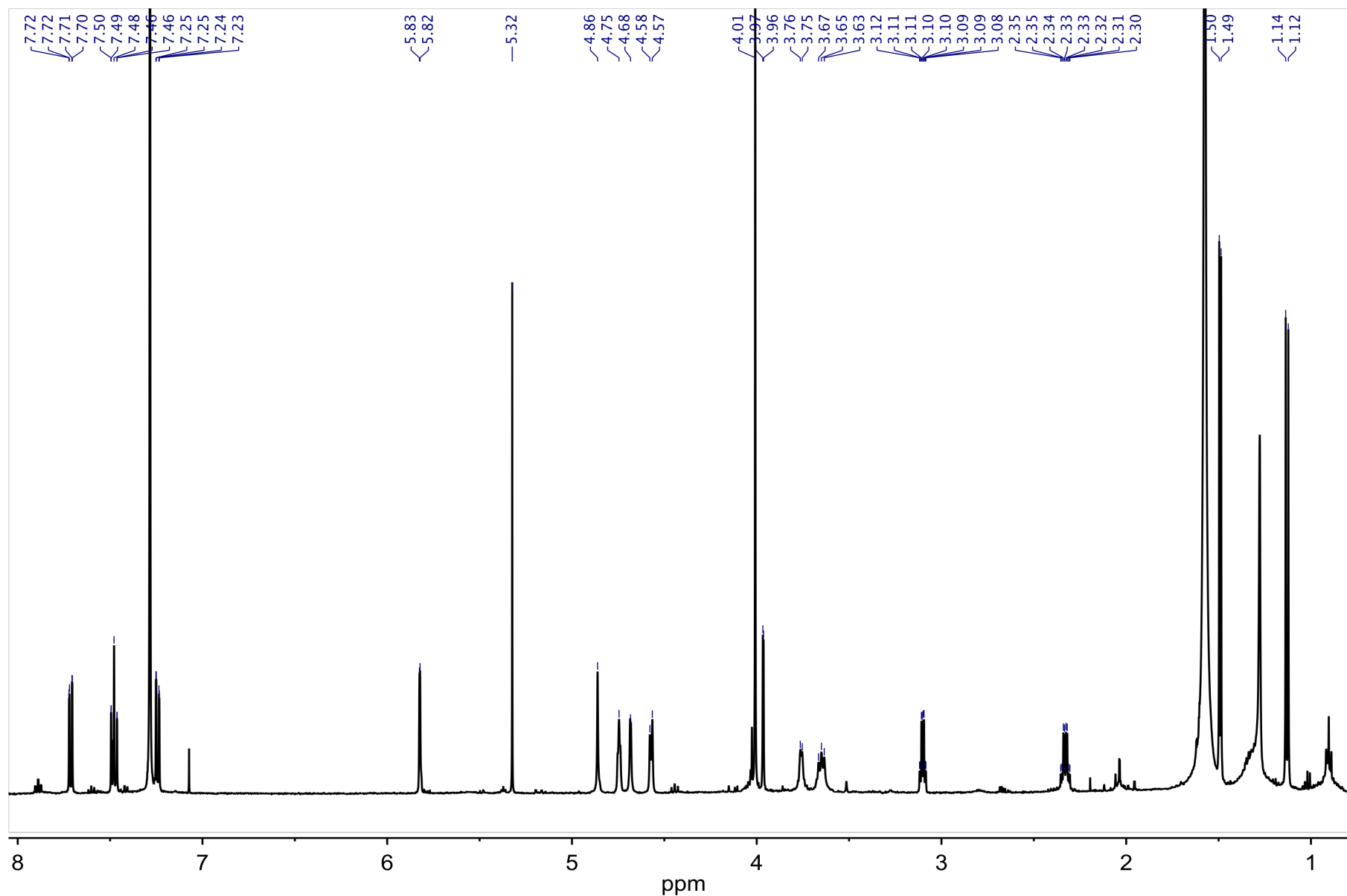
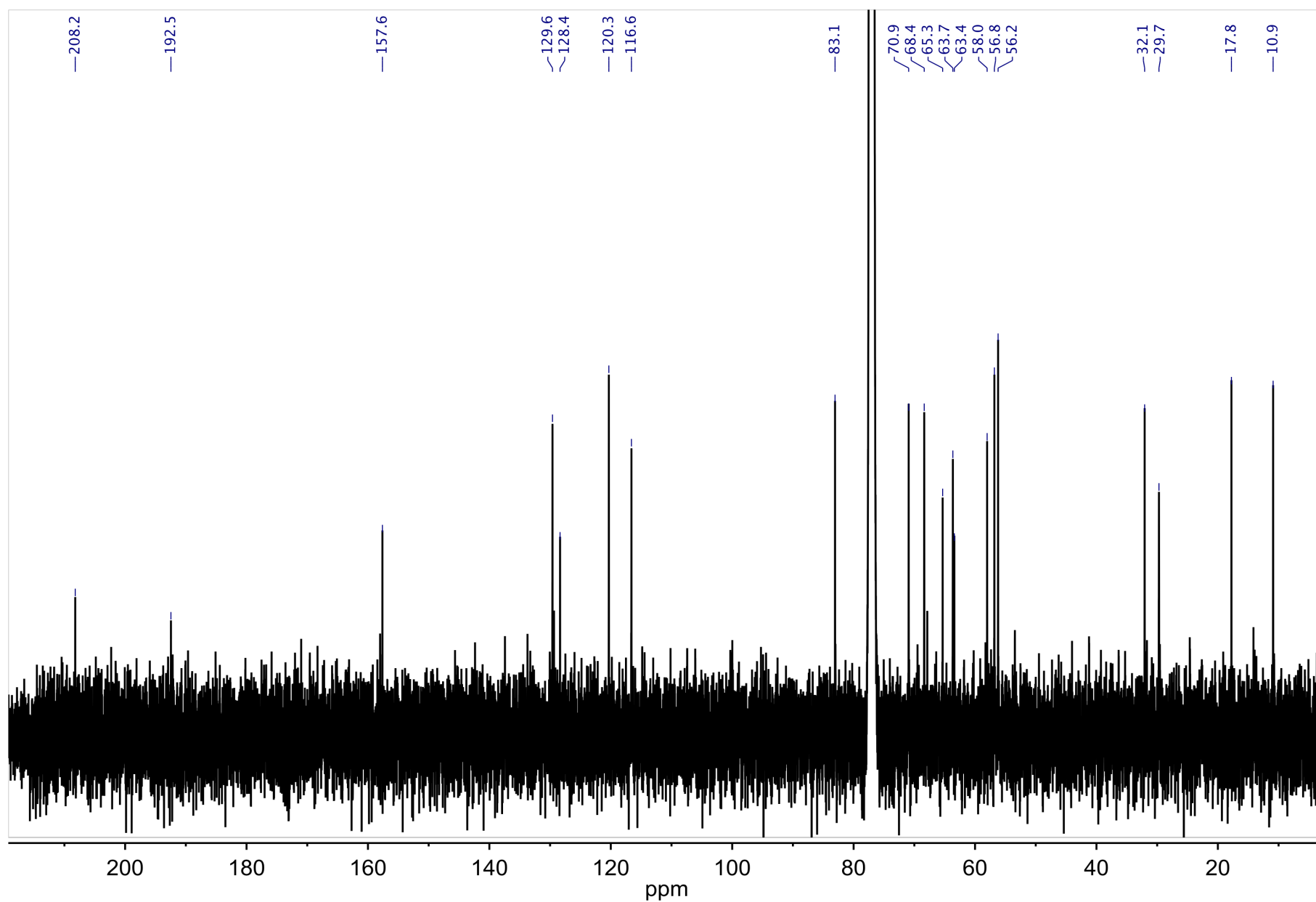


Figura 4.9. Espectro de ^1H RMN (500 MHz) de la desmetilensacarcina en CDCl_3 .



Figure

4.10. Espectro de ¹³C RMN (100 MHz) de la desmetilmensacarcina en CDCl₃.

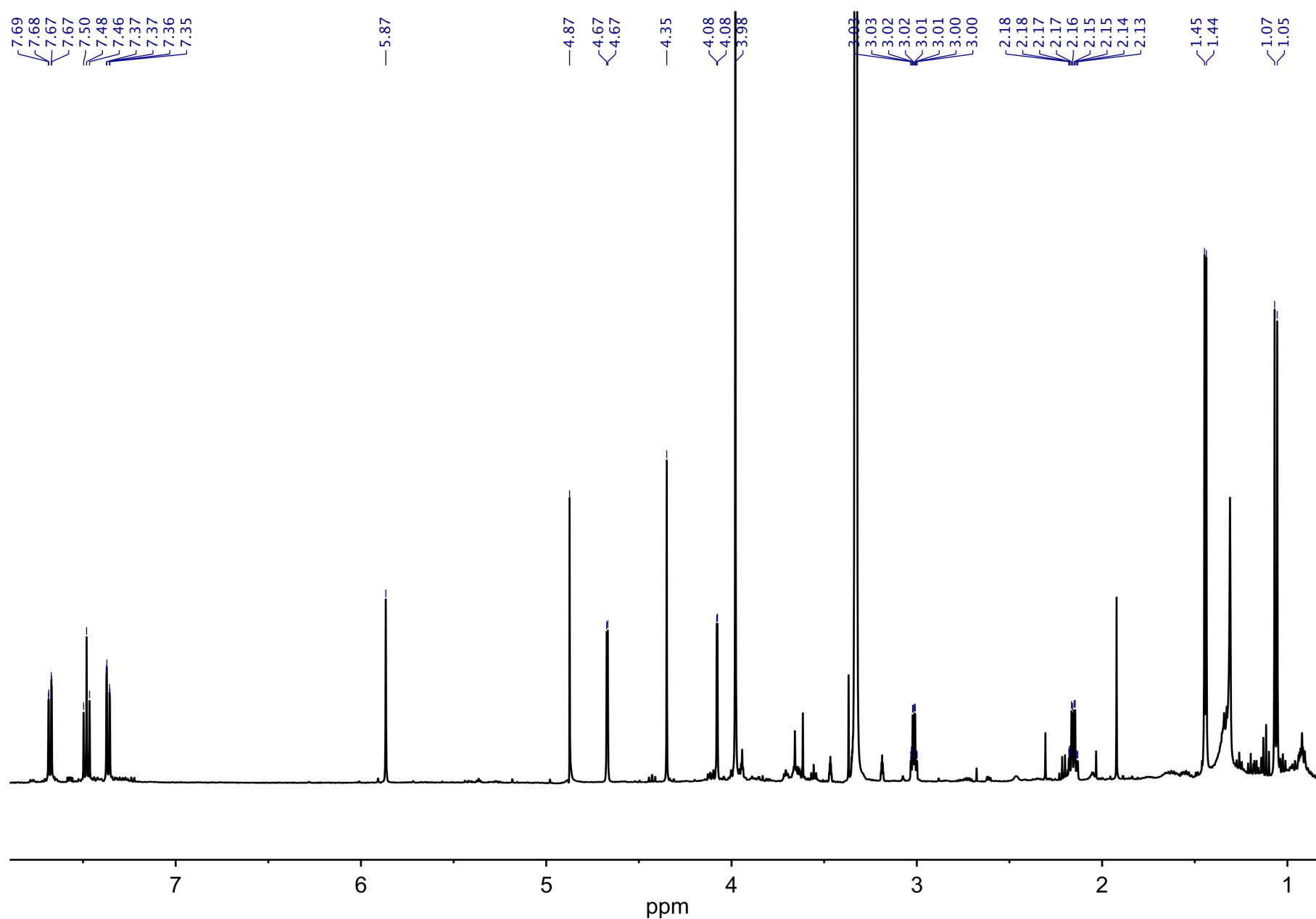
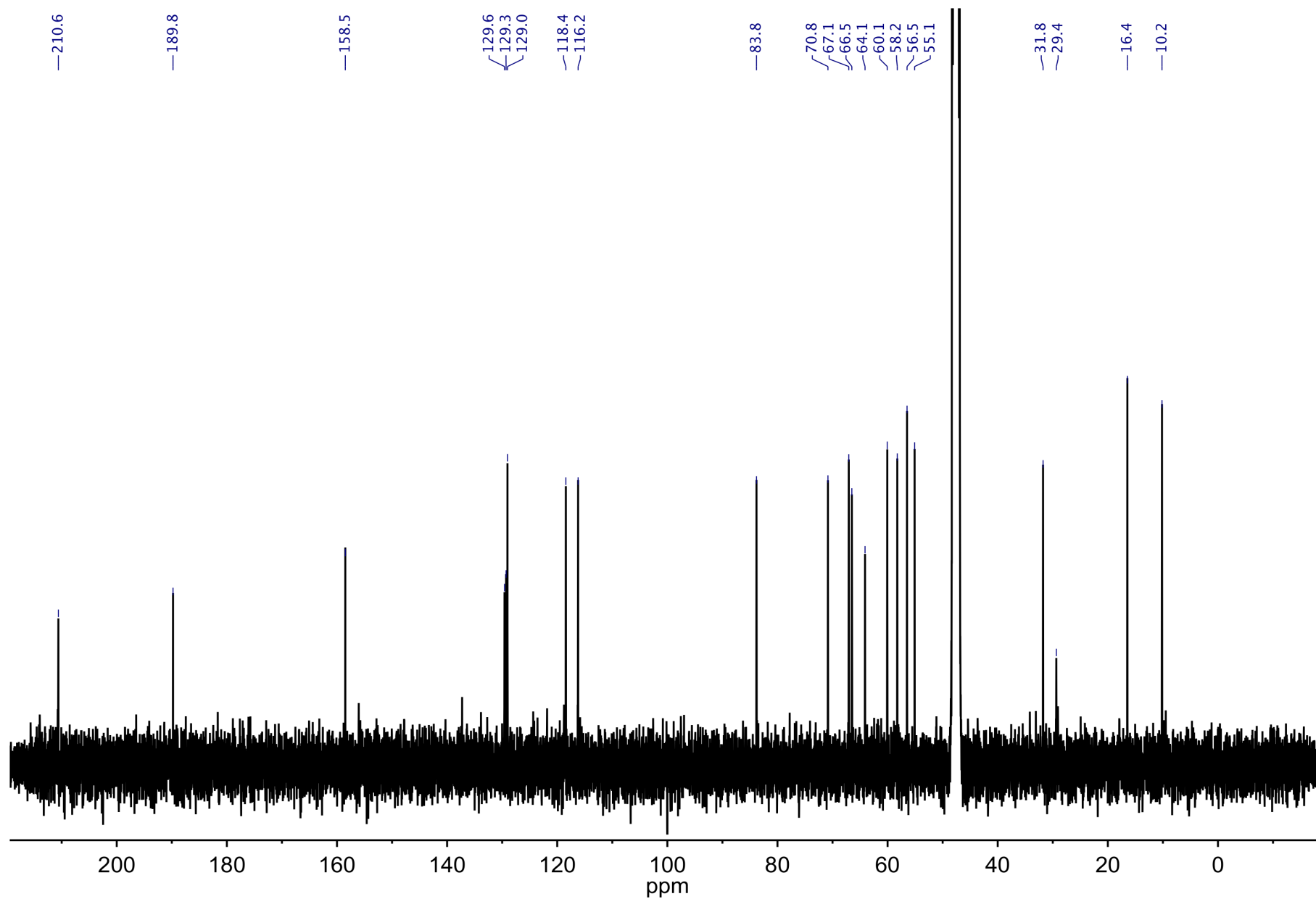


Figura 4.11. Espectro de ^1H RMN (500 MHz) de la desmetilmensacarcina en CD_3OD .



Figura

4.12. Espectro de ^{13}C NMR (100 MHz) de la desmetilensacarcina en CD_3OD .

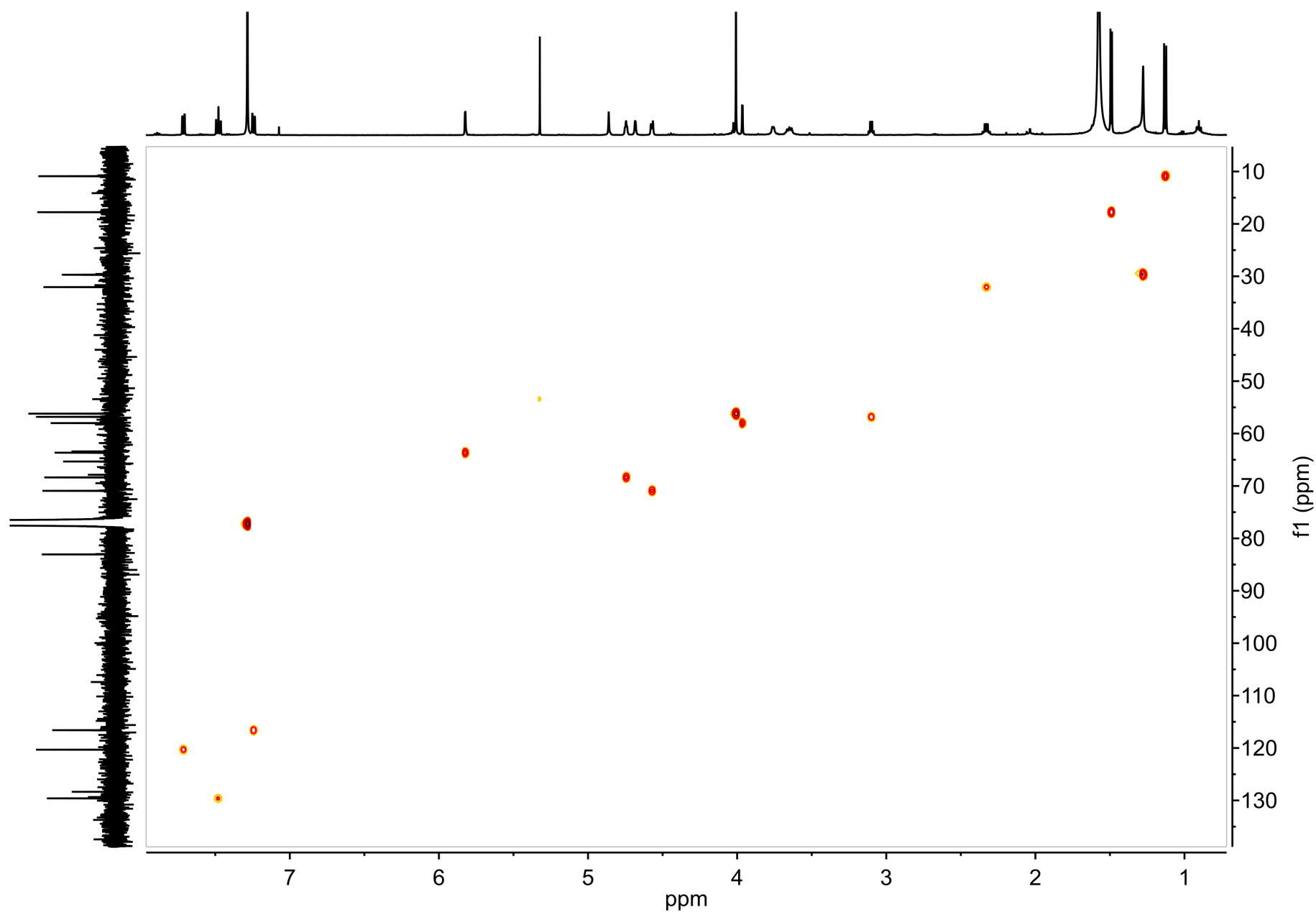
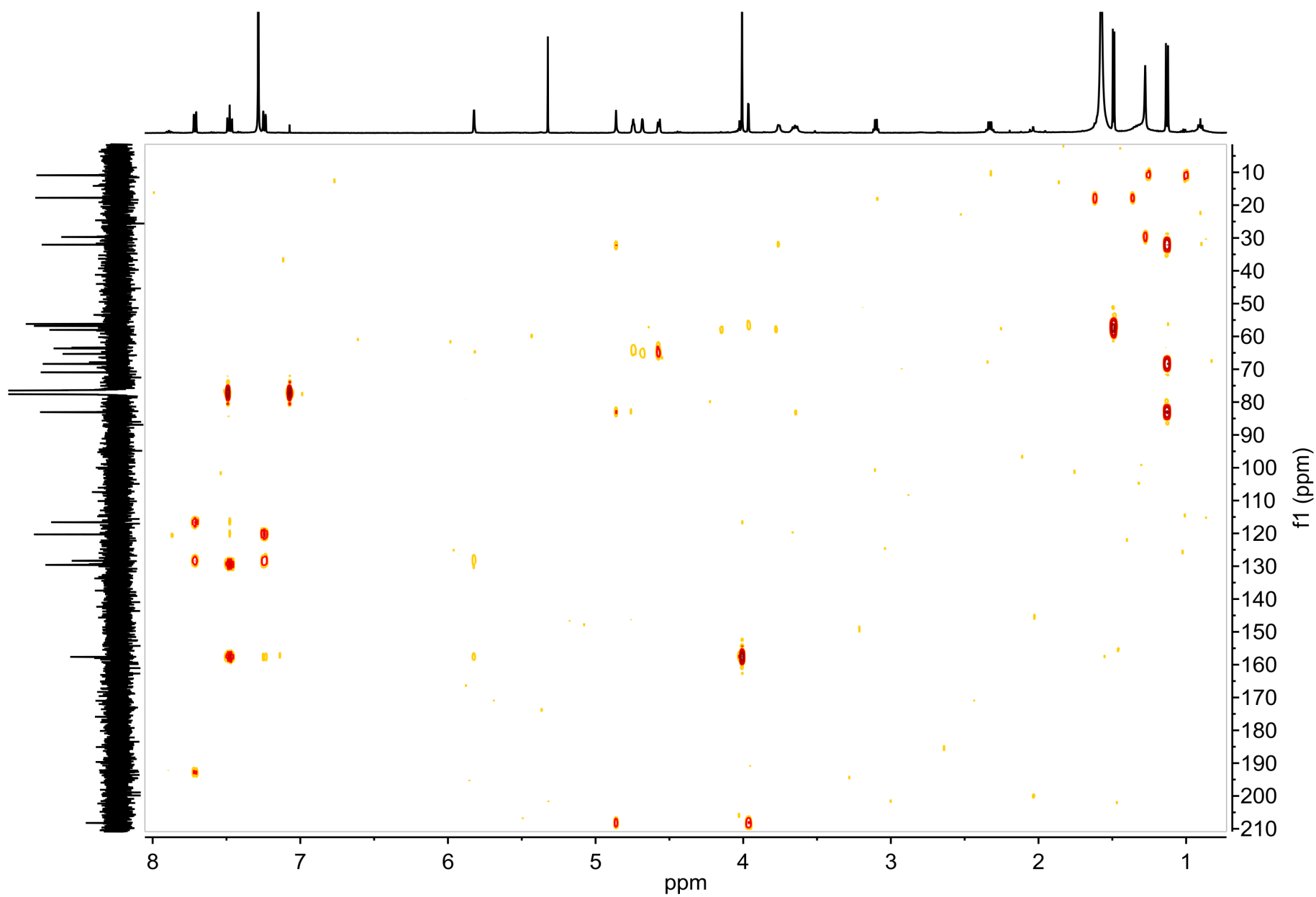
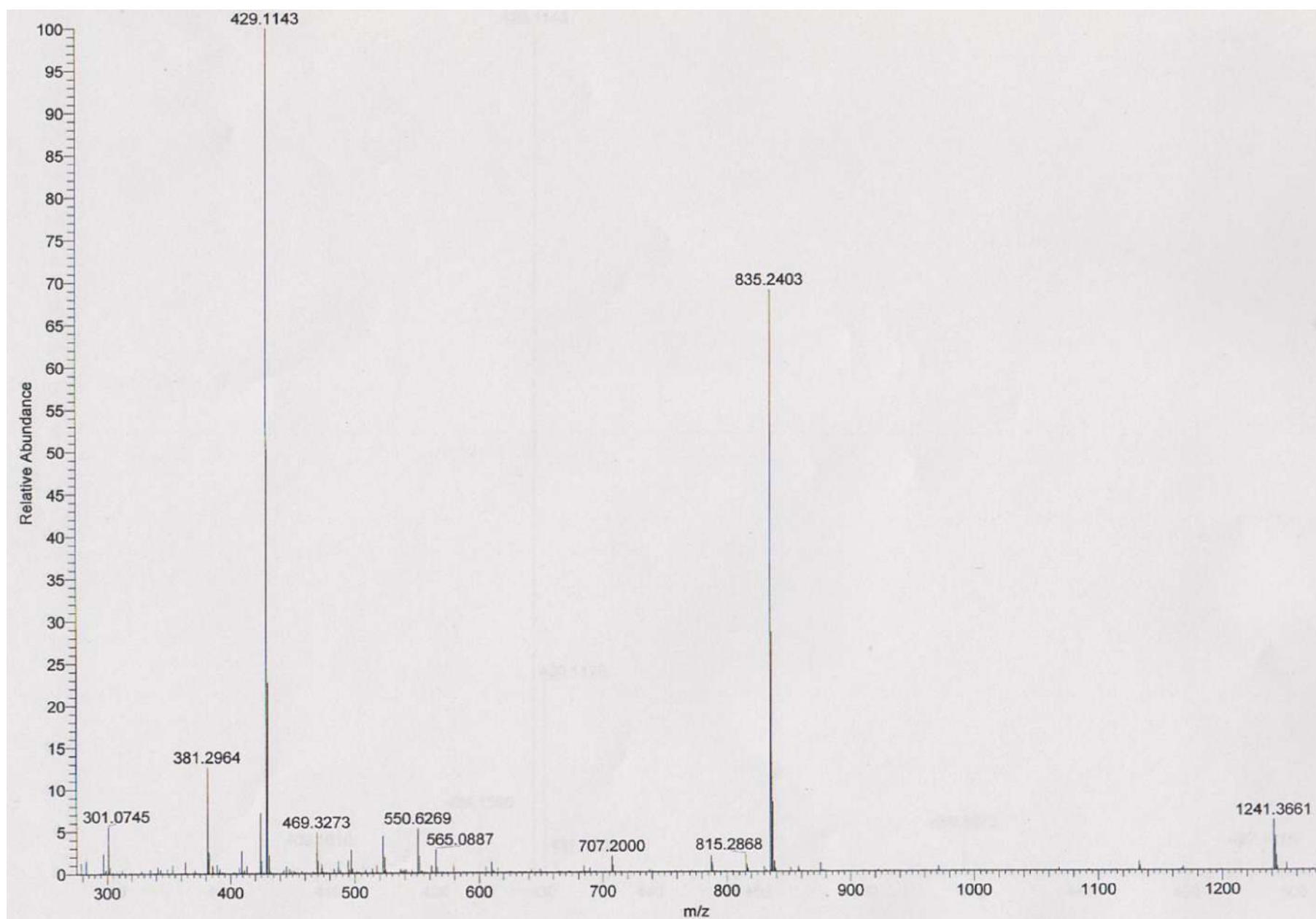


Figura 4.13. Espectro HSQC (500 MHz) de la desmetilensacarcina en CDCl_3 .



Figura

4.14. Espectro HMBC (500 MHz) de la desmetilmensacarcina en CDCl₃.



Figura

4.15. Espectro HR-ESIMS de la desmetilmensacarina.

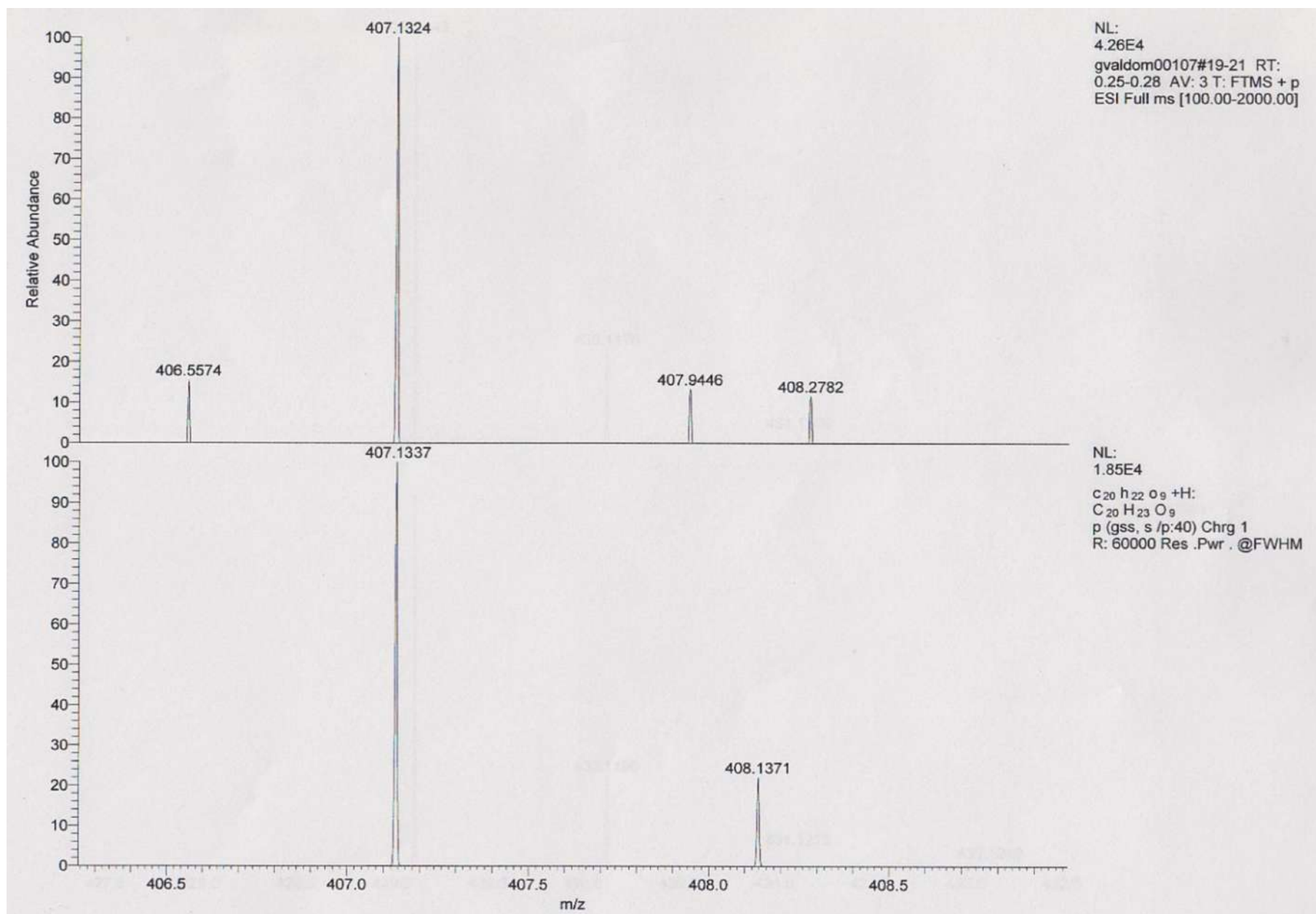


Figura4.15 (continuación). Espectro HR-ESIMS de la desmetilmentsacarina.

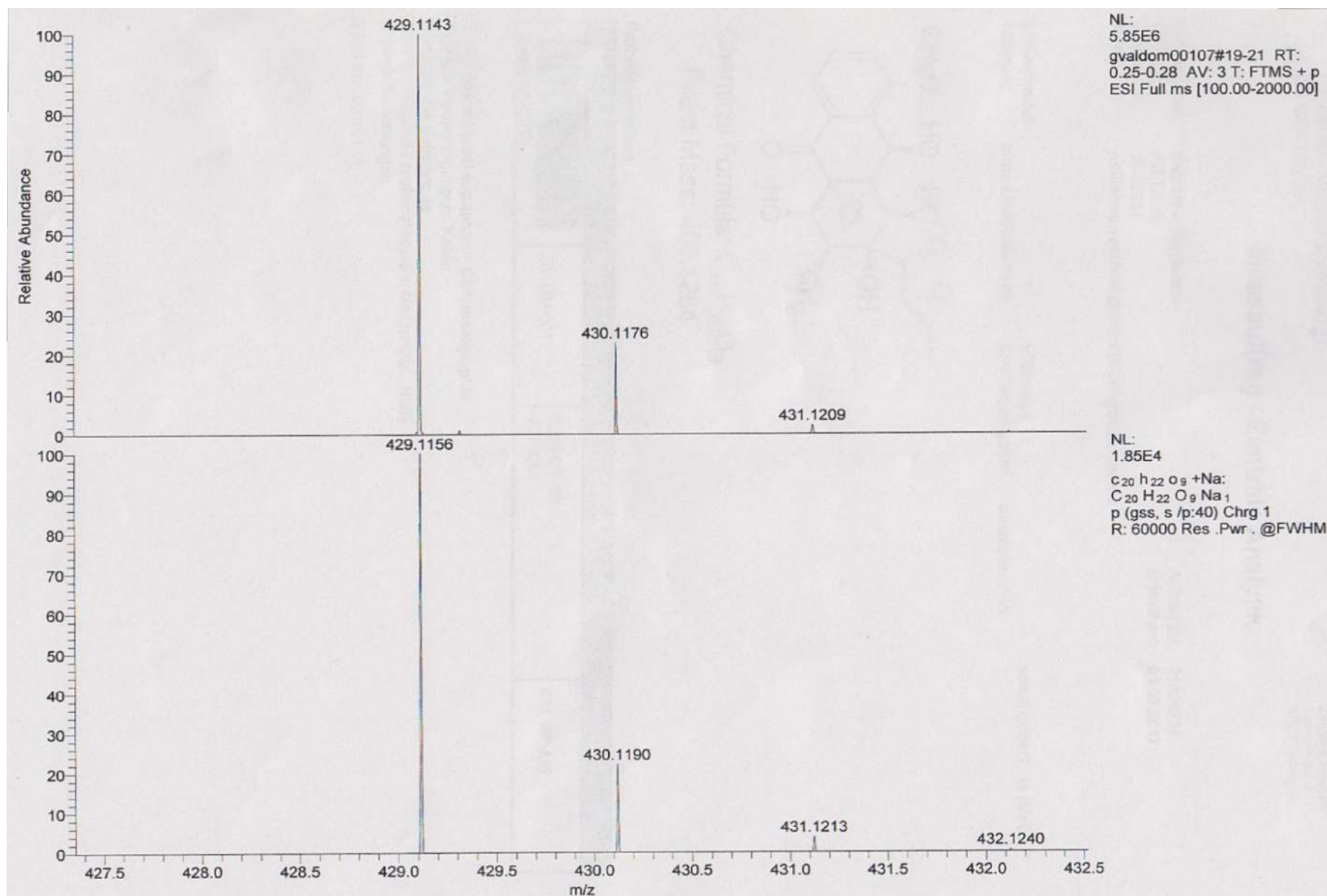


Figura 4.15 (continuación). Espectro HR-ESIMS de la desmetilensacarcina.

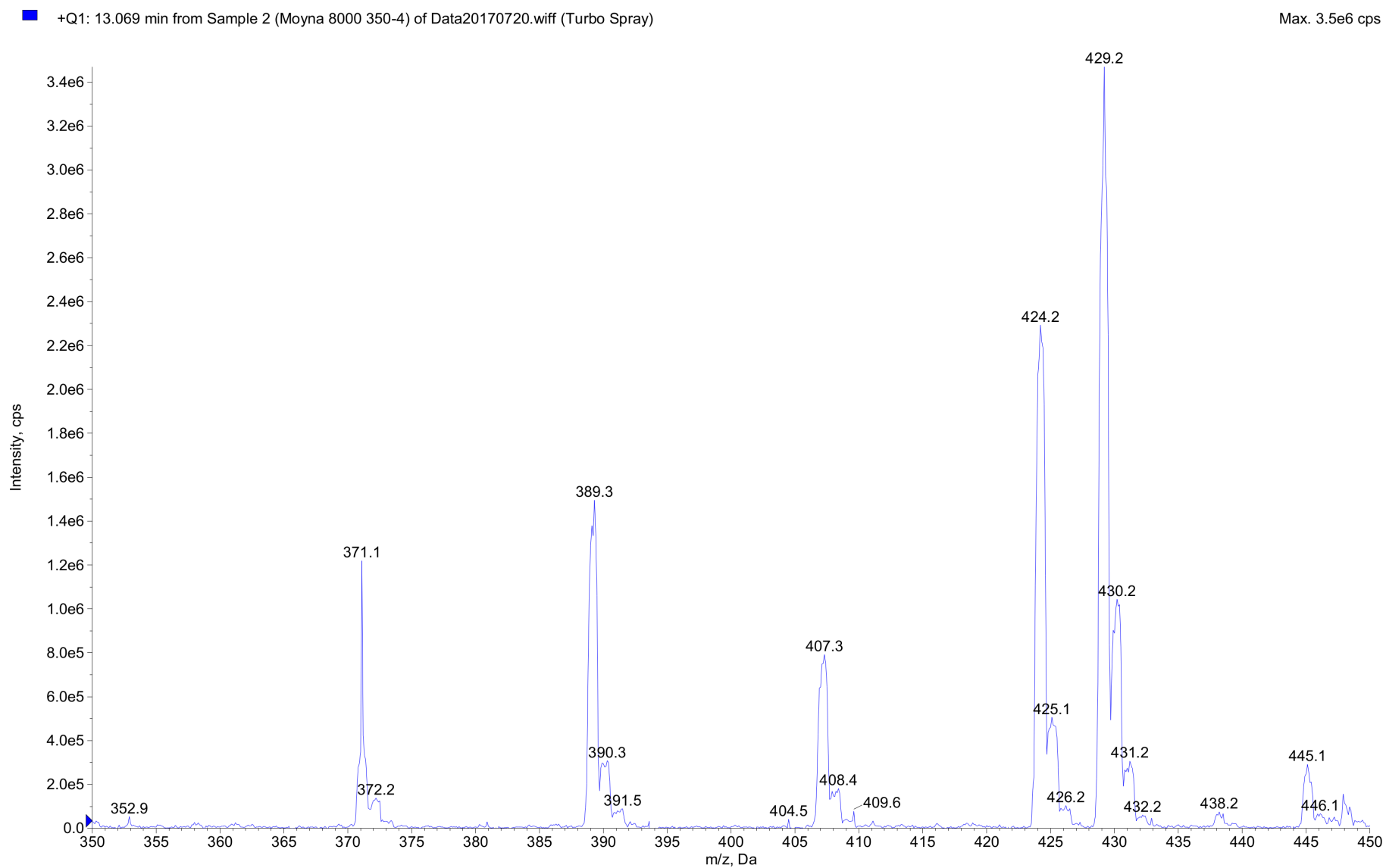


Figura 4.16. Espectro ESIMS² de la desmetilensacarcina obtenido desde el ion $[M+H]^+$ a 407 m/z .

Comparación de la actividad de la desmetilensacarcina con la de taxtomina A

Se comparó la actividad fitotóxica de la toxina desmetilensacarcina con la taxtomina A (Figura 4.17) y se observó que tienen la actividad en el mismo rango de concentraciones. La desmetilensacarcina muestra ser más agresiva, llevando a una necrosis más profunda del tejido de la papa.



Figura 4.17. Comparación de las lesiones necróticas en discos de papa producidas por la taxtomina A (arriba) y la desmetilensacarcina (abajo) en función de la concentración (mg/mL). Se empleó CH₃OH como control negativo.

Evaluación de la producción del compuesto en diferentes medios de cultivo y diferentes tiempos

Se evaluó la capacidad de producción de compuestos fitotóxicos de la cepa ST1015 en diferentes medios de cultivo 7 días post inoculación (Figuras 4.18 y 4.19). De acuerdo a los ensayos realizados, se observó que la cepa ST1015 produce metabolitos fitotóxicos cuando crece en medios con una base vegetal como el PMB (contiene puré de papa) y el medio OBB (componente principal avena). No se observó bioactividad en TSB ni en medio mínimo con agregado de azúcares.

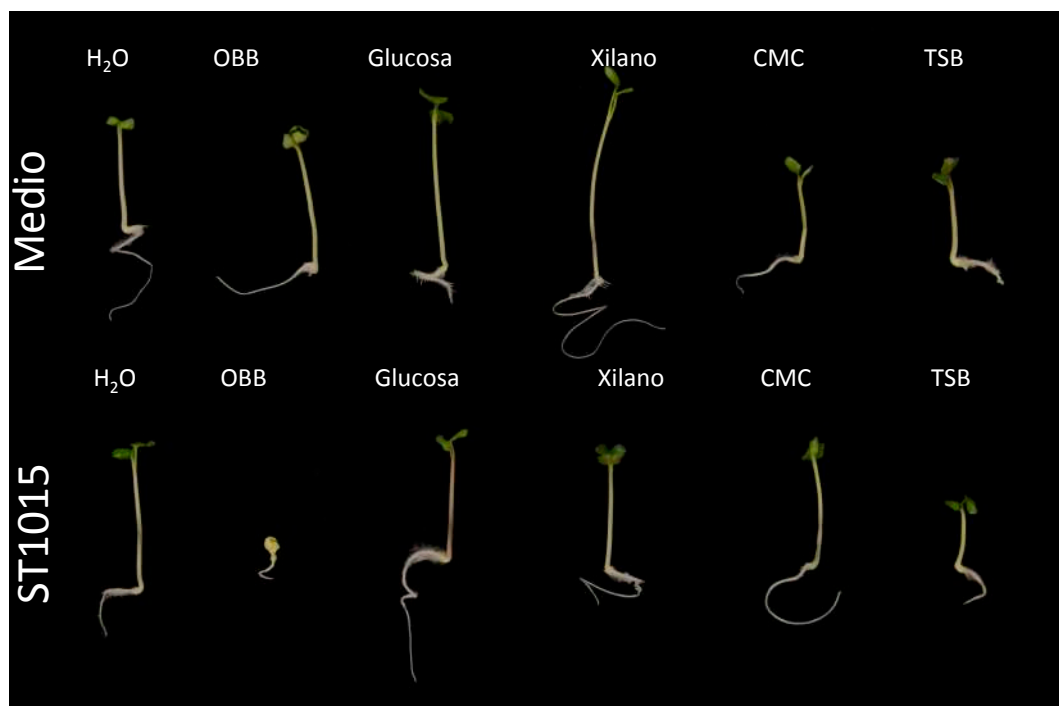


Figura 4.18. Evaluación de los sobrenadantes en diferentes medios de cultivo de la cepa ST1015 en 7 días post inoculación. (Arriba) Plántulas inoculadas con medios de cultivo sin inocular (controles negativos). (Abajo) Plántulas inoculadas con los sobrenadantes de los diferentes medios de cultivo inoculados con la cepa ST1015. Arriba y abajo se muestra una plántula inoculada con agua estéril como control negativo.

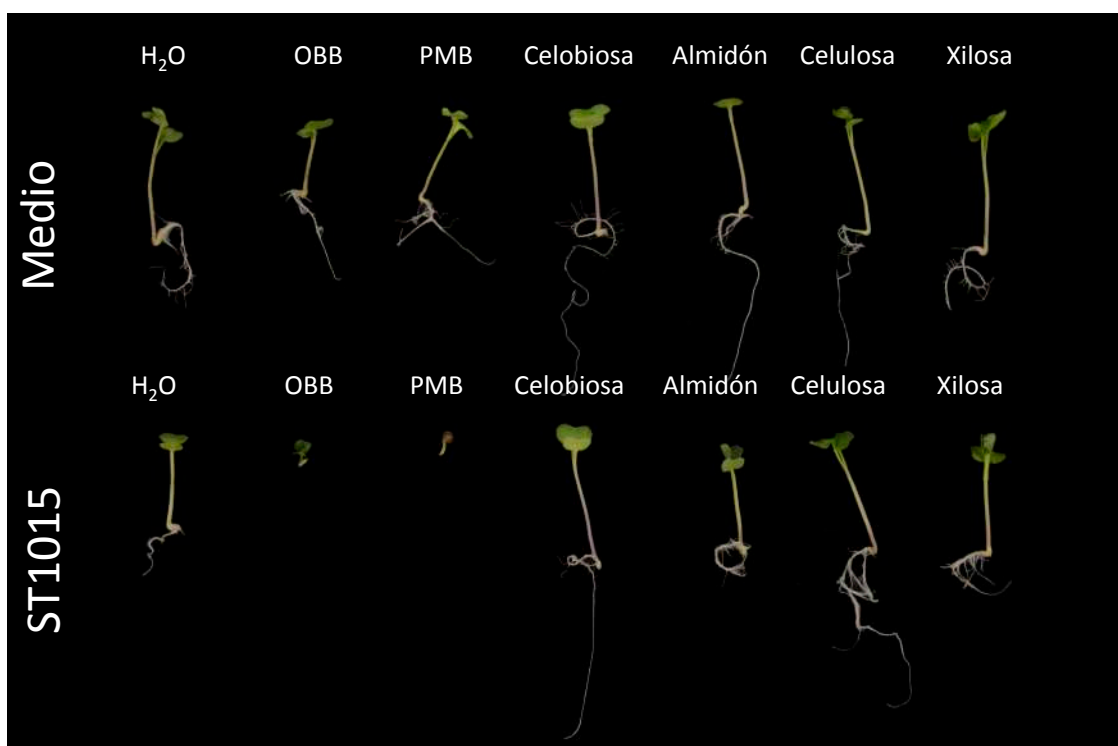


Figura 4.19. Evaluación de los sobrenadantes de la cepa ST1015 en diferentes medios de cultivo 7 días post inoculación. (Arriba). Plántulas inoculadas con los medios de cultivo sin inocular (controles negativos). (Abajo) Plántulas inoculadas con los sobrenadantes de la cepa ST1015 para los diferentes medios de cultivo. Tanto arriba y abajo se muestra una plántula inoculada con agua estéril como control negativo.

Se evaluó la bioactividad de los sobrenadantes de la cepa ST1015 a diferentes tiempos post inoculación 1, 3, 5, y 7 días en los medios de cultivo OBB, PMB diluido al $\frac{1}{4}$, y TSB. Se observó que la cepa ST1015 a partir de los tres días post inoculación en el medio OBB y al primer día post-inoculación en el medio PMB produce metabolitos fitotóxicos. Sin embargo cuando se la inocula en el medio TSB no se observa bioactividad del sobrenadante durante los días en que se realizó el ensayo (Figura 4.20).

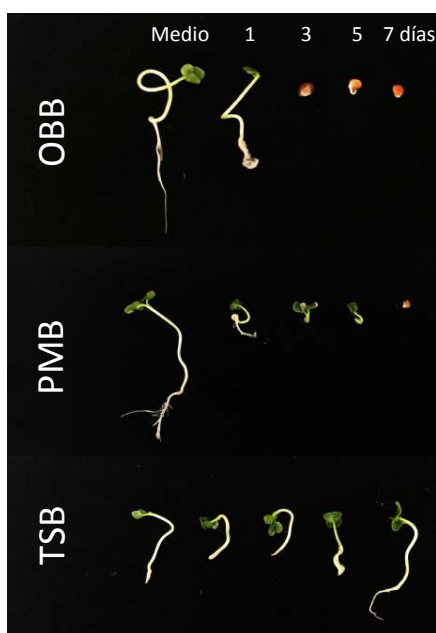


Figura 4.20. Evaluación de los sobrenadantes de la cepa ST1015 en diferentes medios de cultivo. (Arriba) medio OBB, (Medio) medio PMB diluido al $\frac{1}{4}$, (Abajo) medio TSB. Para cada figura de izquierda a derecha se observa plántula inoculada con medio sin inocular (control negativo), seguida de plántulas con sobrenadantes de 1, 3, 5, y 7 días post inoculación.

Se evaluaron los perfiles metabólicos de la cepa ST1015 en los diferentes medios de cultivo a diferentes tiempos post inoculación por resonancia magnética nuclear. Para cada medio de cultivo se realizó la comparación del medio sin inocular y el sobrenadante de la cepa pertenecientes a 1, 3, 5, y 7 días post inoculación. Se muestra para cada medio los espectros apilados de RMN de ^1H RMN donde se aprecian los picos en todo el rango de desplazamientos. Para visualizar si se encuentra la desmetilensacarcina en los sobrenadantes se muestra el espectro en algunos rangos donde se presentan picos característicos de la misma. Los picos a tener en cuenta para detectar la presencia de la desmetilensacarcina son los siguientes: un doblete a 7.68, un triplete a 7.48, un doblete a 7.36, un singulete a 5.87, un doblete a 1.44, y un doblete a 1.13 ppm. Estos datos fueron extraídos del espectro de ^1H RMN de la desmetilensacarcina en CD_3OD , por lo cual por las distintas características de los medios de cultivo los desplazamientos pueden variar.

Espectros de ^1H RMN para la cepa ST1015 en medio OBB

Mediante el análisis de los espectros de la cepa ST1015 en medio OBB se puede observar que la composición de grupos químicos a lo largo del tiempo va cambiando (Figura 4.21). En el espectro recortado (Figura 4.22) a partir del día tres post inoculación se pueden observar los picos característicos de la desmetilmensacrina en los desplazamientos 7.6x (doblete), 7.46 (triplete), 7.34 (doblete), 5.76 (singulete), 1.39 (doblete) y 0.96 ppm (doblete).

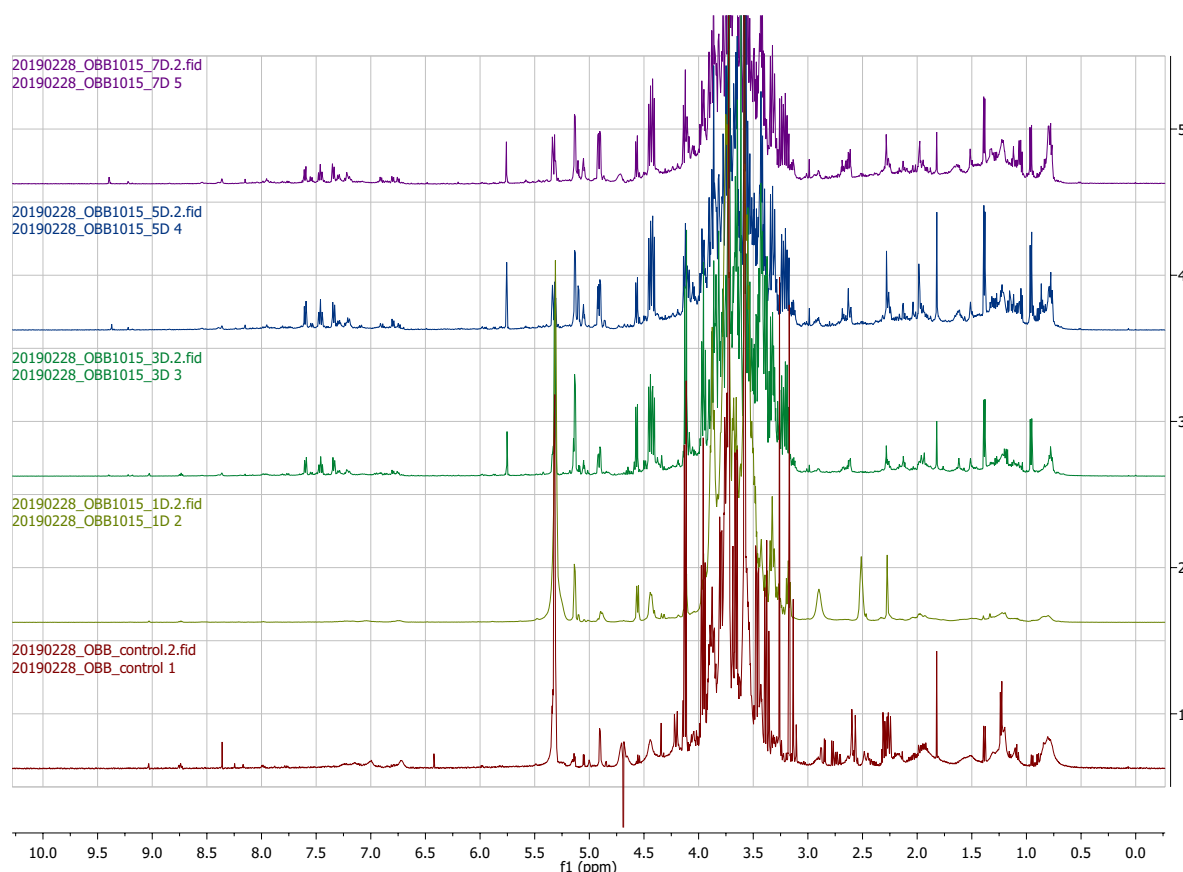


Figura 4.21. Espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en D_2O . Desde abajo se muestran los espectros del blanco (medio OBB sin inocular), los sobrenadantes de las cepa ST1015 de 1, 3, 5, y 7 días post inoculación en medio OBB.

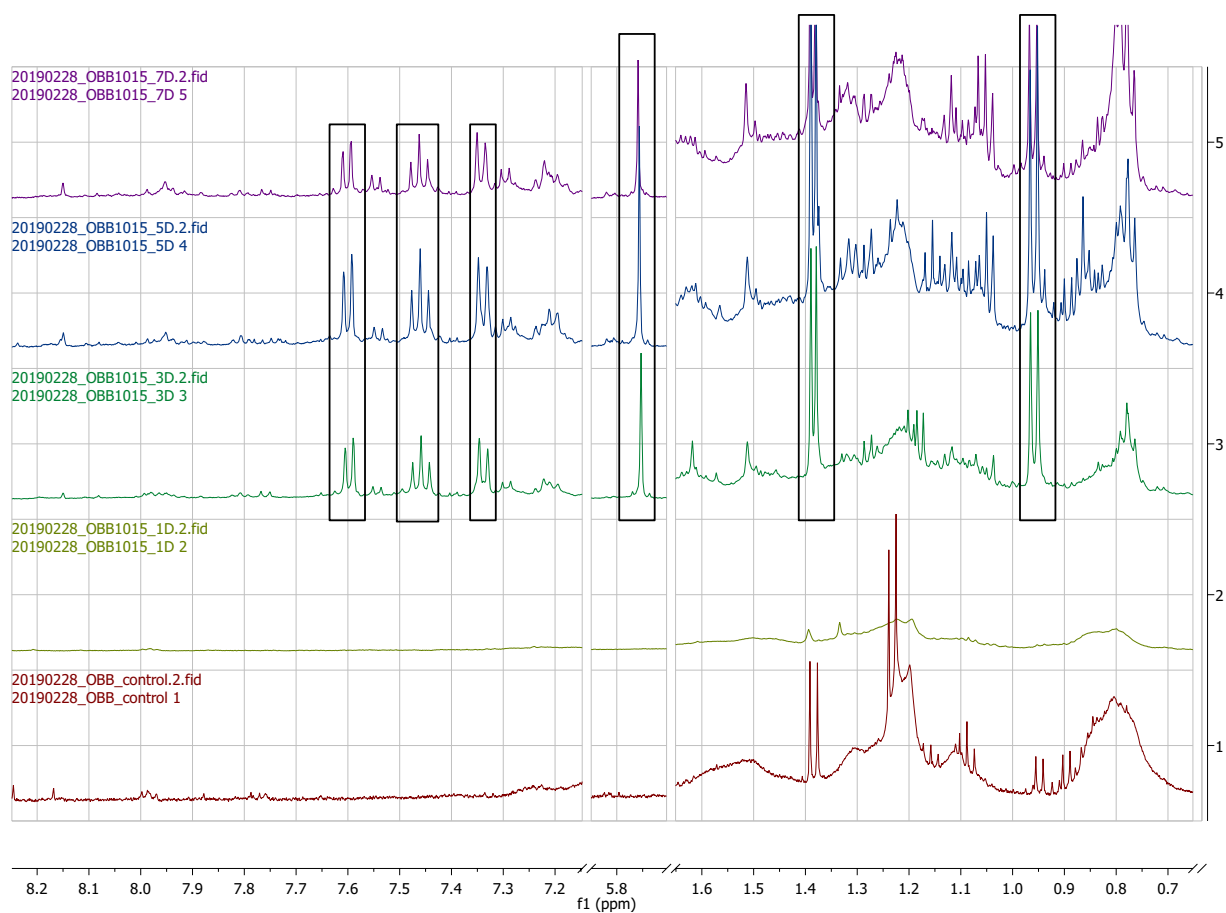


Figura 4.22. Espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en D_2O recortados en rangos. Desde abajo se muestran los espectros de: blanco (medio OBB sin inocular), los sobrenadantes de la cepa ST1015 de 1, 3, 5, y 7 días post inoculación en medio OBB. Los picos característicos de la dmsn se encuentran recuadrados.

Espectros de ^1H RMN para la cepa ST1015 en medio TSB

Mediante el análisis de los espectros de la cepa ST1015 en medio TSB se puede observar que la composición de grupos químicos no varía a lo largo del tiempo y con respecto al control de medio de cultivo (Figura 4.23). En el espectro recortado (Figura 4.24) no se observan los picos característicos de la desmetilmensacarcina.

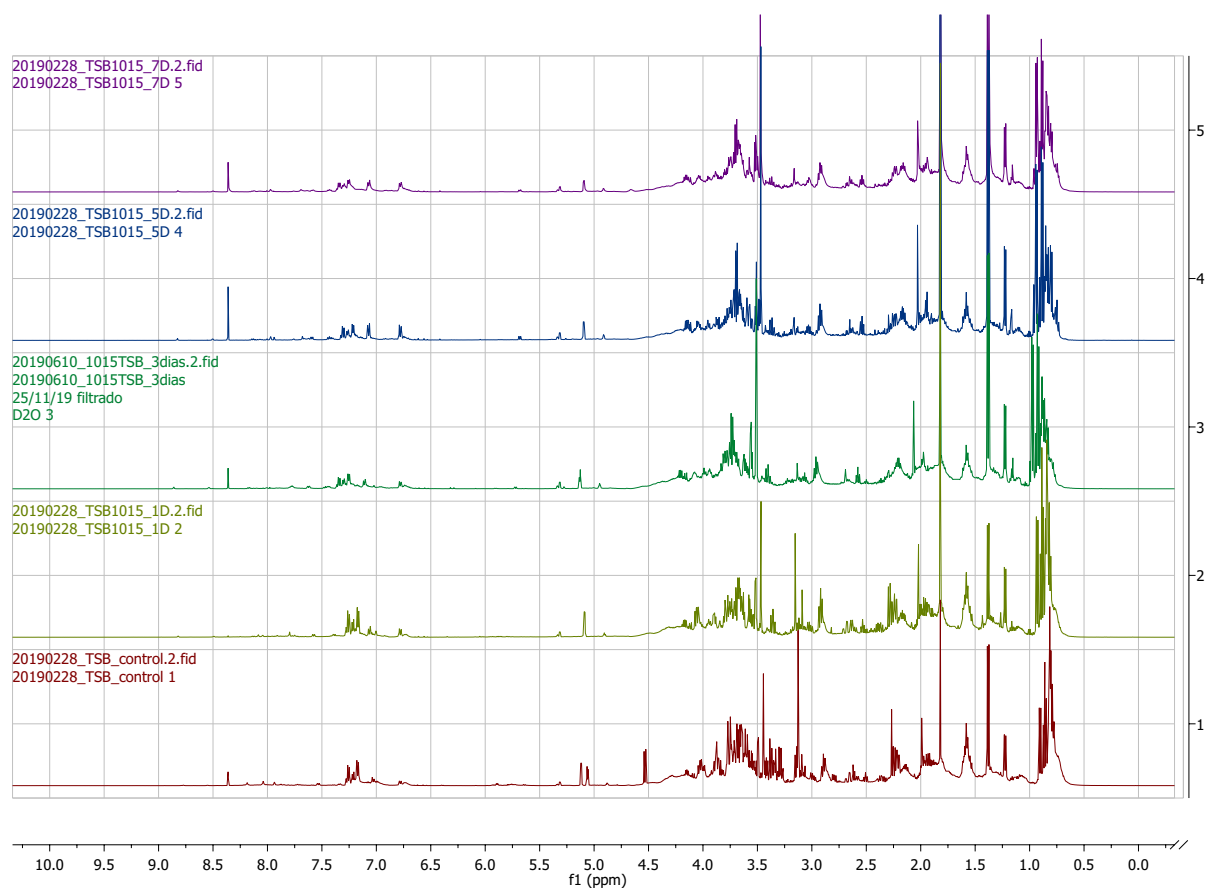


Figura 4.23. Espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en D_2O . Desde abajo se muestran los espectros del blanco (medio TSB sin inocular), los sobrenadantes de la cepa ST1015 de 1, 3, 5, y 7 días post inoculación en medio TSB.

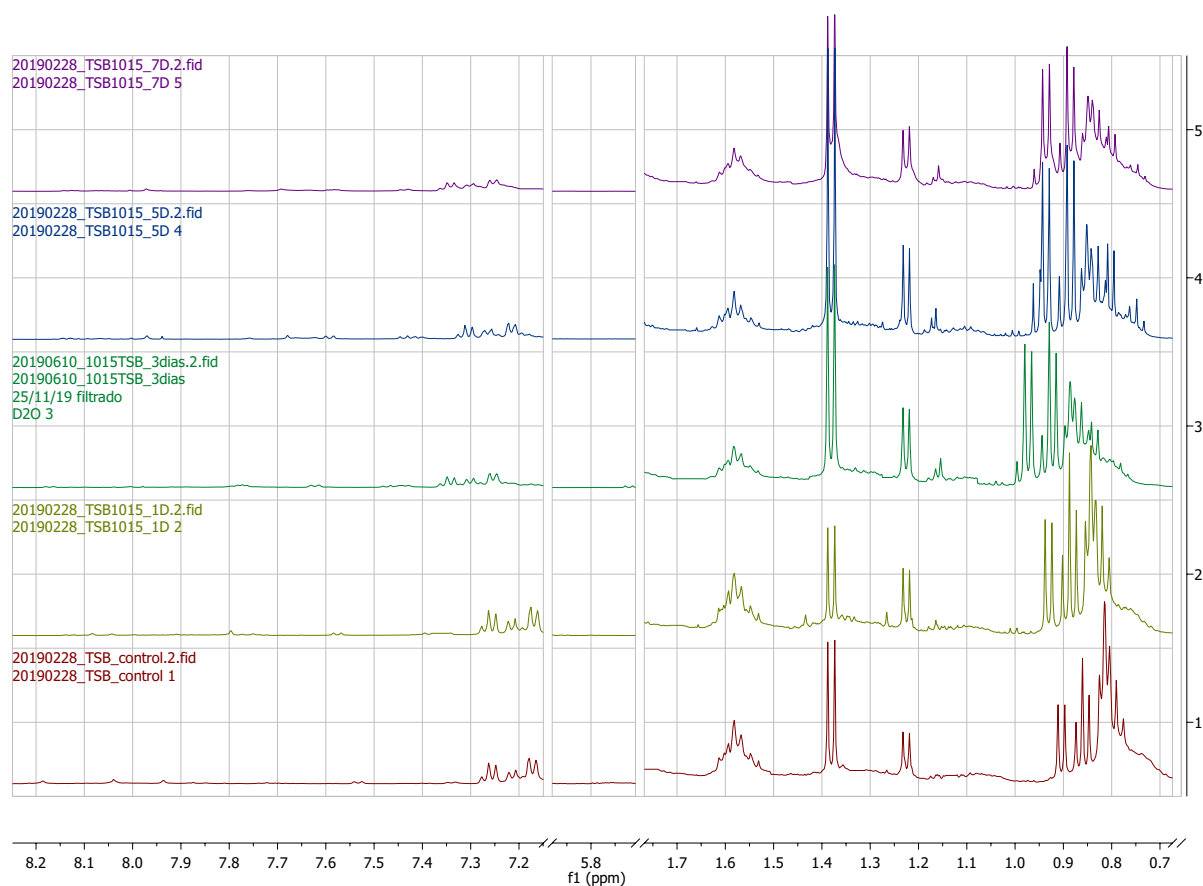


Figura 4.24. Espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en D_2O recortados en rangos. Desde abajo se muestran los espectros del blanco (medio TSB sin inocular), los sobrenadantes de las cepa ST1015 de 1, 3, 5, y 7 días post inoculación en medio TSB.

Espectros de ^1H RMN para la cepa ST1015 en medio PMB

Mediante el análisis de los espectros de la cepa ST1015 en medio OBB se puede observar que la composición de grupos químicos a lo largo del tiempo va cambiando (Figura 4.25). En el espectro recortado (Figura 4.26) no se observan los picos característicos de la desmetilmensarcina.

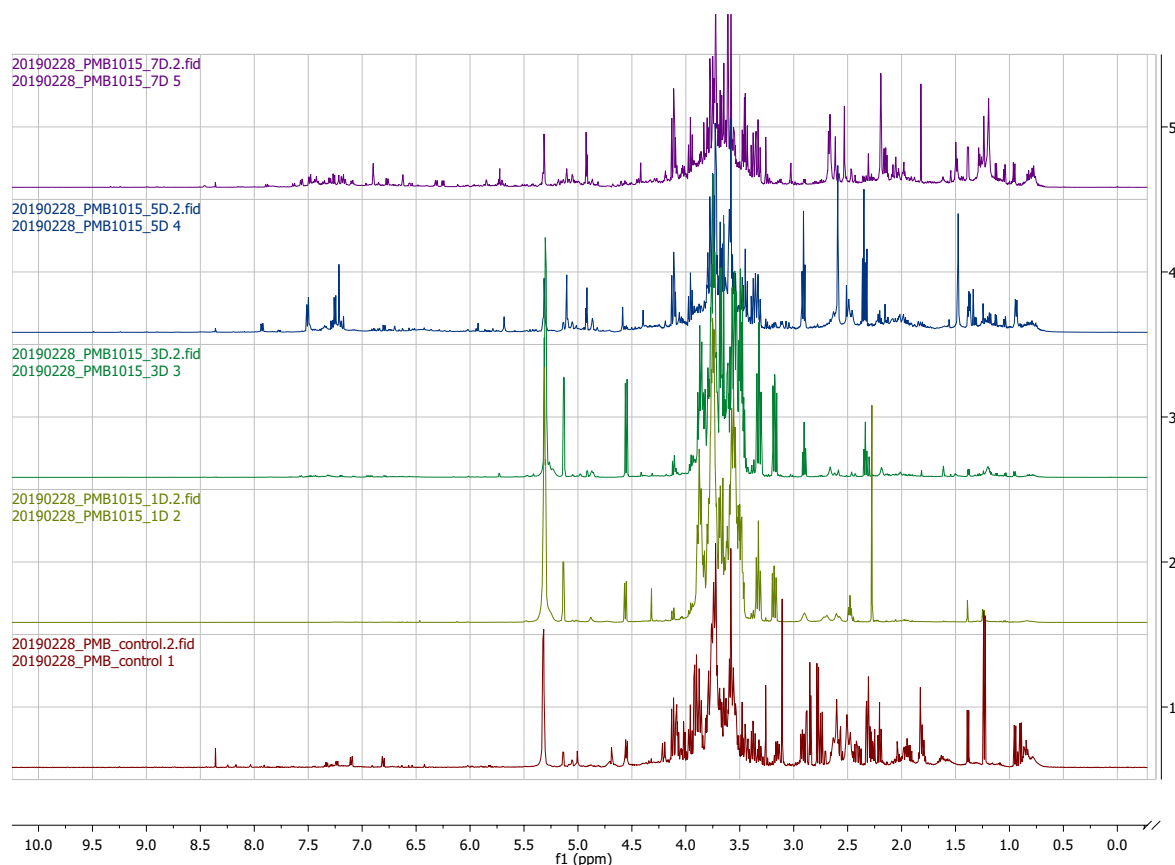


Figura 4.25. Espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en D_2O . Desde abajo se muestran los espectros del blanco (medio PMB sin inocular), los sobrenadantes de las cepa ST1015 de 1, 3, 5 y 7 días post inoculación en medio PMB.

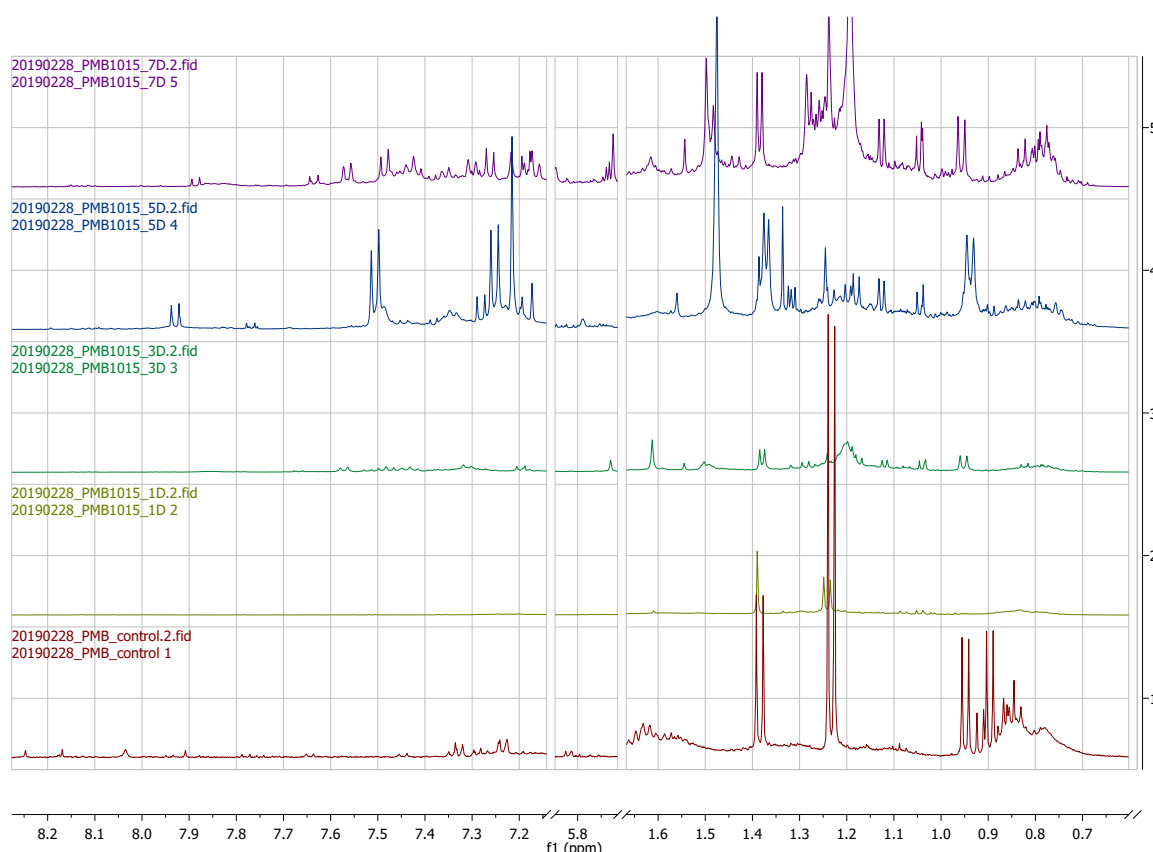


Figura 4.26. Espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en D_2O recortados en rangos. Desde abajo se muestran los espectros del blanco (medio PMB sin inocular), los sobrenadantes de las cepa ST1015 de 1, 3, 5 y 7 días post inoculación en medio PMB.

Discusión

En este estudio, la búsqueda de nuevos factores de patogenicidad en *Streptomyces* spp. se centró en un grupo de cinco cepas representativas de una colección de 70 aislamientos obtenidos previamente (Lapaz, 2014; Lapaz *et al.*, 2017). Este grupo de cepas está formado por tres cepas productoras de taxtomina A que poseen los genes *nec1*, *tomA*, *txtA* y *txtB* e identificadas como *S. scabiei* (ST129), *S. europaeiscabiei* (ST1229) y *S. acidiscabies* (ST105), y dos cepas de *S. niveiscabiei*, ST1015 y ST1020, en las que no se detectaron los genes de la IPA mencionados anteriormente y no producen TxtA. Por otro lado, estas cinco cepas fueron secuenciadas, lo que permitió realizar análisis genómicos comparativos de forma de identificar los posibles nuevos factores de virulencia. Buscando profundizar sobre el fenotipo patogénico de las cepas y basándonos en el trabajo previo de Fyans *et al.* (2016), se sumaron nuevos ensayos a los previamente realizados en disco de papa (Lapaz *et al.*, 2017). Éstos fueron ensayos en rabanito e infiltración en hojas de tabaco. Tal como era de esperar, el ensayo en rabanito evidenció que las cinco cepas patógenas analizadas y las dos cepas de referencia, *S. scabiei* DSM41658, y *S.*

acidiscabies DSM41668, inhibieron el crecimiento de las raíces y los brotes en las plántulas. El ensayo de papa, realizado nuevamente y en paralelo, mostró necrosis tisular para las cepas ST105, ST1015, ST1020, ST129, y *S. acidiscabies* DSM41668. Sin embargo, para las cepas ST1229 y la cepa de referencia *S. scabiei* DSM41658 no se observó necrosis del tejido. Esto indicaría que la patogenicidad de cepas menos virulentas no se podría detectar mediante ensayos en discos de papa, en tanto que el ensayo en rabanito demostró ser el más sensible. Estos resultados tienen sentido, ya que de acuerdo a la literatura los *Streptomyces* patógenos afectan a los cultivos en expansión activa, dado que la taxtomina inhibe la síntesis de celulosa (Loria *et al.*, 2008). En el caso de la infiltración en tabaco, este ensayo resultó aún más limitado ya que solo se produjo necrosis del tejido en las cepas patógenas ST105, ST1015, ST1020, y la cepa de referencia *S. acidiscabies* DSM41668. Tanto estos resultados como los de Fyans y colaboradores (2016) en que cepas patógenas no producen necrosis al ser infiltradas en tabaco, dejan en claro que se trata de un ensayo que no es adecuado para observar patogenicidad en el género *Streptomyces*. Por otra parte, las cepas *S. niveiscabiei* ST1015 y ST1020 que no producen taxtomina A mostraron un fenotipo patogénico en los tres bioensayos realizados. Los resultados contundentes en estas cepas llamaron la atención, por lo que se dirigió la búsqueda hacia el compuesto responsable de bioactividad en los sobrenadantes de los cultivos. Esto se basó en los profusos antecedentes sobre la producción de metabolitos secundarios de este género y apoyados en los reportes previos sobre proteínas secretadas, fitotoxinas y fitohormonas que actuarían como factores de virulencia (Li *et al.*, 2019). Para la búsqueda de metabolitos fitotóxicos las cepas se cultivaron en el medio OBB. Este medio realizado en base de avena, es el medio inductor de la taxtomina A y ha sido utilizado para la búsqueda de nuevas fitotoxinas (Fyans *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2005; Natsume *et al.*, 2005, 2018). Las cepas secuenciadas y las dos cepas de referencia fueron cultivadas en medio OBB de forma de inducir la producción de taxtomina A y evaluar si era posible detectar en los sobrenadantes una fitotoxina responsable del fenotipo patogénico. Los sobrenadantes filtrados utilizados en los ensayos de discos de papa, rabanito e infiltración en hojas de tabaco de todas las cepas patógenas con excepción de la cepa de *S. niveiscabiei* ST1020 produjeron inhibición de raíces y brotes en rabanito así como necrosis en el tejido de papa. En el caso de la infiltración en tabaco se necrosó el tejido cuando se infiltró con los sobrenadantes de las cepas *S. niveiscabiei* ST1015, *S. acidiscabies* ST105 y *S. scabiei* ST129. La bioactividad de los sobrenadantes de las cepas que producen taxtomina se debería a dicha toxina. Respecto al sobrenadante de la cepa ST1020, que no mostró bioactividad en ninguno de los ensayos realizados, se considera que o bien no produce ningún compuesto fitotóxico o lo produce en baja concentración y no es suficiente para causar daño en las células vegetales. Para el caso de la cepa ST1015 se obtuvo bioactividad del sobrenadante en los tres bioensayos en plantas realizados, por lo que produciría uno o varios

compuestos fitotóxicos. Para confirmar estos resultados se analizó el perfil metabólico mediante RMN de los sobrenadantes de la cepas ST1020, ST1015 y la cepa de referencia *S. acidiscabies* DSM41668 (Figuras 4.4 y 4.5). Para la cepa de *S. acidiscabies* se observaron los picos correspondientes a la taxtomina A. Para la cepa ST1020 no se observó diferencia con respecto al control del medio de cultivo OBB, por lo que si produce algún metabolito no se detectó mediante la técnica utilizada. En el caso de la cepa ST1015 se observaron diferencias con respecto al control y con el sobrenadante de la cepa *S. acidiscabies* DSM41668, por lo que esta cepa seguramente produjo uno o varios compuestos. Estos resultados centraron nuestro interés en la cepa *S. niveiscabiei* ST1015, ya que era la única cepa no productora de taxtomina A que exhibía un fenotipo patogénico y excretaba alguna sustancia fitotóxica. El siguiente paso fue el aislamiento y la caracterización de las potenciales fitotoxinas producidas por la cepa de *S. niveiscabiei* ST1015. A partir del sobrenadante liofilizado del cultivo de la cepa ST1015 se aisló, mediante una TLC preparativa, un compuesto con una pureza relativamente buena y un rendimientos de 200 mg/l de medio de cultivo. Los análisis físicoquímicos demostraron que el compuesto no estaba relacionado con la taxtomina A, y su actividad en los ensayos en discos de papa y plántulas de rabanito era comparable al de los sobrenadantes originales. Por medio de varios métodos de análisis como espectrometría de masas (LC-MS/MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) multinuclear mono y bidimensional (NOESY-1D, COSY, HSQC, HMBC), se llegó a elucidar la estructura del compuesto como la de la desmetilmensacarcina (Figura 4.7). Este policétido, junto con un derivado metilado conocido como la mensacarcina, fue aislado y reportado por Arnold (2002), de una cepa de *S. bottropensis* encontrada en un muestra de suelo en Alemania. Una vez identificado el compuesto, se comparó su fitotoxicidad con la de la taxtomina A en un ensayo en discos de papa. La Figura 4.17, muestra que ambos compuestos son fitotóxicos en el rango de concentración de 0.1-10.0 mg/mL. Sin embargo, este ensayo evidenciaría que la desmetilmensacarcina es más agresiva y produce una necrosis más profunda en el tejido del tubérculo en comparación con las lesiones superficiales causadas por la taxtomina A, lo que ratificaría a este compuesto como factor de virulencia de la cepa ST1015. La actividad biológica de este tipo de policétidos ha sido ampliamente estudiada. De hecho, la actividad antitumoral y el modo de acción de su derivado metilado la mensacarcina están bien documentados (Arnold, 2002; Maier *et al.*, 2014; Plitzko *et al.*, 2017). Del mismo modo, hay varios informes sobre la actividad antitumoral y antibacteriana de la cervicarcina, un análogo desmetilado del compuesto identificado producido por *S. ogaensis* (Ohkuma *et al.*, 1962; Marumo *et al.*, 1964). Sin embargo, esta es la primera vez que un compuesto de esta clase se asocia con actividad fitotóxica. También vale la pena señalar que la desmetilmensacarcina se aisló originalmente de *S. bottropensis* (Arnold, 2002), y que algunas cepas de esta especie están asociadas con la sarna común. Si bien todas las cepas patógenas de *S. bottropensis* reportadas

poseen los genes *txtA* y *txtB*, no se confirmó la producción de taxtomina para ninguna de ellas (Leiminger *et al.*, 2012; Wanner, 2009; Zhou *et al.*, 2017). Por lo tanto, la actividad fitotóxica en la papa de estas cepas patógenas podría deberse a las taxtominas, policétidos como la desmetilmensacarcina o la combinación de metabolitos de ambas clases. Como se mencionó anteriormente la mensacarcina es un compuesto muy estudiado debido a su potencial como fármaco antitumoral. Los estudios que utilizan células de melanoma han demostrado que la mensacarcina activa las vías apoptóticas dependientes de caspasa e induce la muerte celular con selectividad relativa contra este tipo de células. Plitzko y colaboradores (2017) indican que el sitio blanco de la mensacarcina se encuentra en las mitocondrias y afecta su función de manera atípica. Esta información es relevante, ya que el modo de acción de la desmetilmensacarcina podría ser similar en las células vegetales. Por otro lado, para la mensacarcina se reportó el *cluster* de biosíntesis en *S. bottropensis* que ha sido el punto de partida para la búsqueda de uno similar en el genoma de la cepa productora de desmetilmensacarcina (Yan *et al.*, 2012; Maier *et al.*, 2014). La caracterización del *cluster* de la desmetilmensacarcina en el genoma de la cepa ST1015 es de gran importancia para poder dilucidar su función en los *Streptomyces* patógenos, así como la búsqueda de potenciales cepas productoras de dicho compuesto mediante técnicas de biología molecular. La mensacarcina no se ha logrado sintetizar totalmente (Tietze *et al.*, 2005; 2007), y la cepa de *Streptomyces bottropensis* la produce con un rendimiento de 60 mg/l (Arnold, 2002). La cepa ST1015 se considera de gran interés biotecnológico, dado que produce un precursor de dicho compuesto con mucho mayor rendimiento. Por otro lado se evaluó la producción de la desmetilmensacarcina en otros medios de cultivo distintos al OBB, ya que sería esperable que el compuesto fuera inducible si está relacionado a la patogenicidad por lo que su producción tendría lugar cuando el microorganismo se encuentra en contacto con el huésped. Por ejemplo, la producción de taxtomina está regulada y se expresa solamente cuando el microorganismo está en contacto con los celo-oligosacáridos celobiosa y celotriosa, así como el componente de la peridermis del tubérculo de papa suberina (Francis *et al.*, 2015, Komeil *et al.*, 2013). Se evaluó la producción de compuestos fitotóxicos de la cepa ST1015 en medios con base vegetal como el OBB y el PMB, medio mínimo con el agregado de diferentes azúcares y polisacáridos, y el medio complejo TSB. Se comprobó que después de 7 días post-inoculación los sobrenadantes que exhibieron bioactividad en el ensayo en rabanito fueron los de los medios con base vegetal. No se observó bioactividad en los sobrenadantes del cultivo para los demás medios. Ésto indicaría que los componentes celulosa, xilosa, celobiosa, xilano, glucosa, o almidón no inducirían la producción del compuesto. Estos resultados indicarían que el compuesto no se produce constitutivamente en la cepa ST1015. También se realizó un análisis más detallado de la bioactividad de los sobrenadantes en los medios OBB, PMB y TSB a diferentes días post-inoculación. No se observó bioactividad de los sobrenadantes de la cepa

ST1015 en medio TSB. Sin embargo, a partir de los tres días post-inoculación de la cepa ST1015 en el medio OBB y al primer día post-inoculación en el medio PMB se detectaron metabolitos fitotóxicos. Para el medio OBB la presencia de la desmetilmensacarcina a partir de los tres días post-inoculación fue confirmada por RMN. Por lo tanto, el metabolito se comenzaría a producir posiblemente antes de los tres días post-inoculación y no se detectaría antes de este tiempo debido a la sensibilidad del método utilizado. En resumen, ha sido relevante el demostrar que la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 produce una fitotoxina que asociamos a su patogenicidad, el policétido desmetilmensacarcina. Se trata de un hallazgo significativo, ya que representa el descubrimiento de un nuevo factor de virulencia relacionado con una enfermedad económicamente importante que afecta la producción de papa en todo el mundo. También es la primera vez que un compuesto de esta clase, conocido por su actividad antitumoral y antibiótica, se asocia con la fitotoxicidad. Por otro lado la producción del compuesto se induce en un contexto de componentes vegetales y se produciría al menos a los tres días post-inoculación.

Bibliografía

- Arnold M. 2002. CD-aktive metabolite aus Streptomyceten sowie Untersuchung der Biosyntheseleistungen des Mensacarcin-Bildners *Streptomyces* sp. Gö C4/4. Göttingen: Cuvillier Verlag.
- Bignell, D. R. D., Fyans, J. K., & Cheng, Z. (2014). Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *Journal of applied microbiology*, 116(2), 223-235.
- Bignell, D. R., Cheng, Z., & Bown, L. (2018). The coronafacoyl phytotoxins: structure, biosynthesis, regulation and biological activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(5), 649-666.
- Cao, Z., Khodakaramian, G., Arakawa, K., & Kinashi, H. (2012). Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(2), 353-357.
- Francis, I. M., Jourdan, S., Fanara, S., Loria, R., & Rigali, S. (2015). The cellobiose sensor CebR is the gatekeeper of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *MBio*, 6(2), e02018-14.
- Fyans, J. K., Bown, L., & Bignell, D. R. (2016). Isolation and characterization of plant-pathogenic *Streptomyces* species associated with common scab-infected potato tubers in Newfoundland. *Phytopathology*, 106(2), 123-131.
- Huguet-Tapia, J. C., Bignell, D. R., & Loria, R. (2014). Characterization of the integration and modular excision of the integrative conjugative element PAIS in *Streptomyces turgidiscabies* Car8. *PloS one*, 9(6), e99345.
- Johnson, E. G., Joshi, M. V., Gibson, D. M., & Loria, R. (2007). Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-causing *Streptomyces* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(1-3), 18-25.
- Jordaan, E., & Van der Waals, J. E. (2016). *Streptomyces* species associated with common scab lesions of potatoes in South Africa. *European journal of plant pathology*, 144(3), 631-643.
- King, R. R., Lawrence, C. H., Clark, M. C., & Calhoun, L. A. (1989). Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (13), 849-850.
- King, R. R., & Calhoun, L. A. (2009). The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 70(7), 833-841.
- Komeil, D., Simao-Beaunoir, A. M., & Beaulieu, C. (2013). Detection of potential suberinase-encoding genes in *Streptomyces scabiei* strains and other actinobacteria. *Canadian journal of microbiology*, 59(5), 294-303.
- Lapaz, M. I. (2014). Estudio de las cepas de *Streptomyces* spp. causantes de sarna común en la papa en Uruguay. Tesis de Maestría.
- Lapaz, M. I., Huguet-Tapia, J. C., Siri, M. I., Verdier, E., Loria, R., & Pianzzola, M. J. (2017). Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant disease*, 101(8), 1362-1372.

- Leiminger, J., Frank, M., Wenk, C., Poschenrieder, G., Kellermann, A., & Schwarzfischer, A. (2013). Distribution and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Germany. *Plant Pathology*, 62(3), 611-623.
- Li, Y., Liu, J., Díaz-Cruz, G., Cheng, Z., & Bignell, D. R. (2019). Virulence mechanisms of plant-pathogenic *Streptomyces* species: an updated review. *Microbiology*.
- Loria, R., Bukhalid, R. A., Creath, R. A., Leiner, R. H., Olivier, M., & Steffens, J. C. (1995). Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species in vitro. *Phytopathology*, 85(5), 537-541.
- Loria, R., Bukhalid, R. A., Fry, B. A., & King, R. R. (1997). Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease*, 81(8), 836-846.
- Loria, R., Kers, J., & Joshi, M. (2006). Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 469-487.
- Loria, R., Bignell, D. R., Moll, S., Hugueta-Tapia, J. C., Joshi, M. V., Johnson, E. G., ... & Gibson, D. M. (2008). Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(1), 3-10.
- Maier, S., Pflüger, T., Loesgen, S., Asmus, K., Brötz, E., Paululat, T., ... & Bechthold, A. (2014). Insights into the bioactivity of mensacarcin and epoxide formation by MsnO8. *ChemBioChem*, 15(5), 749-756.
- Marumo, S., Sasaki, K., & Suzuki, S. (1964). The structure of cervicarcin. *Journal of the American Chemical Society*, 86(20), 4507-4508.
- Natsume, M., Ryu, R., & Abe, H. (1996). Production of phytotoxins, concanamycins A and B by *Streptomyces* spp. causing potato scab. *Japanese Journal of Phytopathology*, 62(4), 411-413.
- Natsume, M., Yamada, A., Tashiro, N., & Abe, H. (1998). Differential production of the phytotoxins thaxtomin A and concanamycins A and B by potato common scab-causing *Streptomyces* spp. *Japanese Journal of Phytopathology*, 64(3), 202-204.
- Natsume, M., Komiya, M., Koyanagi, F., Tashiro, N., Kawaide, H., & Abe, H. (2005). Phytotoxin produced by *Streptomyces* sp. causing potato russet scab in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 71(5), 364-369.
- Natsume, M., Nagagata, A., Aittamaa, M., Okaniwa, N., Somervuo, P., Fiedler, H. P., ... & Valkonen, J. P. (2018). Phytotoxin produced by the netted scab pathogen, *Streptomyces turgidiscabies* strain 65, isolated in Sweden. *Journal of general plant pathology*, 84(2), 108-117.
- Ohkuma, K., Itakura, C., Nagatsu, J., Sumiki, Y., & Suzuki, S. (1962). A new antitumor antibiotic, cervicarcin. *Journal of Antibiotics*, 15(3), 152.
- Pánková, I., Sedláková, V., Sedlák, P., & Krejzar, V. (2012). The occurrence of plant pathogenic *Streptomyces* spp. in potato-growing regions in central Europe. *American journal of potato research*, 89(3), 207-215.
- Plitzko, B., Kaweesa, E. N., & Loesgen, S. (2017). The natural product mensacarcin induces mitochondrial toxicity and apoptosis in melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292(51), 21102-21116.

- Tietze, L. F., Gericke, K. M., & Schuberth, I. (2007). Synthesis of highly functionalized anthraquinones and evaluation of their antitumor activity. *European Journal of Organic Chemistry*, 2007(27), 4563-4577.
- Tietze, L. F., Guentner, C., Gericke, K. M., Schuberth, I., & Bunkoczi, G. (2005). A Diels–Alder reaction for the total synthesis of the novel antibiotic antitumor agent Mensacarcin. *European journal of organic chemistry*, 2005(12), 2459-2467.
- Wanner, L. A. (2004). Field isolates of *Streptomyces* differ in pathogenicity and virulence on radish. *Plant disease*, 88(8), 785-796.
- Wanner, L. A. (2009). A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. *American Journal of Potato Research*, 86(4), 247-264.
- Zhou, B., Zhang, M. S., & Ma, X. K. (2017). First report of *Streptomyces bottropensis* causing potato common scab in Hebei Province, China. *Plant Disease*, 101(3), 502-502.

CAPÍTULO 5

Minería genómica dirigida a *clusters* de metabolitos secundarios asociados a la patogenicidad

Introducción

Las especies del género *Streptomyces* son conocidas por su capacidad de producir metabolitos secundarios biológicamente importantes (Loria *et al.*, 2006). La sarna común de la papa, se caracteriza por la presencia de lesiones necróticas con una textura de corcho en la superficie de los tubérculos de *Solanum tuberosum* y se trata de la enfermedad de plantas de mayor importancia económica causada por *Streptomyces* spp (Loria *et al.*, 1997). La patogenicidad está asociada a la producción de la fitotoxina taxtomina A (Loria *et al.*, 2008). Sin embargo, desde hace algunos años se ha informado sobre cepas de *Streptomyces* patógenas que no producen taxtomina (Cao *et al.*, 2012; Fyans *et al.*, 2016; Natsume *et al.*, 2005, 2018). Esto estaría revelando la existencia de factores de virulencia aún no conocidos. Por otra parte, además de las taxtominas, se han descrito otros metabolitos secundarios que contribuirían a los síntomas de la sarna común como es el caso de las concanamicinas, FD-891, borrelidina, fitotoxinas derivadas de coronafacoil, y fridamicina E (Bignell *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2012; Natsume *et al.*, 1996, 1998, 2005, 2018). Los resultados de este trabajo demuestran que la desmetilmensacarcina (Figura 5.1; Estructura 2) producida por la cepa patógena *S. niveiscabiei* ST1015, no productora de taxtomina, es un metabolito fitotóxico. Este metabolito fue reportado por primera vez por Arnold, 2002 en la cepa Gö C4/4 de *S. bottropensis* aislada de suelo. Si bien no hay muchos estudios sobre la actividad biológica de la desmetilmensacarcina, compuestos muy similares, como la mensacarcina (Figura 5.1; Estructura 3) identificada en la misma cepa, está documentada como un potente agente antitumoral (Arnold, 2002; Maier *et al.*, 2014; Plitzko *et al.*, 2017).

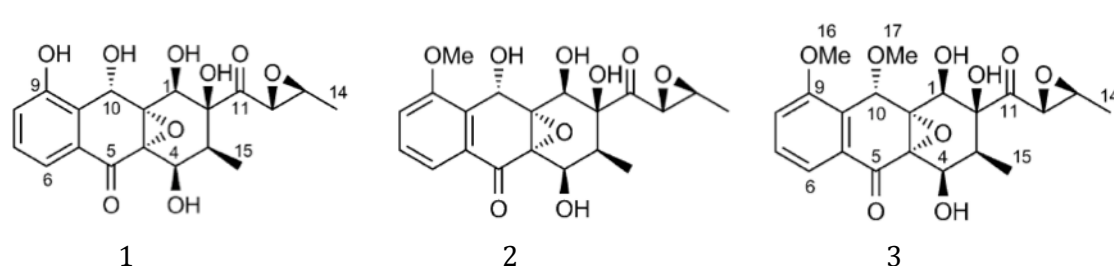


Figura 5.1. Estructura y numeración de didesmetilmensacarcina (**1**), desmetilmensacarcina (**2**) y mensacarcina (**3**). Imagen extraída de Yan *et al.*, 2012 con modificaciones.

La mensacarcina es un policétido producido por un sistema policétido sintasa (PKS) de tipo II, cuyo *cluster* de biosíntesis fue descrito por Yan y colaboradores (Figura 5.2). Los PKS, tienen similitudes estructurales y funcionales con las sintasas de ácidos grasos (FAS) (Yan *et al.*, 2012). En este sistema, se requiere un conjunto mínimo de enzimas utilizadas iterativamente para el ensamblaje del policétido, cada una expresada a partir de un gen distinto. El PKS “mínimo” consiste en una cetosintasa (KS_{α}), una cetosintasa (KS_{β}) o factor de elongación de cadena (CLF)

y una proteína transportadora de grupo acilo (ACP). Otras subunidades, incluyendo cetoreductasas, ciclasas y aromatasas modifican las cadenas de policétidos para formar los anillos aromáticos. Finalmente oxigenasas, metiltransferasas y otras enzimas de adaptación pueden generar compuestos con características químicas únicas (Hertweck, 2009; Maier *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2012). El análisis de secuencia del *cluster* PKS-II para la mensacracina reveló 34 marcos abiertos de lectura (ORF) que comprenden a 23 genes estructurales, dos genes reguladores y nueve genes que codifican proteínas hipotéticas con función desconocida. Parte del *cluster* de la mensacarcina se clonó en el cósmico *cos2* (Figura 5.2), el cual contiene la mayoría de los genes del *cluster* pero carece de genes implicados en la incorporación de grupos metilo en los carbonos C9 y C10, por lo que la expresión heteróloga de *cos2* en *Streptomyces albus* J1074, produjo didesmetilmensacarcina (Figura 5.1; Estructura 1). Además de los genes PKS mínimos (*msnK1*, *msnK2*, *msnK3*), tres genes que codifican ciclasas (*msnC1*, *msnC2*, *msnC3*), tres genes que codifican para ketoreductasas (*msnO1*, *msnO10*, *msnO11*), dos genes que codifican para oxidorreductasas (*msnO3*, *msnO9*), un gen que codifica para una tioesterasa (*msnH7*), y un gen que codifica para deshidrogenasa (*msnH6*), el *cluster* biosintético contiene tres genes de monooxigenasa tipo luciferasa (*msnO2*, *msnO4*, *msnO8*) y tres genes de anthron oxigenasas (*msnO5*, *msnO6*, *msnO7*) (Maier *et al.*, 2015). Para identificar los nuevos factores de virulencia que explicaran la patogenicidad de cepas patógenas de *Streptomyces* que carecían de taxtomina A, se realizó la minería genómica en búsqueda de *clusters* de metabolitos secundarios asociados a la patogenicidad. Se identificó el *cluster* de biosíntesis de la desmetilmensacarcina en la cepa de *S. niveiscabiei* ST1015 y esto se corroboró mediante la construcción de mutantes. Además se extendió la búsqueda de este *cluster* a otras cepas patógenas de la colección.

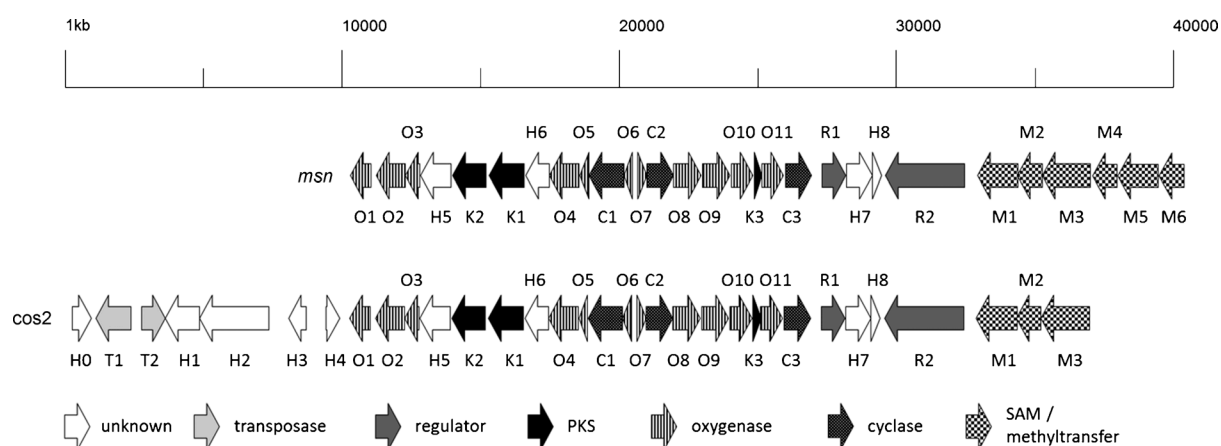


Figura 5.2. Organización genética del *cluster* de genes biosintéticos de mensacarcina y *cos2* (que contiene el *cluster* de genes biosintéticos de didesmetilmensacarcina). Los genes que codifican proteínas hipotéticas se muestran en blanco; dos genes que codifican transposasas están en gris claro; los genes reguladores están en gris oscuro; tres genes que codifican los tres genes PKS mínimos no contiguos están en negro; los genes que codifican oxigenasas están rayados; los genes que codifican para ciclasas contienen puntos; los genes para la regeneración SAM/metilación contienen cuadrados. Imagen extraída de Maier *et al.*, 2015.

Objetivos

1. Búsqueda e identificación de potenciales *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios asociados a la patogenicidad.
2. Identificación del *cluster* de biosíntesis de la desmetilmensacarcina en la cepa de *S. niveiscabiei* ST1015.
3. Búsqueda e identificación del *cluster* de dmsn en otras cepas patógenas causantes de sarna común.

Materiales y Métodos

5.1 Secuenciado mediante Nanopore, ensamblado y anotación del genoma completo de la cepa *S. niveiscabiei* ST1015

El secuenciado y ensamblado del genoma se realizó a partir de 400 ng del ADN genómico de la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 extraído según el protocolo de la Sección 2.2 de materiales y métodos del Capítulo 2 y enviado a la *University of Florida*, Estados Unidos. El secuenciado lo realizó el Dr. José Huguet-Tapia (co-tutor de esta tesis). Se utilizó la secuenciación por Oxford Nanopore para generar lecturas largas. La secuenciación se realizó en un dispositivo Minion y se utilizó el kit de secuenciación rápida SQK-RAD004 por 10 horas. El ensamblado se realizó utilizando el ensamblador Canu (Koren *et al.*, 2017). Las lecturas largas se alinearon para obtener un ensamblaje consenso y el mismo se corrigió utilizando la herramienta Nanopolish (Loman *et al.*, 2015). Se realizó una segunda corrección utilizando las lecturas generadas por el método de Illumina utilizando la herramienta Pilon (Walker *et al.*, 2014).

5.2 Búsqueda e identificación de potenciales *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios asociados a la patogenicidad

Se analizaron las secuencias genómicas en estado de borrador de las cepas secuenciadas ST105, ST1015, ST1020, ST129 y ST1229 así como un genoma representante de cada especie de *Streptomyces* patógena depositado en la base de datos Genbank (*S. niveiscabiei* NRRL B-24457, *S. acidiscabies* 84-104, *S. scabiei* NRRL B-16523, *S. europaeiscabiei* NRRL B-24443, *S. luridiscabiei* NRRL B-24455, *S. puniscabiei* NRRL B-24456, *S. stelliscabiei* NRRL B-24447, *S. turgidiscabies* Car8 y *S. ipomoeae* 91-03) mediante el software antiSMASH bacterial versión 4.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Blin *et al.*, 2017). Los *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios, *biosynthetic gene clusters* (BGCs) presentes en las cepas patógenas secuenciadas de Uruguay y cepas de referencia fueron comparados y analizados.

5.3 Búsqueda, identificación, ensamblado y anotación del presunto *cluster* de biosíntesis para la desmetilmensacarcina en la cepa *S. niveiscabiei* ST1015

Se analizó el genoma de la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 mediante el software antiSMASH bacterial versión 4.0 en una primera instancia a partir del genoma en borrador y luego completo (cerrado). Una vez que se identificó al compuesto fitotóxico como la desmetilmensacarcina (dmsn), se identificaron los *contigs* que poseían genes involucrados en la biosíntesis de un compuesto similar; la mensacarcina (msn). Para la identificación y el ensamblado del presunto *cluster* de la dmsn se realizaron comparaciones de las secuencias genómicas de la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 con la secuencia parcial del *Cluster* de biosíntesis de la mensacarcina clonada en cos2 y depositada en la base de datos Genbank (Número de Acceso: KJ437437) (Yan *et al.*, 2012) utilizando los programas BLAST y el ABACAS el cual mapea los *contigs* con la secuencia de referencia, orienta y ordena. Una vez identificados los *contigs* y el presunto orden de los mismos en el *cluster*, se diseñaron *primers* (protocolo ver Sección 5.10) en los extremos de los *contigs*. Los *primers* se encuentran en la Tabla 5.2. Se realizaron las reacciones de PCR para confirmar el orden de los *contigs* en el presunto *cluster* de la dmsn utilizando la enzima de alta fidelidad *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Thermo scientific, EE.UU). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25µl, cada una conteniendo 1X de Buffer de reacción conteniendo 1.5mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.5µM de cada *primer* (Tabla 5.2), 10% v/v de DMSO, 1.0U de la enzima *Taq* DNA polimerasa y 1µl de ADN genómico (extraído utilizando el protocolo de la Sección 2.2 de materiales y métodos del Capítulo 2). Las condiciones del ciclo de reacción para la amplificación fueron: 94°C/5min, [94°C /30seg, temperatura de *annealing* Tabla 5.2/30seg, 72°C/90seg]/35 ciclos, 72°C/10min, 20°C/10min. Las reacciones de amplificación fueron optimizadas mediante un equipo de PCR con gradiente (Termociclador Gradient Palm-Cycler, Corbett). Las amplificaciones de rutina se realizaron tanto en este termociclador como en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, EE.UU). Los productos obtenidos en las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1% p/v) con GoodView y se fotografiaron bajo luz UV. Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, EE.UU) para estimar el tamaño. Los productos de amplificación fueron secuenciados y analizados según (Sección 3.7 del Capítulo 3) para obtener la secuencia completa de los *gaps*. Finalmente la secuencia ensamblada se anotó mediante el programa RAST. La secuencia proteica de cada CDS predicho se comparó mediante BLASTp con la secuencia correspondiente del *cluster* de biosíntesis para la mensacarcina. Por último la secuencia ensamblada del presunto *cluster* de la dmsn se comparó con la secuencia del genoma completo de la cepa ST1015 mediante el programa BLAST y se visualizaron los resultados en el programa ACT.

5.4 Cepas bacterianas, plásmidos y medios

Todas las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este estudio se listan en la Tabla 5.1. Las cepas de *Escherichia coli* fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook & Rusell, 2001) a 37 °C. Las cepas de *Streptomyces* fueron rutinariamente cultivadas en el medio TSB, Potatoes Mushed Agar (PMA), en el medio *International Streptomyces Project Medium 4* (ISP-4) o en el medio *International Streptomyces Project Medium 2* (ISP-2) (Shirling & Gottlieb, 1966) a 28 °C. La conjugación fue realizada en medio *soy flour mannitol* (SFM) agar (Kieser *et al.*, 2000). Los medios fueron suplementados con antibióticos cuando fue necesario en las siguientes concentraciones: Kanamicina (Kan) (50 µg/ml), Apramicina (Apra)(100 µg/ml), Ácido Nalidíxico (Na) (50 µg/ml), Cloranfenicol (Cml) (25 µg/ml) y Tioestreptona (Thio) (50 µg/ml).

Tabla 5.1. Cepas y plásmidos utilizados en este capítulo.

	Descripción	Referencia
Plásmido		
pCR® -Blunt IITOP0	Vector de clonado inicial de los fragmentos generados por PCR (Kan ^R)	Invitrogen
pAMR4	Vector para crear delecciones dirigidas en <i>Streptomyces</i> (Apra ^R , Kan ^R)	Knirschova <i>et al.</i> , (2015)
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 <i>et al.</i> , (2000)
pAMR4SnUD	Derivado de pAMR4 que contiene un fragmento <i>upstream</i> (FU) al gen <i>dmsnK1</i> de 3.014-pb y un fragmento <i>downstream</i> (FD) al gen <i>dmsnK2</i> de 3.074-bp clonados en los sitios MfeI/BamHI y AvrII/HindIII, respectivamente (Apra ^R , Kan ^R)	Este trabajo
pAU3-45	Derivado pSET152 (un derivado del vector de integración ϕ C31) que contiene el gen <i>tsr</i> insertado en el sitio NheI (Apra ^R , Thio ^R)	Bierman <i>et al.</i> , (1992); Bignell <i>et al.</i> , (2005)
pIJ8641	Plásmido para uso en <i>Streptomyces</i> que contiene el gen <i>egfp</i> bajo el control de un promotor constitutivo <i>ermE</i>	Sun <i>et al.</i> , (1999)
pAU3-45-ermEp	Derivado de pAU3-45 que contiene el fragmento del promotor <i>ermE</i> del plásmido pIJ8641 clonado en el sitio BamHI de pAU3-45 (Apra ^R , Thio ^R)	Este trabajo

pAU3-45-cdmsn	Derivado de pAU3-45-ermEp conteniendo un fragmento del <i>cluster</i> de la dmsn de 6,182-bp (abarca los genes <i>dmsnK1-dmsnO1</i>) clonado en el sitio XbaI de pAU3-45-ermEp (Apra ^R , Thio ^R)	Este trabajo
Cepas de <i>E. coli</i>		
DH5α	Hospedero de clonado general	Gibco-BRL
ET12567	<i>dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻ , <i>hsdM</i> ⁻ ; no metila el ADN a ser transferido a <i>Streptomyces</i> spp. (Cml ^R , Tet ^R)	MacNeil <i>et al.</i> , (1992)
Cepas de <i>Streptomyces</i>		
ST1015	<i>S. niveiscabiei</i> cepa wild type	Lapaz <i>et al.</i> , (2017)
ST1015ΔdmsnK1_K2	Derivado de ST1015 con delección de los genes <i>dmsnK1</i> y <i>dmsnK2</i> los cuales codifican para policétido sintetasas (Apra ^R)	Este trabajo
ST1015ΔdmsnK1_K2-C	Derivado de ST1015ΔdmsnK1_K2 conteniendo el vector integrativo pAU3-45-cdmsn (Apra ^R , Thio ^R)	Este trabajo

5.5 Manipulación del ADN

La extracción de ADN genómico de *Streptomyces* se realizó según el protocolo del laboratorio de la Dra. Francis (se detalla a continuación Sección 5.6). Las minipreparaciones de plásmidos se realizaron utilizando el kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich, EE.UU). La purificación de fragmentos de ADN generados por amplificación o digestión se realizó mediante el kit E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega, EE.UU). Las enzimas de restricción y la fosfatasa alcalina intestinal de becerro (CIP) fueron adquiridas en New England Biolabs (EE.UU), la T4 ADN ligasa fue adquirida en Fisher BioReagents (Lituania), todas las enzimas fueron utilizadas según las recomendaciones del fabricante. En las amplificaciones de rutina se utilizó Taq RED DNA Polymerase Master Mix Kit (Apex BioResearch Products, EE.UU). Las amplificaciones de los fragmentos a ser clonados se realizaron con la enzima de alta fidelidad *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Agilent Technologies, EE.UU). Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0% en buffer TAE 1x excepto cuando se especificó otra condición. Se empleó un volumen conocido de marcador de ADN de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Gold Biotechnology, EE.UU) en las electroforesis para estimar el tamaño del ADN en estudio. Para medir la concentración del ADN se utilizó NanoDrop (NanoDrop One, Thermo Scientific, EE.UU). La transformación en *E. coli* y la conjugación con *Streptomyces* se detallan a continuación en las Secciones 5.8 y 5.9, respectivamente.

5.6 Extracción de ADN genómico de *Streptomyces* spp. según protocolo Laboratorio Dra. Francis

Las cepas se cultivaron en 5 ml de TSB durante 2-3 días a 28°C. 2 ml del cultivo se centrifugaron a 10.000 *g* y el *pellet* resultante se lavó 2 veces con agua destilada y se resuspendió en 150 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA). Se agregaron 20 µl de lisozima en una concentración de 100 mg/ml y se incubó a 37°C por 2 horas. Luego se agregaron 150 µl de proteinasa K (2.5 mg/ml) en 150 µl de buffer de lisis (200 mM NaOH, 1% de SDS), se mezcló y se incubó a 65-70°C por 15 minutos, agitando cada 5 minutos. Se enfrió la mezcla a 37°C durante 5 minutos y en hielo durante 5 minutos más. Se agregaron 175 µl del buffer de neutralización y precipitación de proteínas (4.2 M GuHCL, 0.9 M K-ac., pH 4.8), se mezcló y se dejó 5 minutos en hielo. Luego se centrifugó la mezcla a 4°C, 10.000 *g* durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante, se colocó en un tubo eppendorf y se descartó el *pellet*. Al sobrenadante se le agregó 1 µl de ARNasa de 10 mg/ml y se incubó a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se agregaron a la mezcla 500 µl de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó a 10.000 *g* a 4°C por 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo y se le agregaron 500 µl de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 10.000 *g* a 4°C durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se incubó en hielo por 5 minutos. Se precipitó el ADN agregando 500 µl de isopropanol frío y se mantuvo a -20°C durante toda la noche. Luego se centrifugó a 10.000 *g* a 4°C durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El ADN se lavó con 100 µl de etanol 70%, se secó y resuspendió en 70 µL de agua calidad MQ. La cantidad y calidad de las preparaciones de ADN se midieron utilizando el equipo NanoDrop, (NanoDrop One, Thermo Scientific, EE.UU) y se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) agregando previamente a la muestra el intercalante GelRed® (Biotium, EE.UU) y se fotografiaron bajo luz UV. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C.

5.7 Preparación de células competentes de *E. coli* (DH5α o ET12567)

Las células competentes se prepararon según protocolo del Laboratorio de la Dra. Francis. Se inoculó una colonia de *E.coli* en 5 ml de LB y se incubó a 37°C a 200rpm durante la noche. Luego se inocularon 50 ml de LB con 0.5 ml del precultivo anterior a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀=0.2. Se agregó MgCl₂ a una concentración final de 20mM y se incubó el cultivo a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀=0.45-0.55. Se transfirieron los 50 ml de cultivo a un tubo falcon y se colocaron en baño de hielo. Luego se centrifugó a 3000 *g* a 4°C durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* conteniendo las células en 40-50 ml de una solución 1x que contiene Ca²⁺Mn²⁺ (80 mM NaOAC anhidro, 200mM CaCl₂.2H₂O, 140mM MnCl₂.4H₂O, pH 5.5) previamente enfriada y se incubó la suspensión durante 45 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 2600 *g* por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Por último se resuspendieron

las células en 5 ml de la solución 1x de $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$ conteniendo 15% de glicerol. Rápidamente se fraccionó la suspensión de células en alícuotas de 50 μl en tubos eppendorf y se guardaron a -70°C .

5.8 Transformación por *Heat shock*

La transformación en células de *E. coli* se realizó mediante *heat shock* según el protocolo del laboratorio de la Dra. Francis. Se retiraron las células de *E. coli* competentes (alícuotas de 50 μl) del freezer a -70°C y se colocaron en un baño de hielo por 5 minutos. Luego se agregó a las células el vector en uso (se agregaron entre 5-15 μl dependiendo de su concentración). Se dejó reposar por 15 minutos en hielo y luego se realizó el choque térmico por 30 segundos a 42°C . Inmediatamente se depositaron en hielo por 2 minutos. Por último se agregó al tubo eppendorf con las células, 1 ml de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37°C . Posteriormente la suspensión de células se centrifugó a 5.000 g y se extrajeron 900 μl del sobrenadante, las células se resuspendieron en el volumen restante y se sembraron en placas conteniendo medio LB agar con el antibiótico correspondiente. Se incubó a 37°C por 24hs.

5.9 Conjugación entre *E.coli* ET12567(pUZ8002) y *Streptomyces* sp.

Para el proceso de conjugación interespecífica entre las células *E. coli* ET12567(pUZ8002) y *S. niveiscabiei* ST1015 se utilizó el protocolo de Gust *et al.*, 2003 con modificaciones. Se inoculó una colonia de *E. coli* ET12567(pUZ8002) previamente transformada con el plásmido a transferir en 5 ml de LB conteniendo cloranfenicol (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ya que la cepa de *E. coli* tiene resistencia al mismo en su genoma, kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para mantener el plásmido pUZ8002 y los antibióticos correspondientes para conservar el plásmido a ser transferido. Se incubó durante toda la noche con agitación a 200 rpm a 37°C . Luego se inocularon 500 μl del precultivo en 50 ml de LB conteniendo los antibióticos mencionados anteriormente y se incubó durante ~ 4 hs a 37°C con agitación a 200 rpm hasta obtener una DO_{600} de 0.4. Posteriormente los 50 ml de cultivo fueron centrifugados a 4.000 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* de células se lavó 2 veces con LB para remover los antibióticos que podrían inhibir a *Streptomyces* y se resuspendió en 500 μl de LB. Por otro lado se realizó la suspensión de esporas de *Streptomyces* a partir de una placa cubierta de esporas sembrada con la cepa previamente en medio ISP4 o PMA como se indica en el ítem 4.5 del Capítulo 4. A la placa cubierta de esporas se agregó 3 ml de LB y se generó la suspensión de esporas con ayuda del ansa. Se tomaron ~2 ml de la suspensión y se centrifugó a 5.000 g durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el *pellet* de esporas se resuspendió en 500 μl de LB. Luego se mezclaron los 500 μl de la suspensión de esporas de *Streptomyces* con los 500 μl de la suspensión de células de *E. coli*.

Posteriormente se centrifugó la mezcla a 4.000 *g* durante 5 minutos y se retiraron 800 μ l del sobrenadante. El *pellet* de células se resuspendió en los 200 μ l restantes y se sembraron en una placa que contiene 30 ml del medio SFM agar, se incubó a 30°C durante 24hs. Luego se cubrió la placa crecida con 1 ml de agua que contiene 1.5 mg de ácido nalidíxico (30 μ l de 50 mg/ml stock; actúa selectivamente sobre *E. coli*) y 2.5 mg del antibiótico necesario para seleccionar los *Streptomyces* que adquirieron el vector a transferir. Se incubó la placa a 30°C hasta la aparición de colonias de *Streptomyces*.

5.10 Diseño de *primers*

Todos los *primers* usados en este capítulo fueron diseñados mediante el software libre Primer3PLUS (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (Untergasser *et al.*, 2007). Se verificó la ausencia de horquillas y de estructuras secundarias con el software comercial Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen, EE.UU). También se constató que los pares no formaran homodímeros ni heterodímeros *in silico* a la temperatura de *annealing* de trabajo. La síntesis de oligonucleótidos se llevó a cabo en Macrogen (Corea) o en Eurofins Genomics (EE.UU). A continuación la Tabla 5.2 contiene los *primers* utilizados en este capítulo.

Tabla 5.2. *Primers* utilizados en este Capítulo.

Primer	Secuencia (5' → 3')*	Ta °C**	Aplicación
Primers utilizados para el ensamblado del cluster de dmsn en la cepa ST1015			
DM12_3F	CGTCCTTGAGGGCGTTCT	54	Ensamblado del presunto cluster de la dmsn. Unión contigs 431-414
DM12_4R	TGGTCGTCTCCGAACAGG		
DM23_1R	GTGTACGAGGACCGTGTCG	54	Ensamblado del presunto cluster de la dmsn. Unión contigs 414-601
DM23_2F	TACAGCCCGCTGAAGGTC		
DM34_1F	GAACCCCATGCCCTTAC	56	Ensamblado del presunto cluster de la dmsn. Unión contigs 601-552
DM34_4R	CACCAGCTCGTCCCGTTC		
DM45_3F	CTTGCTGCTCATCCACTCCT	54	Ensamblado del presunto cluster de la dmsn. Unión contigs 552-594
DM45_3R	GGATCGGGAAAAGGTCTGAT		
DM56_1F	CTTCACCTGGGGTGTTGC	54	Ensamblado del presunto cluster de la dmsn. Unión contigs 594-356
DM56_2R	GAATCGACCCGCCAGCTC		
Primers utilizados para la generación de los mutantes			
MIL01	AAACAATTGCCTGAACGCAGAGGAGT TG	57	Amplificación de la región upstream al gen dmsnK1 para ser clonado en pAMR4 (MfeI/BamHI)
MIL02	AAAGGATCCCGGTGTGCAAGAGAGGT CAG		
MIL03	AAACCTAGGGCCCCCTACCAGCTCGAC	62	Amplificación de la región downstream al

MIL04	AAAAAGCTTCGAAGGTCAACTCCCAC CC		dmsnK2 para ser clonado en pAMR4 (AvrII/HindIII)
imf33	CTGCAGGGATCCTGATATCGGATCTGG GGAAT	55	Amplificación del promotor ermE para clonarlo en el vector pAU3-45
imf158	CCCCATATGGGCCATATGTCCGCCTCC TT		
MIL20	ATTTCTAGAGCTGACCTCTCTTCGACA CC	56	Amplificación del fragmento complementario (dsmK1-dsm01) para ser clonado en pAU3-45-ermEp
MIL21	AAATCTAGAGTGAGGGTGAAACATGA CGA		
Primers utilizados para la verificación de las construcciones y mutantes			
MIL07	CCCCAGCTCTACCTGAGCAC	57	Primers para la verificación de las construcciones pAMR4_SnUD, pAU3-45- cdmsn y los mutantes
MIL08	GAAGGTCCACGGCACTCC		
MIL14	GTTTTTCCCGCTTGTTGATG	55	ST1015ΔdmsnK1_K2 y mutante complementario ST1015ΔdmsnK1_K2-C
MIL15	CTTCACCCACCCGTCAA		
ApraF	TCGATGGGCAGGTACTTCTC	55	Amplificación del gen de resistencia a apramicina aac3(IV)
ApraR	ACCGACTGGACCTTCCTTCT		
dmsnK1F	GTCCTTCTGGCAGCTCATCT	55	Amplificación de gen dmsnK1
dmsnK1R	CGATCATCGACTTGATGGAG		
pSETfor w	GAGCGGATAACAATTTACACAGGA	55	Confirmación mutantes complementarios. Primers flanqueantes al sitio se clonado del vector pAUR3-45.
pSETrev	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC		
M13F	GTAAAACGACGGCCAG		Primers flanqueantes al sitio de clonado del vector pTopo, utilizados para secuenciación.
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC		

* Las extensiones no homólogas están indicadas en *itálica*, mientras que los sitios de restricción están subrayados.

** Ta: Temperatura de *annealing*

5.11 Secuenciado y Análisis de secuencias

Para el análisis de las secuencias se procedió según indica el ítem 3.7 del Capítulo 3. Para el estudio de los sitios de restricción y el análisis de los plásmidos secuenciados se utilizaron los siguientes programas: RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org/>), MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011), Geneious Pro 4.8.5 (Biomatters, Auckland, New Zealand), NCBI BLAST Database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.12 Construcción del mutante de *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2

Los mutantes fueron contruidos en el laboratorio de la Dra. Isolde Francis en la *California State University Bakersfield* (Estados Unidos), durante una pasantía. Se generó un mutante *knockout* dirigido a los genes *dmsnK1* y *dmsnK2* que codifican para policétido sintetasas, enzimas esenciales para la síntesis del compuesto. El mutante de *S. niveiscabiei* ST1015 fue generado mediante doble recombinación homóloga con el plásmido pAMR4 que posee un gen de resistencia a apramicina *aac3(IV)*. Este gen se sustituyó por la secuencia total del gen *dmsnk1* y secuencia parcial del gen *dmsnK2* en la cepa ST1015. Se diseñaron *primers* dirigidos a la secuencia del presunto *cluster* de la desmetilmensacarcina identificado en el genoma de la cepa ST1015 de forma de amplificar un fragmento (FU) de 3.014pb localizado *upstream* del gen *dmsnK1* (*primers* MIL01/MIL02) y un fragmento (FD) de 3.074pb localizado finalizando y *downstream* del gen *dmsnK2* (*primers* MIL03/MIL04). Se incorporaron sitios de restricción a cada *primer* previendo los siguientes pasos del clonado (Figura 5.3). Las reacciones de PCR fueron realizadas en 50µl conteniendo 1x buffer de reacción Hercules II (con MgCl₂), 1.25U de Hercules II fusion ADN polimerasa (Agilent Technologies), dNTPS (0.2mM), cada primer (0.4mM) y 50ng de ADN genómico de la cepa ST1015. Las condiciones del ciclo de amplificación fueron 98 °C por 4 min; 30 ciclos de 98 °C por 20s, 57 °C (FU) y 62 °C (FD) por 20s, 72 °C por 1min y 30s; un paso final 72 °C por 3min.

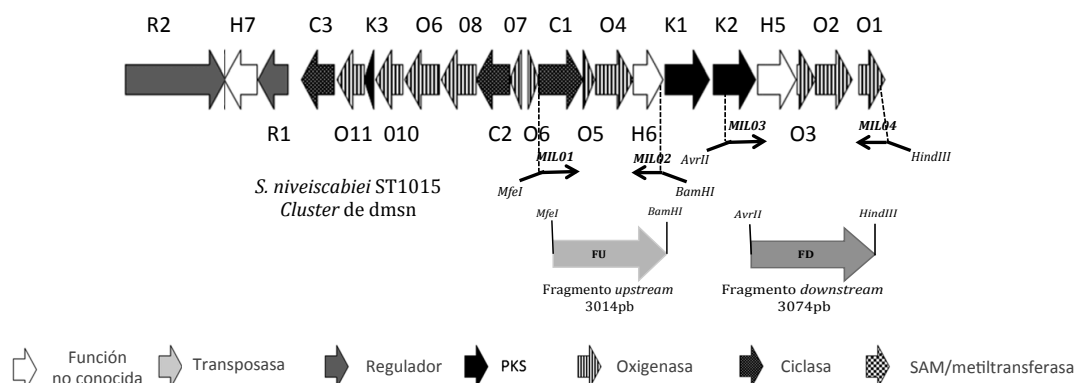


Figura 5.3. Presunto *cluster* de dmsn en el genoma de *S. niveiscabiei* ST1015. Con flechas se muestran los *primers* utilizados para amplificar el fragmento FU y el fragmento FD. Modificado de Maier *et al.*, (2015).

Los fragmentos amplificados resultantes se clonaron en el vector pCR-Blunt II-TOPO generando los plásmidos pTopoFU (fragmento *upstream*) y pTopoFD (fragmento *downstream*). La construcción del vector pTopoFU fue confirmada mediante digestión con la enzima EcoRI y la construcción pTopoFD se confirmó mediante digestión con BamHI. La secuencia de cada inserto fue confirmada mediante secuenciación. Para el fragmento FU se utilizaron los primers del vector M13F /M13R y primers internos MIL07/MIL08/MIL15. El fragmento FD se secuenció utilizando primers del vector M13F /M13R y el primer interno MIL13/MIL14. El inserto de pTopoFU se escindió por doble digestión con MfeI y BamHI y se clonó en el vector pAMR4 el cual se digirió previamente con las mismas enzimas generándose el vector pAMR4_FU (Figura 5.4). La construcción se confirmó por PCR con *primers* dirigidos al fragmento U (MIL07/MIL08) y por secuenciación utilizando los *primers* MIL01/MIL02.

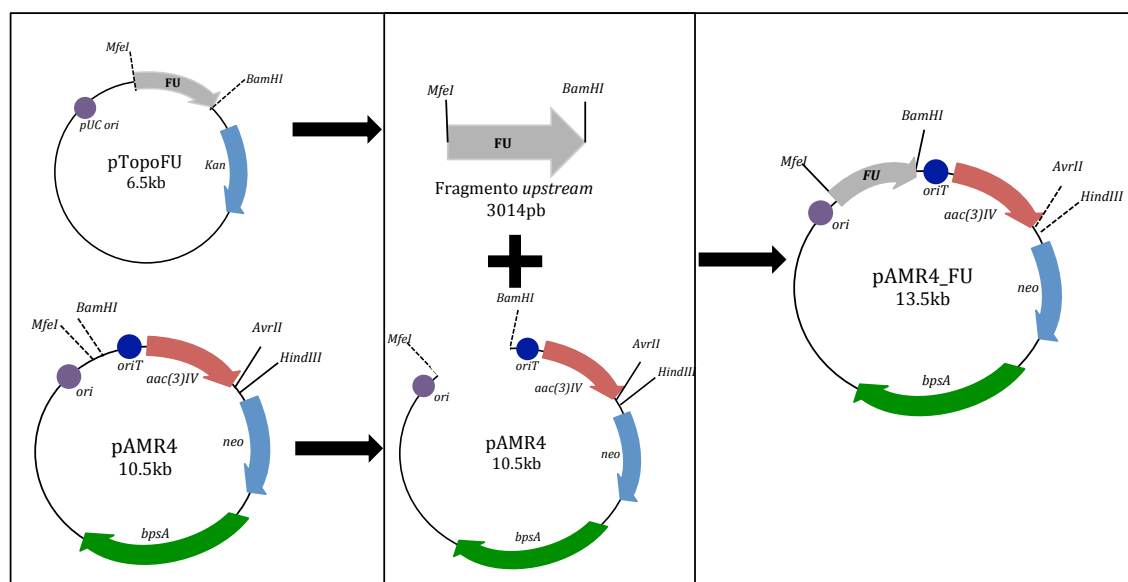


Figura 5.4. Esquema de la estrategia de construcción del vector pAMR4_FU. En los mapas de los vectores se indican los elementos indispensables de los mismos. *Ori* (Origen de replicación), *kan* (gen de resistencia a kanamicina), FU (Fragmento *upstream*), *OriT* (Origen de Transferencia), *aac(3)IV* (gen de resistencia a apramicina), *neo* (gen de resistencia a kanamicina), *bpsA* (gen *bpsA* bajo promotor de *Streptomyces* ermEp, se produce pigmento indigoidina cuando el vector se incorpora al genoma de *Streptomyces*).

El inserto de pTopoFD se escindió por doble digestión con AvrII y HindIII y se insertó en el vector pAMR4_FU el cual había sido digerido previamente con las mismas enzimas, generándose el vector pAMR4SnUD (Figura 5.5). La construcción pAMR4SnUD se confirmó mediante la doble digestión con las enzimas AvrII y HindIII y por secuenciación utilizando el *primer* MIL04.

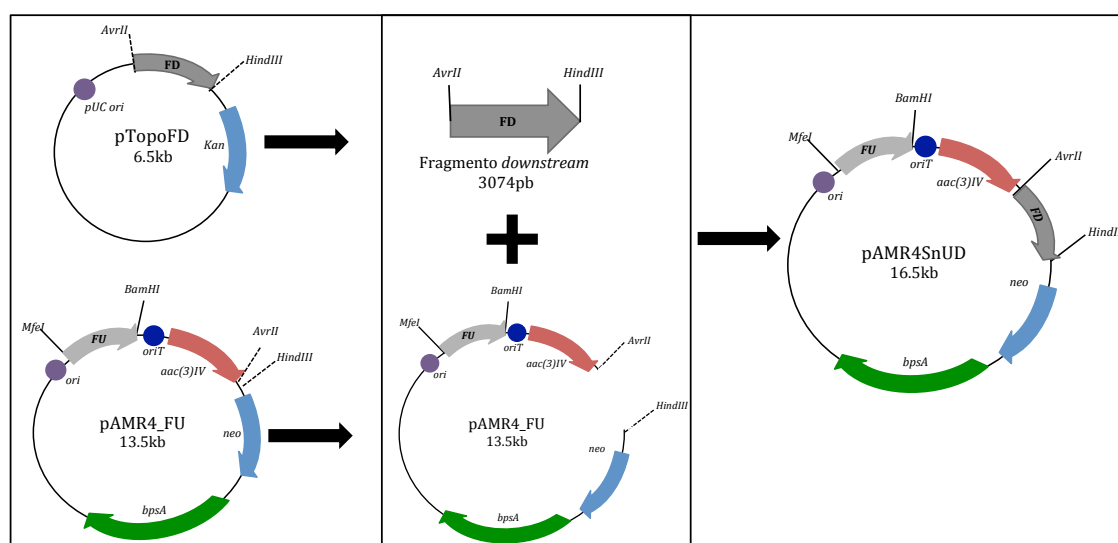


Figura 5.5. Esquema de la estrategia de construcción del vector pAMR4SnUD. En los mapas de los vectores se indican los elementos indispensables de los mismos. *Ori* (Origen de replicación), *kan* (gen de resistencia a kanamicina), *FU* (Fragmento *upstream*), *FD* (Fragmento *downstream*), *OriT* (Origen de Transferencia), *aac(3)IV* (gen de resistencia a apramicina), *neo* (gen de resistencia a kanamicina), *bpsA* (gen *bpsA* bajo promotor de *Streptomyces* ermEp, se produce pigmento indigoidina cuando el vector se incorpora al genoma de *Streptomyces*).

Las manipulaciones previas se realizaron utilizando la cepa de *E. coli* DH5 α . Luego se realizó la transformación de *E. coli* ET12567(pUZ8002) con el plásmido pAMR4SnUD y se confirmó la transformación mediante amplificación por PCR utilizando los *primers* MIL07/MIL08. La cepa de *E. coli* ET12567(pUZ8002) posee un plásmido de conjugación que permite que se transfiera material genético hacia *Streptomyces*. Luego de la conjugación de *S. niveiscabiei* ST1015 y *E. coli* ET12567(pUZ8002) con el plásmido pAMR4SnUD se seleccionaron los exconjugantes de *Streptomyces* que realizaron doble recombinación homóloga. El vector pAMR4SnUD posee el gen *bpsA* que se expresa cuando se integra el vector en el genoma de *Streptomyces* mediante recombinación simple. Dicho gen codifica para una enzima holo-BpsA la cual participa en la biosíntesis del pigmento indigoidina a partir de dos Glutaminas. Por lo tanto las colonias de los exconjugantes que integraron el vector mediante recombinación simple poseen un halo de color azul correspondiente a dicho pigmento, son resistentes a apramicina y kanamicina. Las colonias de los exconjugantes seleccionados son aquellas que tuvieron doble recombinación homóloga (colonias sin pigmento), resistentes a apramicina y sensibles a kanamicina (Figura 5.6). Estos exconjugantes se confirmaron inoculándolos en medio ISP2 con apramicina y en ISP2 con kanamicina. Estos a su vez fueron confirmados mediante PCR con varios pares de *primers*.

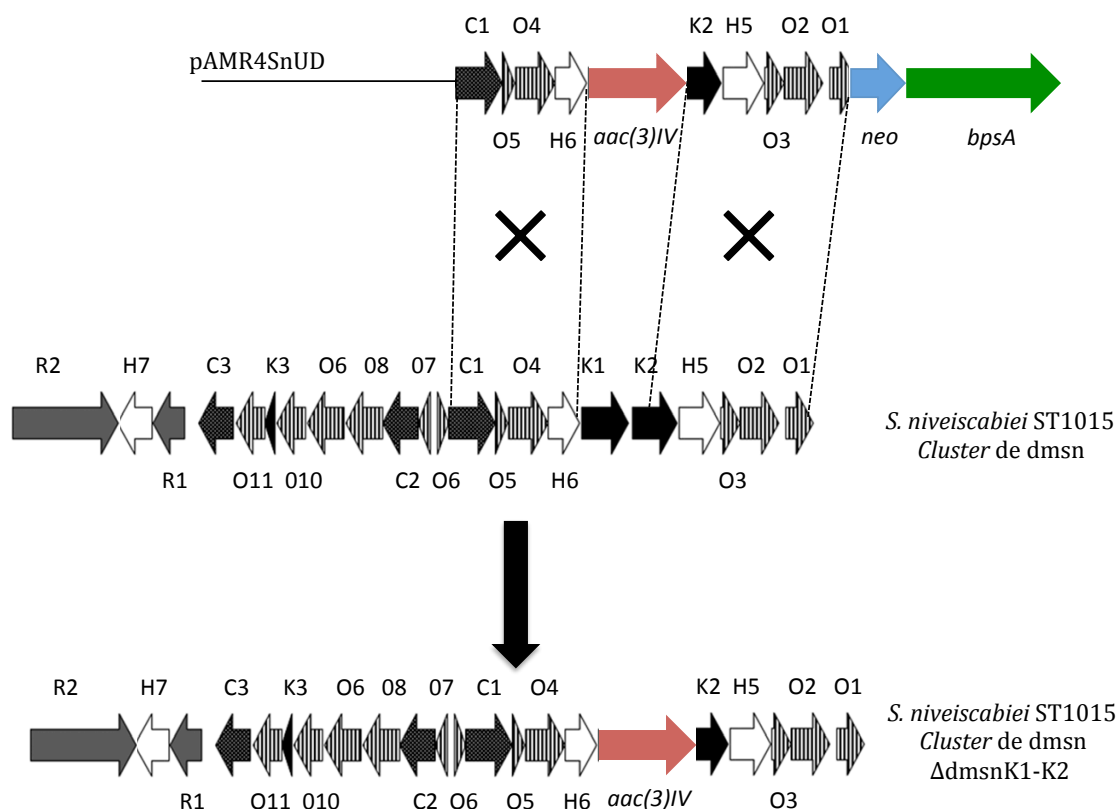


Figura 5.6. Esquema de la estrategia de generación de los mutantes *knockout* *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsnK1-K2* mediante recombinación homóloga del vector pAMR4SnUD con el genoma de *S. niveiscabiei* ST1015. Modificado de Maier *et al.*, (2015).

5.13 Complementación genética del mutante *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsnK1-K2*

Para construir el mutante complementario ST1015 Δ *dmsnK1-K2*-C el cual debe ser capaz de producir nuevamente el compuesto desmetilmensacarcina se insertan en el genoma del mutante *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsnK1-K2*, mediante un vector de expresión integrativo, los genes que fueron mutados (*deleted*). Debido a que los genes mutados se encuentran bajo el mismo promotor que otros genes participantes en la biosíntesis de la molécula, se insertan los genes del *cluster* desde *dmsnK1* hasta *dmsnO1*. En una primera etapa se generó el vector de expresión integrativo pAU3-45-*ermEp*, a partir del clonado del promotor constitutivo *ermEp* en el vector integrativo pAU3-45 mediante el corte con la enzima de restricción *Bam*HI. Por lo que se amplificó el promotor constitutivo *ermE* del plásmido pIJ8641 con los *primers* *imf33/imf158* y el fragmento resultante se clonó en el vector pCR-Blunt II-TOPO creando pTopo-*ermE* (Figura 5.7). La construcción se verificó mediante PCR utilizando los *primers* *imf33/imf158*. Se seleccionó un clon transformante y el inserto fue confirmado por secuenciación con el *primer* del vector M13F.

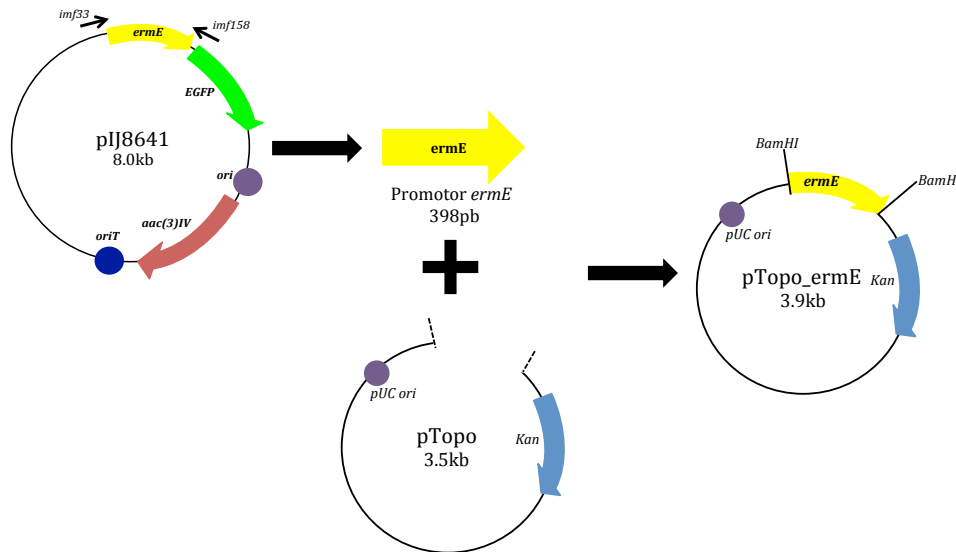


Figura 5.7. Esquema de la estrategia de construcción del vector pTopo_ermE. En los mapas de los vectores se indican los elementos indispensables de los mismos. *Ori* (Origen de replicación), *kan* (gen de resistencia a kanamicina), *OriT* (Origen de Transferencia), *aac(3)IV* (gen de resistencia a apramicina), *ermE* (promotor fuerte *ermE*), *EGFP* (gen que codifica para la proteína verde fluorescente).

Luego se escindió el promotor con la enzima *Bam*HI y se clonó en el vector pAU3-45 el cual fue previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado con la enzima fosfatasa alcalina (CIP) creándose pAU3-45-ermEp (Figura 5.8). Se verificó la correcta dirección del promotor con los primer (imf33/pSETrev) y se confirmó mediante secuenciación con el *primer* pSETrev. El vector pAU3-45 es un vector integrativo, el cual posee la capacidad de insertarse en el genoma.

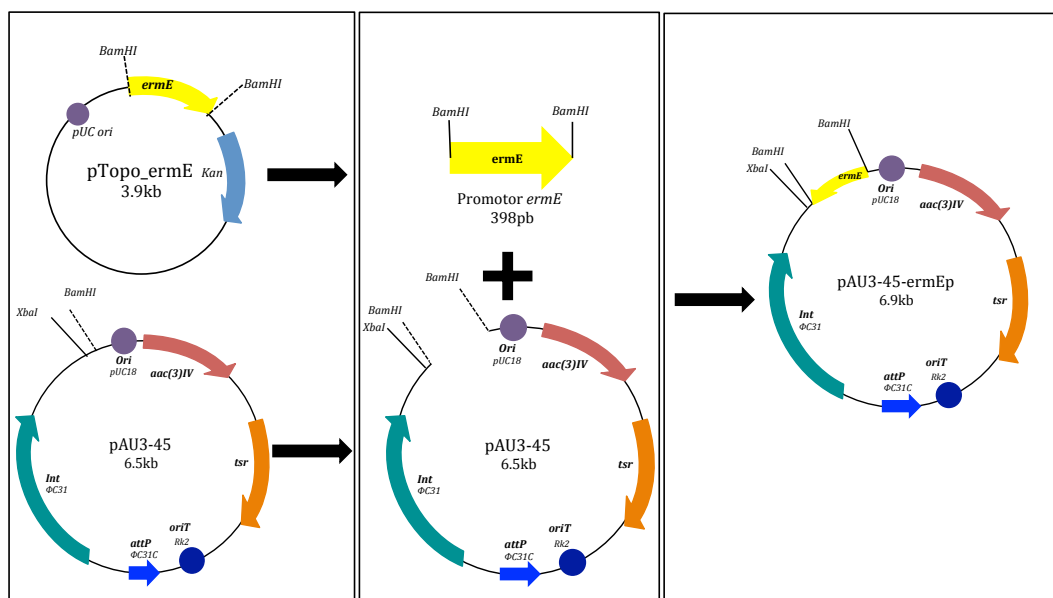


Figura 5.8. Esquema de la estrategia de construcción del vector pTopo_ermE. En los mapas de los vectores se indican los elementos indispensables de los mismos. *Ori* (Origen de replicación), *kan* (gen de resistencia a kanamicina), *OriT* (Origen de Transferencia), *aac(3)IV* (gen de resistencia a apramicina), *ermE* (promotor fuerte *ermE*), *tsr* (gen de resistencia a tiostreptona) *int* y *attP* (gen que codifica para una integrasa y el sitio de integración del fago Φ C31).

Un fragmento de 6.182pb que cubre desde el gen *dmsnK1* hasta el gen *dmsnO1* en el presunto *cluster* de la desmetilmensacarcina fue amplificado por PCR utilizando los *primers* MIL20/MIL21 a los cuales se les incorporó el sitio de restricción para la enzima *XbaI*. Dicho fragmento se clonó en el vector pCR-Blunt II-TOPO creando pTopo_cdmsn (Figura 5.9). Se verificó el inserto realizando una digestión con *XbaI*. El inserto fue confirmado por secuenciación con los *primers* del vector M13F y M13R.

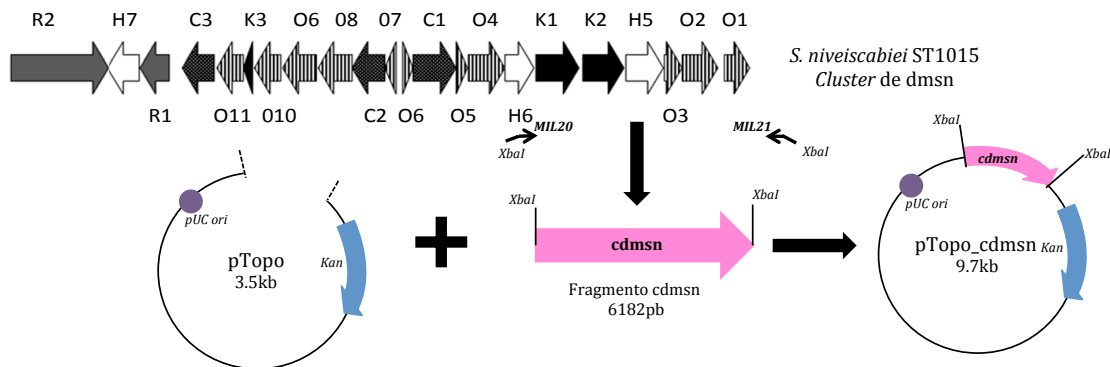


Figura 5.9. Esquema de la estrategia de construcción del vector pTopo_cdmsn. Amplificación del fragmento *cdmsn* utilizando como molde el genoma de *S. niveiscabiei* ST1015 y los *primers* MIL20/MIL21. En los mapas de los vectores se indican los elementos indispensables de los mismos. *Ori* (Origen de replicación), *kan* (gen de resistencia a kanamicina), *cdmsn* (fragmento complementario *cdmsn*). Modificado de Maier *et al.*, (2015).

Luego se digirió el plásmido pAU3-45-ermEp y el pTopo_cdmsn con *XbaI*. Se clonó el fragmento *cdmsn* en pAU3-45-ermEp previamente desfosforilado, generándose el vector pAU3-45-*cdmsn* (Figura 5.10). Se verificó la correcta dirección del fragmento mediante PCR utilizando los *primers* pSETrev/MIL13 y posterior secuenciado con los *primers* pSETrev/pSETforw. Las manipulaciones previas se realizaron utilizando la cepa de *E. coli* DH5 α .

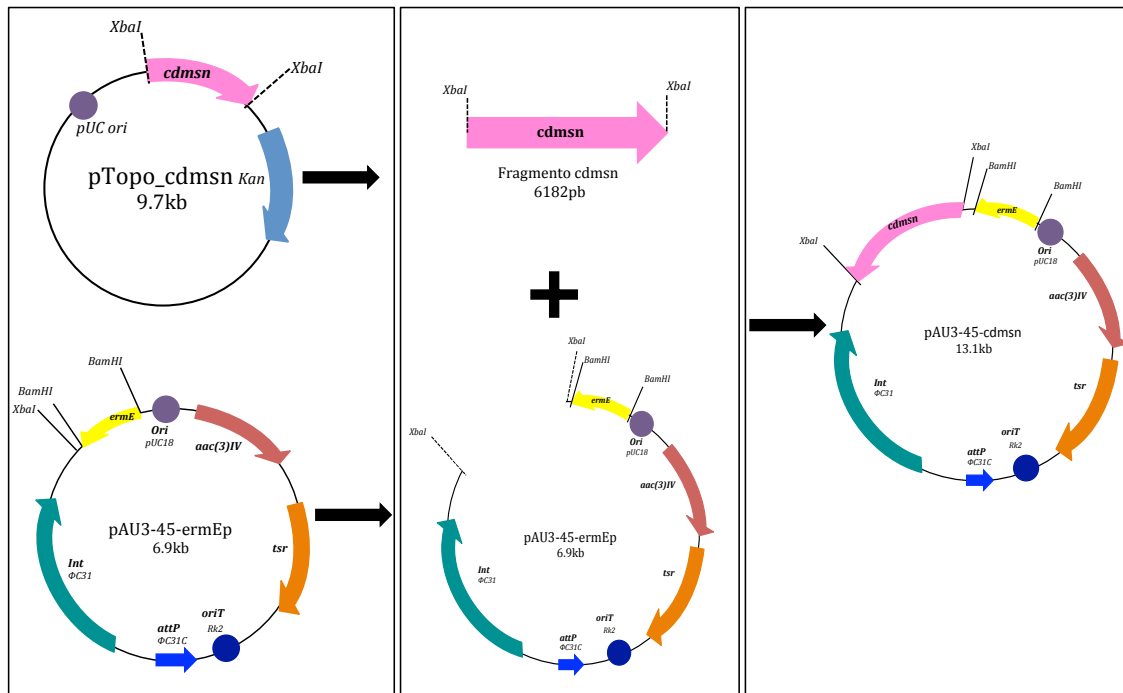


Figura 5.10. Esquema de la estrategia de construcción del vector pTopo_ermE. En los mapas de los vectores se indican los elementos indispensables de los mismos. *Ori* (Origen de replicación), *kan* (gen de resistencia a kanamicina), *OriT* (Origen de Transferencia), *aac(3)IV* (gen de resistencia a apramicina), *ermE* (promotor fuerte *ermE*), *tsr* (gen de resistencia a tiorstreptona) *int* y *attP* (gen que codifica para una integrasa y el sitio de integración del fago $\Phi C31$), *cdmsn* (fragmento complementario *cdmsn*).

Luego se realizaron las transformaciones de *E.coli* ET12567(pUZ8002) con el plásmido pAU3-45-cdmsn y con el plásmido pAU3-45. Los clones transformantes se verificaron mediante PCR con los *primers* pSETrev/MIL13. Posteriormente se realizaron las conjugaciones de *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta dmsnK1-K2$ y *E.coli* ET12567(pUZ8002) con los plásmidos pAU3-45-cdmsn y pAU3-45 seleccionándose los exconjugantes de *Streptomyces* que incorporaron los vectores pAU3-45-cdmsn y pAU3-45 en su genoma y que poseen la capacidad de crecer en apramicina y tiorstreptona (Figura 5.11). Se verificaron los exconjugantes mediante PCRs utilizando *primers* dirigidos al gen *dmsnK1* (*dmsnK1F/dmsnK1R*) y *primers* del vector (pSETforw/pSETrev).

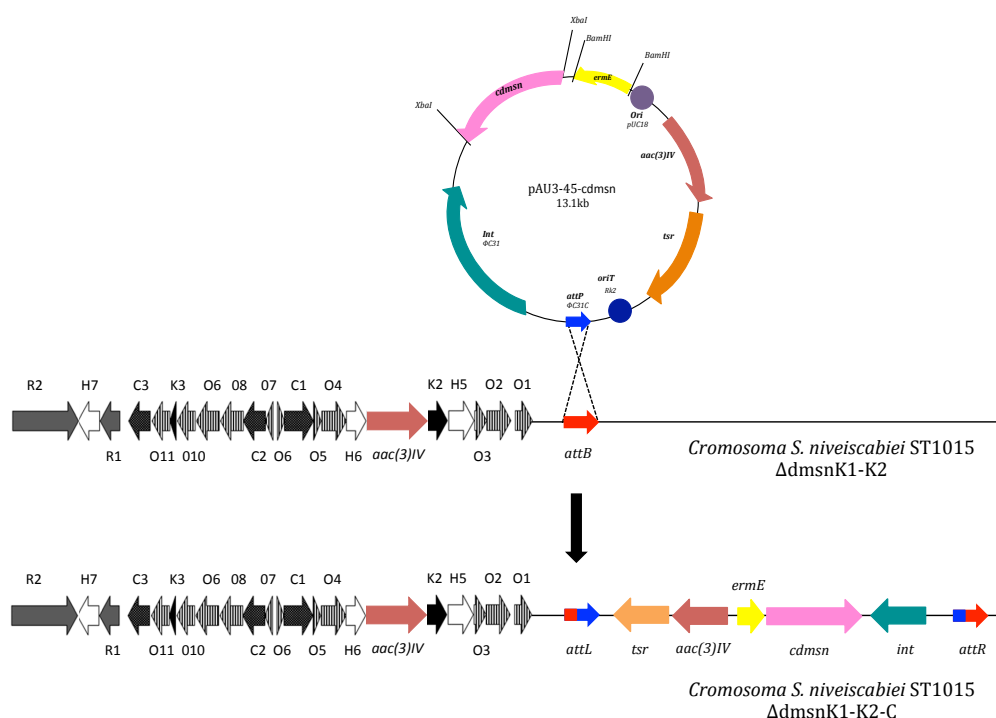


Figura 5.11. Esquema de construcción del mutante complementario ST1015 Δ dmsnK1_K2-C mediante integración de pAU3-45-cdmsn en el cromosoma del mutante *knockout* ST1015 Δ dmsnK1_K2. Integración en la región *attB* generando los sitios de integración derecho e izquierdo *attL* y *attR*, respectivamente. Modificado de Maier *et al.* (2015).

5.14 Evaluación de la patogenicidad y fitotoxicidad de los sobrenadantes en planta

Se realizaron ensayos de patogenicidad en rabanito de la cepa de *S. niveiscabiei* ST1015 *wild type*, mutantes ST1015 Δ dmsnK1_K2 y mutantes complementarios ST1015 Δ dmsnK1_K2-C generados. También se evaluó la fitotoxicidad en rabanito de sus sobrenadantes en medio de cultivo OBB. El procedimiento se realizó de la misma forma que en el ítem 4.3 del Capítulo 4.

5.15 Evaluación de los sobrenadantes para presencia de la desmetilmensacarcina mediante análisis de los perfiles metabólicos por RMN

Se realizó la evaluación de los sobrenadantes en medio OBB de la cepas de *S. niveiscabiei* ST1015 *wild type*, mutantes ST1015 Δ dmsnK1_K2 y mutantes complementarios ST1015 Δ dmsnK1_K2-C generados. El procedimiento se realizó de la misma forma que en el ítem 4.6 del Capítulo 4.

5.16 Búsqueda, identificación, y anotación del presunto *cluster* de biosíntesis para la desmetilmensacarcina en cepas de *S. niveiscabiei* y *S. acidiscabies*

Se analizó el genoma de la cepa de *S. niveiscabiei* ST1020 y *S. acidiscabies* ST105 y los genomas de la base de datos pertenecientes a las cepas *S. niveiscabiei* NRRL B-24457 y 9 cepas de *S. acidiscabies* (84-104, 85-06, 98-48, 98-49, a2, a10, FL01 y NCPPB 4445) mediante el software

antiSMASH bacterial versión 4.0. Se enfocó el estudio en la búsqueda del *cluster* de mensacarcina en dichos genomas. Para las cepas aisladas en Uruguay ST105 y ST1020 se realizó un análisis exhaustivo para la identificación de los *contigs* que poseían genes involucrados en la biosíntesis de la msn. Para la identificación del presunto *cluster* de la dmsn se realizaron comparaciones de las secuencias genómicas de las cepa *S. niveiscabiei* ST1020 y *S. acidiscabies* ST105 con la secuencia parcial del *Cluster* de biosíntesis de la mensacarcina depositada en la base de datos Genbank (Número de Acceso: KJ437437) utilizando los programas BLAST y el ABACAS el cual mapea los *contigs* con la secuencia de referencia, orienta y ordena. Una vez identificados los *contigs* y el presunto orden de los mismos en el *cluster*, se construyeron las pseudomoléculas del presunto *cluster* de msn de ambas cepas y dichas secuencias fueron anotadas mediante el programa RAST. La secuencia proteica de cada CDS predicho se comparó mediante BLASTp con la secuencia correspondiente del *cluster* de biosíntesis para la mensacarcina. Por último la secuencia de la pseudomolécula del presunto *cluster* de la dmsn para la cepa ST1020 fue comparada con la secuencia del potencial *cluster* de dmsn para la cepa ST1015 mediante el programa BLAST y se visualizaron los resultados en el programa ACT.

5.17 Determinación de la presencia del gen *dmsnK1* en cepas de *S. niveiscabiei*

Se realizó la amplificación del gen *dmsnK1* que codifica para una policétido sintetasa para las 15 cepas de *S. niveiscabiei* de la colección (ST107, ST108, ST109, ST1010, ST1011, ST1012, ST1013, ST1014, ST1015, ST1016, ST1017, ST1018, ST1019, ST1020 y ST1021). Para la amplificación de dicho gen se utilizaron los *primers* dmsnK1F/ dmsnK1R (Tabla 5.2), donde el tamaño del producto de amplificación esperado es de 971 pb. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25µl, cada una conteniendo 1X de Buffer de reacción, 1.5mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.4µM de cada *primer*, 100% v/v de DMSO, 1.25U de la enzima Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen, EE.UU) y 1µl de ADN genómico. Las condiciones del ciclo de reacción para ambas reacciones fueron: 94°C/3min, [95°C/45seg, temperatura de *annealing* Tabla 5.2/30seg, 72°C/90seg]/30 ciclos, 72°C/10min, 20°C/10min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, EE.UU). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con 0.5 µg/ml de Goodview (SBS Genetech Co., Ltd.) y se fotografiaron bajo luz UV. Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, EE.UU) para estimar el tamaño. Los amplicones fueron secuenciados y analizados mediante Blastn según ítem 5.11

Resultados

Identificación de potenciales *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios asociados a la patogenicidad

Mediante el análisis de las secuencias genómicas en forma de borrador para las cepas ST105, ST129, ST1015, ST1020 y ST1229 se predijeron un total de 82, 54, 83, 79 y 47 *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios, respectivamente. En el siguiente gráfico se compara la composición de los tipos de BGCs más importantes entre las 5 cepas y 9 cepas que representan las especies de *Streptomyces* patógenas depositadas en la base de datos Genbank (*S. niveiscabiei* NRRL B-24457, *S. acidiscabiei* 84-104, *S. scabiei* NRRL B-16523, *S. europaeiscabiei* NRRL B-24443, *S. luridiscabiei* NRRL B-24455, *S. puniscabiei* NRRL B-24456, *S. stelliscabiei* NRRL B-24447, *S. turgidiscabiei* Car8 y *S. ipomoeae* 91-03). En el ítem *otros* se agrupan aquellos tipos de *clusters* que no son abundantes (*Clusters* de biosíntesis de ectoína, fosfonato, indol, hglE-KS, nucleósido, aril polieno, betalactona, butirólactona, furano, melanina, linaridin y aminoglycoside/aminocyclitol) o que pertenecen a una combinación de *clusters*.

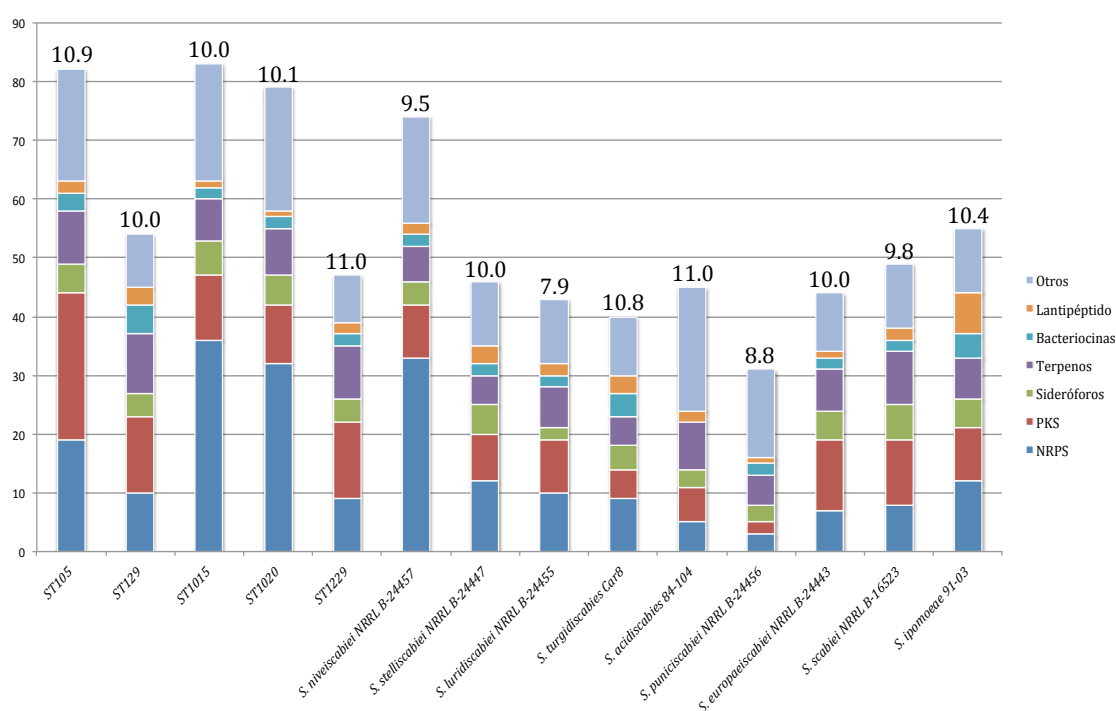


Figura 5.12. Diferentes tipos de *clusters* de metabolitos secundarios predichos por el software antiSMASH en los genomas secuenciados y genomas de cepas de referencia de la base de datos. NRPS: *Non-ribosomal peptide synthetase cluster*. PKS: *Polyketide synthase*. Arriba de cada columna se muestra el tamaño correspondiente a cada genoma en Mb. El eje Y corresponde a el número de BGC totales y en color a que grupos corresponden.

A continuación se detalla la composición de *clusters* predichos por antiSMASH (Tabla 5.3-5.7). Para cada cepa se informa el número de BGCs predichos y el tipo, la localización en el genoma, el

cluster conocido más cercano y el porcentaje de similitud con el mismo teniendo en cuenta la cantidad de genes que se conservan. Cuando no se encontró similitud con ningún *cluster* reportado los campos de la tabla se encuentran en blanco. Las tablas con los datos para las cepas de referencia se encuentran en el ANEXO II.

Tabla 5.3. *Clusters* de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. acidiscabies* ST105.

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Hasta		
1	NRPS	4	4,750	60,312	JBIR-78 / JBIR-95	77%
2	Lanthipeptide	6	38,061	56,544		
3	Ectoine	11	40,003	50,398	Ectoine	100%
4	NRPS	12	1	35,119	Coelichelin	72%
5	Lanthipeptide	18	16,391	42,836		
6	NRPS	23	12,009	44,548	Thaxtomin	36%
7	NRPS-like	28	1	24,327	Carotenoid	18%
8	Terpene	42	1,952	28,729	Hopene	84%
9	T2PKS, PKS-like	45	1	35,066	SF2575	41%
10	Siderophore	46	8,788	20,554	Desferrioxamine	83%
11	T3PKS	48	1	28,217	Herboxidiene	5%
12	Phosphonate	68	1	30,855		
13	Terpene	72	7,494	28,537		
14	Siderophore	90	12,820	27,311		
15	Terpene	101	14,301	26,486		
16	Indole	103	11,155	26,348	Terfestatin	23%
17	Siderophore	105	1,431	12,594	Grincamycin	8%
18	hglE-KS	108	549	25,899		
19	Nucleoside	101	11,482	25,506	Toyocamycin	30%
20	Betalactone, NRPS-like, Nucleoside	191	1	24,412	Nikkomycin	100%
21	NRPS-like, transAT-PKS-like	144	1	21,702	Oxazolomycin	12%
22	Terpene	156	1	19,632	Ebelactone	5%
23	T2PKS	160	1	20,257	Polyketomycin	13%
24	T1PKS	163	1	19,962	Monensin	44%
25	T2PKS	166	1	19,436	Mensacaricin	11%
26	TransAT-PKS,NRPS	174	1	18,810	Phthoxazolin	4%
27	Terpeno	193	4,352	17,694	Albaflavenone	100%
28	Arylpolyene	208	1	16,780	Pactamycin	28%
29	NRPS-like	214	1	16,510		
30	NRPS	219	1	16,195	Calcium-dependent antibiotic	15%
31	T1PKS	227	1	15,772	Stambomycin	36%
32	Melanin	245	1	7,538	Melanin	60%
33	T1PKS	263	1	13,483	Micromonolactam	100%
34	NRPS	272	1	13,165		
35	Siderophore	283	6,256	12,640		
36	Terpene	285	1	12,323	Napyradiomycin	15%

37	T1PKS	289	1	12,257	Laidlomycin	37%
38	Other	291	1	12,207		
39	Betalactone	294	1	12,126	Lomaiviticin	6%
40	PKS-like	295	1	12,107	Pactamycin	11%
41	Terpene	315	1	11,417	Geosmin	100%
42	Bacteriocin	326	1	8,873	Informatipeptin	42%
43	T1PKS	335	1	10,802	Divergolide	17%
44	T1PKS	336	1	10,796	Micromonolactam	100%
45	Phosphonate	340	1	10,701	Macrotermycins	7%
46	T1PKS	346	1	10,503	Phoslactomycin B	21%
47	NRPS	352	1	10,298	WS9326	7%
48	NRPS	353	1	10,276	Kutznerides	6%
49	Betalactone, NRPS-like	358	1	10,120		
50	Butyrolactone	359	1	7,979	Gamma- butyrolactone	100%
51	NRPS	387	1	9,400		
52	Terpene	411	1	8,530		
53	NRPS	419	1	8,217	WS9326	7%
54	T1PKS	439	1	7,657	Mediomycin A	25%
55	T3PKS	444	1	7,469	Furaquinocin A	21%
56	Nucleoside	445	1	7,466		
57	Terpene	460	1	7,066		
58	NRPS	463	1	7,056	Laspartomycin	6%
59	T1PKS	511	1	6,328		
60	T1PKS	526	1	6,060	Sceliphrolactam	24%
61	Bacteriocin	535	1	5,964		
62	T2PKS	539	1	5,897	Jadomycin	42%
63	T1PKS	546	1	5,804	ECO-02301	28%
64	Bacteriocin	612	1	4,836		
65	TransAT-PKS- like	623	1	4,691		
66	NRPS	640	1	4,463		
67	T1PKS	656	1	4,310		
68	NRPS	673	1	4,152		
69	NRPS	695	1	3,849		
70	NRPS	699	1	3,750		
71	NRPS-like	709	1	3,591		
72	Butyrolactone	722	1	3,410		
73	Butyrolactone	735	1	3,224	Streptovaricin	4%
74	NRPS-like	754	1	3,000	Kedarcidin	1%
75	T1PKS	786	1	2,707	Micromonolactam	100%
76	T1PKS	794	1	2,598	Micromonolactam	100%
77	T1PKS	798	1	2,545	Micromonolactam	100%
78	Furan	809	1	2,424	Methylenomycin	14%
79	NRPS	813	1	2,401		
80	T1PKS	822	1	2,274	Micromonolactam	100%
81	Siderophore	868	1	1,770		
82	T1PKS	967	1	1,187	Micromonolactam	100%

Tabla 5.4. *Clusters* de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. scabies* ST129.

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Hasta		
1	NRPS-like	17	22,492	45,467		
2	Lanthipeptide	20	11,373	36,799		
3	Siderophore	25	1	10,522		
4	Indole	31	1	21,726	Terfestatin	28%
5	NRPS	51	1	29,490	Thaxtomin	27%
6	T1PKS	53	1	28,573	Lasalocid	11%
7	Lanthipeptide	54	1	12,653		
8	NRPS	56	1	26,723	Laspartomycin	13%
9	Siderophore	93	6,764	19,226		
10	Betalactone	111	1	19,482	Isofuranonaphthoquinone	8%
11	NRPS, melanin, siderophore	124	1	18,052	Scabichelin	50%
12	NRPS-like	142	1	16,735	Galbonolides	10%
13	Terpene	143	196	16,703		
14	Siderophore	171	4,922	15,143	Desferrioxamine B	66%
15	NRPS	180	1	14,638		
16	Terpene	200	2,564	13,434		
17	Terpene	216	1	12,799		
18	PKS-like	219	1	12,724	Sceliphrolactam	8%
19	Terpene	237	1	12,088	Ebelactone	5%
20	Butyrolactone	243	1	6,874	Griseoviridin / viridogrisein	8%
21	T1PKS	252	1	11,710	Lydicamycin	24%
22	Bacteriocin	275	2,450	10,831	Informatipeptin	28%
23	T1PKS	286	1	10,568	Concanamycin A	17%
24	NRPS	294	1	10,322	Scabichelin	60%
25	T1PKS	337	1	9,496	Spinosad	26%
26	Terpene	345	1	9,410	Phosphonoglycans	6%
27	Terpene	347	1	9,372	FD-594	4%
28	NRPS-like	421	1	7,351		
29	Terpene	434	1	7,204	Geosmin	100%
30	Linaridin	448	1	6,979	Pentostatine / vidarabine	9%
31	NRPS	449	1	6,973		
32	LAP, Butyrolactone	467	1	6,724	Goadsporin	12%
33	Lanthipeptide	476	1	6,644		
34	Terpene	533	1	5,839	Isorenieratene	37%
35	Bacteriocin	540	1	5,771	Nogalamycin	30%
36	T1PKS	567	1	5,480	RK-682	27%
37	Terpene	581	1	5,350	Hopene	38%
38	Bacteriocin	587	1	5,247		
39	siderophore	589	1	5,214	Grincamycin	8%
40	Butyrolactone	643	1	4,499	Sch47554 / Sch47555	3%
41	Ectoine	655	1	4,416	Ectoine	100%
42	NRPS	660	1	4,373		
43	Bacteriocin	705	1	3,966	Bottromicina	38%
44	T1PKS	714	1	3,891	Micromonolactam	100%
45	Bacteriocin	722	1	3,824	Bottromycin	30%
46	Melanin	729	1	3,763	Melanin	42%

47	T1PKS	749	1	3,566	Concanamycin A	21%
48	T2PKS	830	1	2,787	Spore pigment	25%
49	NRPS	834	1	2,763		
50	T1PKS	887	1	2,400	Micromonolactam	100%
51	Terpene	905	1	2,309	Isorenieratene	25%
52	T1PKS	964	1	1,946	Micromonolactam	100%
53	T1PKS	970	1	1,906		
54	T1PKS	984	1	1,826	Micromonolactam	100%

Tabla 5.5. Clusters de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. niveiscabiei* ST1015.

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Hasta		
1	T3PKS	16	1	32,065	Herboxidiene	6%
2	Terpene	35	7,501	31,207	Hopene	84%
3	Siderophore	59	19,422	26,585		
4	NRPS, other	63	1	25,878		
5	Lanthipeptide	75	1	13,702		
6	NRPS-like, T1PKS, Indole	78	1	23,755	Terfestatin	23%
7	Indole	84	11,401	22,741	A-500359s	8%
8	Siderophore	92	14,229	21,873		
9	Ectoine	103	6,784	17,179	Ectoine	100%
10	Siderophore	109	13,905	20,187	Grincamycin	8%
11	Terpene	113	1	19,265		
12	NRPS	116	1	19,537	Coelichelin	72%
13	NRPS-like	131	1	18,430	WS9326	10%
14	Bacteriocin	138	1	7,611		
15	Terpene	142	4,354	17,798	Albaflavenone	100%
16	Siderophore	147	4,036	15,805	Desferrioxamine B	83%
17	Terpene	149	1	17,620	Ebelactone	5%
18	Siderophore	154	1	6,816		
19	NRPS-like, transAT-PKS-like	161	1	16,962	Phthoxazolin	11%
20	Siderophore	165	9,904	16,905		
21	T2PKS	177	1	16,245	Kinamycin	28%
22	T1PKS	181	1	15,746	Foxicins A-D	4%
23	Betalactone	212	1	13,910	Malacidin	10%
24	NRPS	214	1	13,785	WAP-8294A2 (lotilibcin)	20%
25	NRPS	221	1	13,677	Calcium -dependent antibiotic	15%
26	TransAT-PKS	246	1	12,645	Phthoxazolin	4%
27	Terpene	256	1	12,315		
28	aryl polyene	260	1	12,247	Pactamycin	18%
29	NRPS	267	1	12,045	Stenothricin	27%
30	T2PKS	279	1	11,454	Xantholipin	18%
31	Bacteriocin	287	2,294	11,328	Informatipeptin	42%
32	NRPS	290	1	10,961	JBIR-78 / JBIR-95	33%
33	NRPS	305	1	10,508		
34	NRPS-like	315	1	10,294		
35	Melanin	316	4,295	10,285	Lactonamycin	8%

36	NRPS-like	332	1	9,943		
37	PKS-like	377	1	8,836	Pactamycin	11%
38	Terpene, butyrolactone	379	1	8,779	Gama-butyrolactone	66%
39	Other	385	1	8,617		
40	NRPS	387	1	8,579		
41	T1PKS	392	1	8,491		
42	Terpene	405	1	8,185	Merochlorin	9%
43	T2PKS	414	1	7,987	Mensacaricin	42%
44	NRPS	429	1	7,791	Kutznerides	6%
45	NRPS	435	1	7,552	Cysteoamide	36%
46	NRPS	436	1	7,496	WS9326	5%
47	NRPS	468	1	6,989		
48	NRPS	474	1	6,892		
49	Betalactone, NRPS-like	479	1	6,838	Caerulomycin A	8%
50	nucleoside	487	1	6,727	Polyoxin	7%
51	T2PKS	522	1	6,174	Alnumycin	6%
52	NRPS	530	1	6,058		
53	T1PKS	543	1	5,920		
54	NRPS-like	557	1	5,696		
55	Terpene	577	1	5,446		
56	T1PKS	602	1	5,099		
57	NRPS	603	1	5,085		
58	NRPS	604	1	5,080		
59	NRPS	630	1	4,769		
60	NRPS	639	1	4,656	Albachelin	20%
61	NRPS	662	1	4,345		
62	T3PKS	666	1	4,335	Furaquinocin A	13%
63	NRPS	693	1	4,102		
64	NRPS	701	1	3,916		
65	Butyrolactone	718	1	3,767	Gamma-butyrolactone	66%
66	phosphonate	723	1	3,696		
67	hglE-KS	742	1	3,533		
68	NRPS	760	1	3,362	Daptomycin	4%
69	nucleoside	774	1	3,196		
70	NRPS	779	1	3,174		
71	NRPS	783	1	3,124		
72	NRPS	805	1	2,913		
73	NRPS-like	844	1	2,575	Gobichelin	11%
74	NRPS	846	1	2,567		
75	NRPS	862	1	2,455		
76	amglyccycl	887	1	2,263	Cetoniacytone A	9%
77	Butyrolactone	948	1	1,906		
78	hglE-KS	957	1	1,831		
79	NRPS-like	975	1	1,675		
80	NRPS-like	985	1	1,625		
81	furan	1045	1	1,335	Methylenomycin	14%
82	NRPS	1070	1	1,237	Rhizomide A / rhizomide B / rhizomide C	100%
83	NRPS	1121		1,032		

Tabla 5.6. *Clusters* de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. niveiscabiei* ST1020.

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Hasta		
1	T3PKS	12	5,191	46,189	Herboxidiene	6%
2	Siderophore	15	13,121	27,585		
3	TransAT-PKS-like,NRPS-like	20	1	42,436	Phthoxazolin	11%
4	NRPS, otros	44	1	32,726	Hormaomycin	13%
5	NRPS	45	1	32,283	Salinamide A	35%
6	Terpene	53	1	23,550	Hopene	84%
7	Bacteriocin	68	889	11,185	Informatipeptin	42%
8	Lanthipeptide	93	1	13,702		
9	Indole	104	1	11,325	A-503083	5%
10	Fused	111	1,124	22,223		
11	Siderophore	122	1	7,035		
12	T2PKS	123	1	20,776	Polyketomycin	13%
13	TransAT-PKS,NRPS	128	1	20,344	Phthoxazolin	4%
14	Siderophore	132	13,893	20,204	Grincamycin	8%
15	NRPS	137	1	19,694	Coelichelin	45%
16	Terpene	139	359	19,615		
17	Siderophore	165	1	7,596	Desferrioxamine B	83%
18	Ectoine	171	594	10,989	Ectoine	100%
19	PKS-like	177	1	17,382	Pactamycin	11%
20	Terpene	178	1	12,758	Albaflavenone	100%
21	T2PKS	191	1	16,245	Kinamycin	28%
22	T2PKS	198	1	15,794	Mensacaricin	53%
23	T1PKS	199	1	15,776	Foxicins A-D	4%
24	NRPS	203	1	15,523		
25	NRPS	208	1	15,336	Kutznerides	6%
26	Terpene	212	1	15,000	Furaquinocin A	34%
27	NRPS	219	1	14,517	Calcium-dependent antibiotic	15%
28	Betalactone	232	1	13,966	Malacidin	10%
29	Phosphonate	256	1	12,882	Laspartomycin	4%
30	Terpene	271	1	12,308		
31	NRPS	277	1	12,142		
32	NRPS	280	1	12,060	Stenothricin	27%
33	Melanin	285	4,339	11,972	Melanin	60%
34	Terpene	287	1	11,920	Ebelactone	5%
35	T2PKS	303	1	11,407	Xantholipin	18%
36	arylpolyyene	308	1	11,235	Pactamycin	18%
37	NRPS-like	342	1	10,102		
38	nucleoside	380	1	9,165	Polyoxin	15%
39	Indole	382	1	9,133	Terfestatin	19%
40	Other	398	1	8,629		
41	T1PKS	401	1	8,561	Micromonolactam	100%
42	NRPS-like	416	1	7,846	Friulimicin	15%
43	NRPS	423	1	7,530	Cysteoamide	36%

44	NRPS	424	1	7,496	Telomycin	5%
45	NRPS	427	1	7,351		
46	T1PKS	436	1	7,171	Streptolydigin	5%
47	NRPS	440	1	7,087		
48	Butyrolactone	448	1	6,951	Gamma-butyrolactone	100%
49	T1PKS	458	1	6,832		
50	Betalactone, NRPS-like	459	1	6,802	Caerulomycin A	8%
51	T1PKS, NRPS-like	468	1	6,630	Kedarcidin	1%
52	Bacteriocin	492	1	6,144		
53	NRPS	495	1	6,044	Skyllamycin	6%
54	Siderophore	513	1	5,733		
55	Terpene	515	1	5,705	Geosmin	100%
56	Terpene	527	1	5,474		
57	NRPS	565	1	4,817		
58	NRPS-like	567	1	4,766	Micromonolactam	100%
59	NRPS	569	1	4,751	Albachelin	20%
60	NRPS	597	1	4,352		
61	NRPS	603	1	4,281		
62	NRPS	639	1	3,731		
63	NRPS-like	643	1	3,713		
64	NRPS	655	1	3,561		
65	hglE-KS	657	1	3,538		
66	NRPS	679	1	3,246		
67	NRPS	688	1	3,174		
68	NRPS	691	1	3,124		
69	NRPS	707	1	2,928		
70	NRPS	708	1	2,913		
71	nucleósido	710	1	2,892		
72	NRPS	721	1	2,798		
73	NRPS-like	749	1	2,544	Gobichelin	11%
74	transAT-PKS-like	769	1	2,368		
75	amglyccycl	784	1	2,257	Cetoniacytone A	9%
76	furan	808	1	2,098	Methylenomycin	14%
77	NRPS-like	817	1	2,052		
78	butyrolactone	841	1	1,908		
79	NRPS-like	872	1	1,655		

Tabla 5.7. *Clusters* de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. europaeescabiei* ST1229.

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Hasta		
1	lanthipeptide	12	23,682	48,317		
2	hglE-KS	27	1	33,548	Daptomycin	7%
3	NRPS	40	1	33,895	Thaxtomin	54%
4	Melanin	46	13,052	23,417	Melanin	57%
5	Terpene	50	1	25,421	Hopene	92%
6	Lanthipeptide	60	13,904	28,030		
7	Siderophore	72	11,591	23,588		
8	Ectoine	81	16,822	24,617	Ectoine	100%
9	Terpene	95	9,864	23,223	Geosmin	100%
10	T1PKS	103	1	22,492		
11	Siderophore	110	11,112	22,048		
12	Siderophore	171	3,224	14,996	Desferrioxamine B	83%
13	Terpene	124	1	11,075		
14	Terpene	125	1	14,840	Teicoplanin	3%
15	Siderophore	129	1,881	15,420		
16	NRPS-like	151	1	19,185	Stenothricin	13%
17	Linaridin	171	1	14,046	Pentostatine / vidarabine	9%
18	T1PKS,NRP S-like	191	1	17,250	Lagunapyrone A lagunapyrone B lagunapyrone C	22%
19	NRPS	201	1	16,666		
20	NRPS- like,T1PKS	217	1	16,050		
21	T1PKS	223	1	15,665		
22	Terpene	282	1	12,866	Ebelactone	5%
23	T1PKS	303	1	12,154	Ibomycin	12%
24	Indole	308	1	11,992	Terfestatin	28%
25	Terpene	311	1	11,872	Thiocoraline	18%
26	Bacteriocin	342	3,938	11,036	Informatipeptin	28%
27	Bacteriocin	376	4,170	10,099		
28	NRPS	457	1	7,863		
29	NRPS-like	467	1	7,676		
30	T1PKS	490	1	7,144	PM100117 / PM100118	25%
31	Melanin	605	1	5,220	Istamycin	7%
32	NRPS	617	1	4,950		
33	T1PKS	618	1	4,934		
34	PKS-like	666	1	4,305	PM100117 / PM100118	14%
35	NRPS	675	1	4,189		
36	Terpene	685	1	4,079	Carotenoid	36%
37	T2PKS	714	1	3,716	Spore pigment	33%
38	NRPS	727	1	3,567		
39	Terpene	729	1	3,542	Isorenieratene	37%
40	T1PKS	765	1	3,245	Micromonolactam	100%
41	NRPS	769	1	3,208		
42	T1PKS	774	1	3,169	Micromonolactam	100%
43	T1PKS	777	1	3,150	Micromonolactam	100%
44	T1PKS	813	1	2,757		

45	T1PKS	842	1	2,442	Micromonolactam	100%
46	T1PKS	845	1	2,419	Cahuitamycins	100%
47	T1PKS	1007	1	1,269	Micromonolactam	100%

Se realizaron diversas comparaciones entre los *clusters* encontrados en las cepas ST1015, ST1020 con los de otras cepas patógenas. Se puso énfasis en los *clusters* con potencial para albergar genes asociados a la síntesis de compuestos con actividad tóxica como los *clusters* de furaquinocina y mensacarcina que conservan, aunque parcialmente, genes involucrados en la síntesis de compuestos con actividad antitumoral (Kawasaki *et al.*, 2006; Plitzko *et al.*, 2017). Se buscaron específicamente los *clusters* de biosíntesis de toxinas reportadas en *Streptomyces* tales como taxtominas, concanamicinas, FD-891, borrelidina y fitotoxinas derivadas de coronafacoil, así como el *cluster* de la mensacarcina, compuesto similar al reportado como fitotóxico en este trabajo, la desmetilmensacarcina. En la Tabla 5.8 se detallan las similitudes entre las cepas analizadas para los *clusters* mencionados así como el *contig* del genoma en el que se encuentran.

Tabla 5.8. Resultados de antiSMASH para los *clusters* de taxtomina, mensacarcina y concanamicina de los diferentes genomas.

Cepa	Cluster de Taxtomina		Cluster de Mensacarcina		Cluster de Concanamicina A	
	Contig	Similitud%	Contig	Similitud %	Contig	Similitud%
ST105	23	36	166	11		
ST1015			414	42		
ST1020			198	53		
ST129	51	27			286	17
					749	21
ST1229	40	54				
<i>S. niveiscabiei</i> NRRL B-24457	1268	54	1106	57		
<i>S. acidiscabiei</i> 84-104	239	27	206	84		
<i>S. scabiei</i> NRRL B-16523	346	54			126	17
					541	21
					602	75
					737	17
<i>S. europaeiscabiei</i> NRRL B-24443	240	54			496	21
<i>S. luridiscabiei</i> NRRL B-24455						
<i>S. puniscabiei</i> NRRL B-24456						
<i>S. stelliscabiei</i> NRRL B-24447	445	54			13	53
					215	46
<i>S. turgidiscabiei</i> Car8	334	81				
<i>S. ipomoeae</i> 91-03	607	36			607	36

En las cepas que no se encontró similitud con los *clusters* analizados los casilleros están coloreados en gris.

Los resultados de antiSMASH muestran que el *cluster* de taxtomina se conserva (al menos en parte) en todas las cepas analizadas con excepción de las cepas aisladas en Uruguay *S. niveiscabiei* ST1015 y ST1020 y las cepas *S. luridiscabiei* NRRL B-24455 y *S. puniscabiei* NRRL B-24456. El *cluster* de biosíntesis de la toxina concanamicina A se encuentra en las dos cepas de *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei* NRRL B-24443 y *S. stelliscabiei* NRRL B-24447 que causan sarna común en papa y en *S. ipomoeae* que causa sarna en boniato. No se encontraron en ninguna de las cepas utilizando la herramienta antiSMASH similitud con los *cluster* de biosíntesis de las fitotoxinas; FD-891, borrelidina y fitotoxinas derivadas de coronafacoil. El *cluster* de la mensacarcina se encuentra en las 3 cepas de *S. niveiscabiei* y las dos cepas de *S. acidiscabies* analizadas.

Búsqueda, identificación, ensamblado y anotación del presunto *cluster* de biosíntesis para la desmetilmensacarcina en la cepa ST1015

Mediante el software antiSMASH, y la comparación del genoma de la cepa ST1015 en forma de borrador con la secuencia parcial del *cluster* de la mensacarcina reportado se determinó cuáles de los *contigs* del genoma de la cepa ST1015 tienen secuencias con alta similitud al *cluster* de la mensacarcina. Para este análisis se utilizaron los programas ABACAS y BLAST. Según el programa ABACAS el presunto *cluster* de la dmsn está formado por 4 *contigs* que se ordenan de la siguiente forma: 431, 414, 601 y 552 (Figura 5.13).

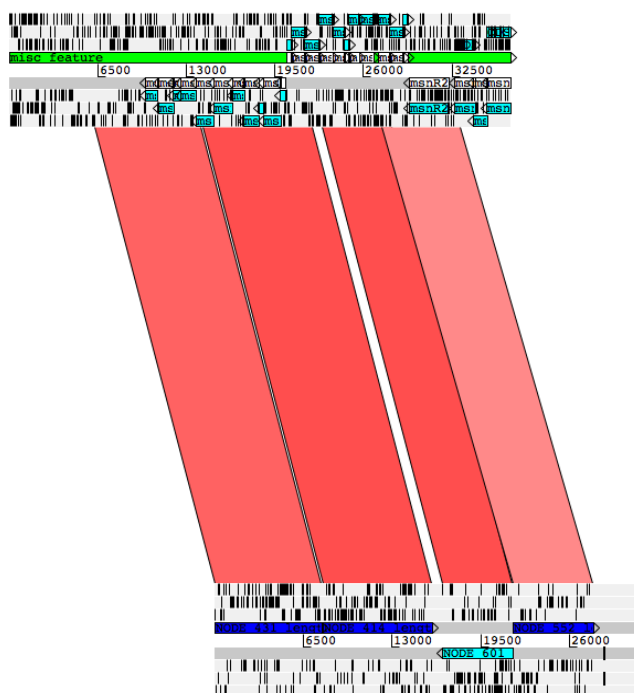


Figura 5.13 Resultados de la comparación del cluster de mensacarcina (arriba) con el genoma de *S. niveiscabiei* ST1015 (abajo) mediante ABACAS y visualizados en el programa ACT. Los NODE corresponden al número de *contigs* del genoma.

Mediante la comparación por BLAST el presunto *cluster* de la dmsn esta formado por 6 *contigs* que se ordenan de la siguiente forma 431, 414, 601, 552, 594 y 356 (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Resultados de la comparación de la secuencia parcial del *cluster* de msn con la secuencia genómica de ST1015 mediante la herramienta BLAST.

Número de <i>contig</i> genoma ST1015	% Identidad	Largo del alineamiento	Mismatch	gaps	Secuencia del <i>Cluster</i> de msn (pb)		Secuencia genómica ST1015 (pb)		e-VALUE
					Desde	Hasta	Desde	Hasta	
431	84.76	899	117	11	10039	10918	3799	4696	0.0
431	83.71	2665	346	50	10962	13614	4690	7278	0.0
431	85.40	411	60	0	13742	14152	7357	7767	6,00E-118
414	88.53	802	92	0	14134	14935	1	802	0.0
414	84.56	5228	731	61	15028	20229	838	6015	0.0
414	83.63	1790	240	34	20398	22159	6214	7978	0.0
601	83.82	2714	405	28	22958	25659	5105	2414	0.0
601	82.67	981	159	11	25703	26677	2319	1344	0.0
601	76.63	1147	228	31	27056	28191	1121	4	5,00E-169
552	77.34	428	85	11	29111	29532	1568	1989	2,00E-62
594	91.24	1439	126	0	32646	34084	1974	536	0.0
356	89.35	1737	173	10	35012	36742	3655	1925	0.0

Para verificar el orden de los *contigs* y completar la secuencia de los *gaps* que hay entre uno y otro, se diseñaron *primers* en los extremos de los *contigs* contiguos. Se obtuvieron productos de amplificación utilizando los *primers* DM12_3F/ DM12_4R para la unión de los *contigs* 431-414 (380pb), los *primers* DM23_1R/ DM23_2F para la unión de los *contigs* 414-601 (1214pb) y los *primers* DM34_1F/DM34_4R para la unión de los *contigs* 601-502 (616pb). No se obtuvieron productos de amplificación para las PCRs donde se utilizaron los pares de *primers* DM45_3F/DM34_4R, DM56_1F/DM56_2R para las unión de los *contigs* 552-594 y 594-356 respectivamente. Los productos de amplificación se enviaron a secuenciar y se verificó el orden de los primeros 4 *contigs* pudiendo unir las secuencias de los mismos una vez conocidas las secuencias de los productos amplificados. La secuencia ensamblada del *cluster* desde 431 a 502 y el agregado de la secuencia de los *contigs* sucesivos 594 y 356 para los cuales no se logró verificar que fueran contiguos del presunto *cluster*, fue anotada mediante RAST y comparada con la secuencia parcial reportada para el *cluster* de la mensacarcina. La secuencia ensamblada del presunto *cluster* para la dmsn (~27kb) posee el 90% de los genes que forman parte de la secuencia parcial reportada para el *cluster* de la msn. El presunto *cluster* posee 24 genes anotados e identificados como 3 pertenecientes al sistema PKS mínimo, 11 oxigenasas, 3 ciclasas, 2 proteínas reguladoras, 2 metiltransferasa y 3 proteínas hipotéticas. En la Figura 5.14 se muestran los resultados de la comparación mediante BLAST de la secuencia parcial del *cluster* de la msn con la secuencia de la molécula ensamblada para el presunto *cluster* de la desmetilmensacarcina visualizados en el programa ACT.

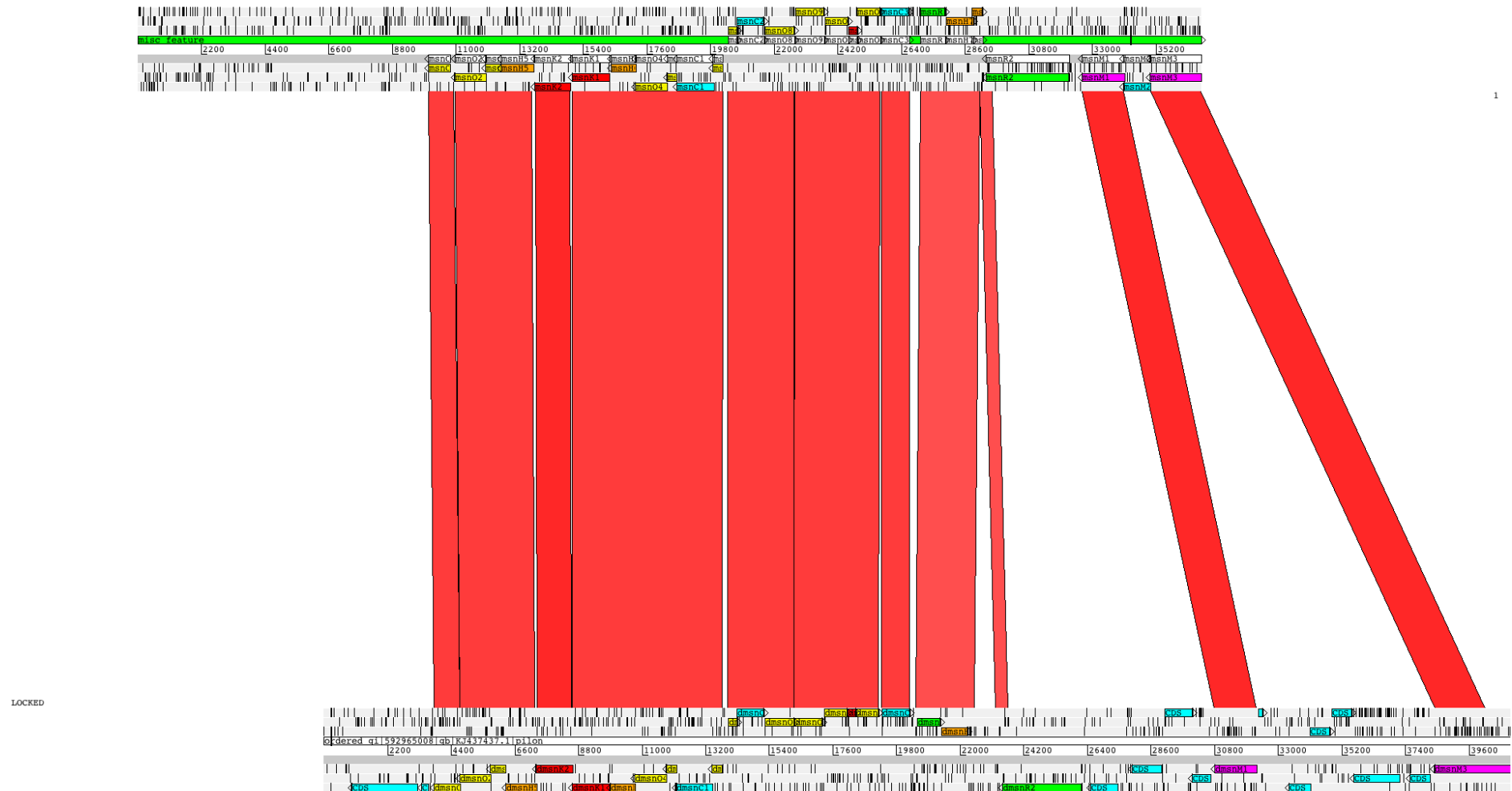


Figura 5.14. Resultados de la comparación de la secuencia parcial del *cluster* de mensacarcina de *S. bottropensis* Goe C4/4 (arriba) con el presunto *cluster* de dmsn de *S. niveiviscabiei* ST1015 (abajo) mediante BLAST y visualizados en el programa ACT.

Búsqueda e identificación de potenciales *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios asociados a la patogenicidad en el genoma completo y cerrado de la cepa ST1015

Secuenciación y Análisis del genoma

Se obtuvo la secuencia completa y cerrada del genoma de la cepa ST1015 mediante la tecnología Oxford nanopore. Se generaron 1,776,177,308 bases lográndose una cobertura del 177x. Los *reads* tienen una longitud media de 1,132 bp con una media de calidad de 8.7 (~ 85 % de precisión). El genoma tiene un tamaño de 10.17Mb y contenido de GC de 71.4%. Mediante el software RAST se anotó dicho genoma y se predijeron un total de 88 genes que codifican para ARNs y 9426 CDS donde 3880 codifican para proteínas hipotéticas y 5546 para proteínas de función conocida. Se realizó la búsqueda e identificación de potenciales *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios asociados a la patogenicidad en la secuencia genómica completa para la cepa ST1015 mediante antiSMASH que predijo un total de 39 *clusters*. En la Figura 5.15 se muestra la organización de los distintos *clusters* en el cromosoma lineal de la cepa ST1015. El cluster número 2 en el extremo izquierdo pertenece al presunto *cluster* de la dmsn y posee el 84% de los genes que se encuentran en la secuencia parcial del *cluster* de la mensacarcina.



Figura 5.15. Distribución física de los *clusters* de metabolitos secundarios predichos en el genoma de *S. niveiscabiei* ST1015. Las casillas indican los límites del *cluster* putativo del metabolito secundario predicho por antiSMASH. Los números son el número de BGC (Tabla 5.10).

En la Tabla 5.10 se informa la cantidad de BGCs predichos y el tipo, la localización en el genoma, el *cluster* conocido más cercano y el porcentaje de similitud con el mismo teniendo en cuenta la cantidad de genes que se conservan. Cuando no se encontró similitud con ningún *cluster* reportado los campos de la Tabla 5.10 se encuentran en blanco.

Tabla 5.10. *Clusters* de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. niveiscabiei* ST1015.

BGC	Tipo de BGC	Localización		Cluster conocido más cercano	Similitud
		Desde	Hasta		
1	Terpene	13.969	34.904		
2	T2PKS	243.881	315.594	Mensacaricin	84%
3	NRPS. PKS-like, T1PKS, arylpolyene	399.738	494.602	Pactamycin	41%
4	T1PKS, NRPS-like	665.903	710.665	Meridamycin	13%
5	T1PKS, ectoine	844.368	887.311	Ectoine	100%
6	Fused	954.293	977.878	Glycopeptidolipid	20%
7	T1PKS	1.106.666	1.149.403	Jawsamycin	23%
8	Siderophore	1.468.703	1.481.512		
9	Bacteriocin	1.502.101	1.509.628	Informatipeptin	42%
10	NRPS,T2PKS, T1PKS, NRPS-like, other	1.795.050	1.968.738	Kedarcidin	5%
11	T3PKS	2.133.065	2.173.732	Herboxidiene	6%
12	NRPS-like	2.707.301	2.750.403	Pristinamycin	2%
13	Melanin	4.008.724	4.019.140	Lactonamycin	10%
14	Siderophore	4.128.671	4.139.623	Desferrioxamine B	83%
15	Lanthipeptide	5.396.107	5.418.545		
16	Terpene	6.847.827	6.868.180	Albaflavenone	100%
17	NRPS	7.149.355	7.210.486	Cysteoamide	63%
18	Siderophore	7.592.472	7.604.314		
19	T2PKS	7.716.949	7.788.334	Xantholipin	67%
20	Bacteriocin	7.861.036	7.872.607		
21	Terpene. butyrolactone	7.920.985	7.941.546	Gamma-butyrolactone	100%
22	Nucleoside, betalactone, NRPS-like	8.094.192	8.142.627	Nikkomycin	100%
23	Siderophore	8.158.935	8.172.260	Grincamycin	8%
24	Betalactone, NRPS	8.185.154	8.292.869	Friulimicin	30%
25	Indole	8.440.927	8.459.359	Terfestatin	23%
26	NRPS	8.530.831	8.595.058	Pristinamycin	5%
27	Terpene	8.654.854	8.678.889	Hopene	84%
28	T1PKS, hglE-KS, NRPS, amglyccycl	8.737.369	8.827.429	Cahuitamycins	20%
29	Butyrolactone	8.854.332	8.865.252	Streptovaricin	7%
30	NRPS	8.876.865	8.935.816	Laspartomycin	6%
31	Indole, terpene	9.042.020	9.067.670	A-500359s	8%
32	T1PKS, furan	9.069.671	9.114.341	Laspartomycin	6%

33	Terpene	9.137.479	9.157.813		
34	NRPS	9.182.862	9.232.707	Coelichelin	100%
35	NRPS	9.308.190	9.362.936	Thiazostatin	40%
36	Other, T3PKS, terpene	9.385.878	9.437.264	Furaquinocin A	34%
37	Terpene	9.481.071	9.502.105	Ebelactone	5%
38	NRPS, trans AT-PKS, phosphonate	9.707.886	9.826.322	Phthoxazolin	11%
39	T2PKS	9.956.211	10.028.688	Fluostatins M-Q	

Identificación, ensamblado y anotación del presunto *cluster* de biosíntesis para la desmetilmensacarcina en la cepa ST1015 en el genoma completo

Mediante la comparación de la secuencia del genoma completo cerrado y la pseudomolécula del *cluster* de la desmetilmensacarcina se confirmó que los *contigs* 594 y 356 no forman parte del presunto *cluster* de la dmsn (Figura 5.16). El presunto *cluster* de la dmsn conserva el 84% de los genes con respecto a la secuencia parcial del *cluster* msn. No contiene ninguna de las metiltransferasas (*msnM1*, *msnM2* y *msnM3*) y la proteína hipotética *msnH8*. Por lo que el presunto *cluster* de la dmsn posee 22 genes anotados e identificados como 3 pertenecientes al sistema PKS mínimo, 11 oxigenasas, 3 ciclasas, 2 proteínas reguladoras y 3 proteínas hipotéticas.

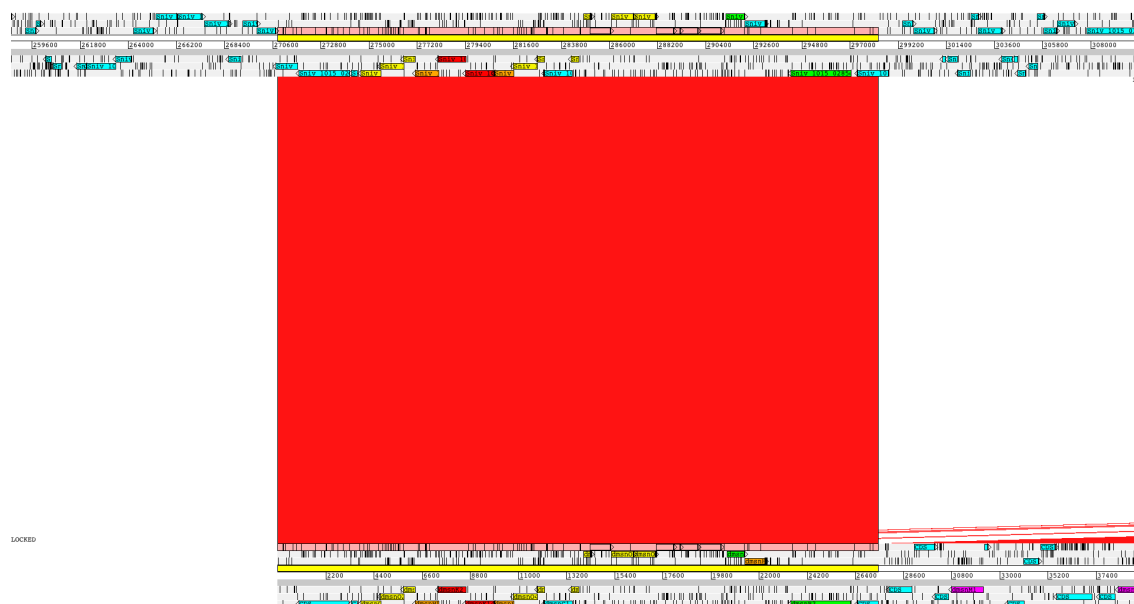


Figura 5.16. Resultados de la comparación del genoma cerrado de *S. niveiviscabiei* ST1015 (arriba) con la pseudomolécula del presunto *cluster* de la dmsn generado con la secuencia borrador del genoma ST1015 mediante BLAST y visualizados en el programa ACT.

En la Tabla 5.11 se realiza la comparación mediante BLASTp de la secuencia proteica correspondiente para el *cluster* en *S. bottropensis* Goe C4/4 y en *S. niveiviscabiei* ST1015.

Tabla 5.11. Comparación de la secuencia parcial del *cluster* de *msn* en la cepa de *Streptomyces bottropensis* Goe C4/4 con el genoma completo de *S. niveiscabiei* ST1015.

<i>Streptomyces bottropensis</i> Goe C4/4 <i>cluster cos2-msn</i> (KJ437437)		<i>S. niveiscabiei</i> <i>Genes del Cluster</i> <i>de dmsn</i> predichos	Posible Función	% Identidad	% coverage	e-value
Proteína_id	Nombre del gen					
AHL46681.1	<i>msn01</i>	S.niv_ST1015_0264	Ketoreductase	85	83.5	2.4e-122
AHL46682.1	<i>msn02</i>	S.niv_ST1015_0265	Luciferase-like monooxygenase	88	100.0	7.5e-184
AHL46683.1	<i>msn03</i>	S.niv_ST1015_0266	Flavin reductase	76	100.0	3.7e-67
AHL46684.1	<i>msnH5</i>	S.niv_ST1015_0267	Hypothetical protein	74	100.0	7.6e-152
AHL46685.1	<i>msnK2</i>	S.niv_ST1015_0268	Ketosynthase	89	95.7	7,00E-205
AHL46686.1	<i>msnK1</i>	S.niv_ST1015_0269	Ketosynthase	95	99.8	1.3e-227
AHL46687.1	<i>msnH6</i>	S.niv_ST1015_0270	Hypothetical protein	76	98.9	1.2e-112
AHL46688.1	<i>msn04</i>	S.niv_ST1015_0271	Luciferase-like monooxygenase	86	100.0	5,00E-183
AHL46689.1	<i>msn05</i>	S.niv_ST1015_0272	Monooxygenase	80	100.0	5.7e-44
AHL46690.1	<i>msnC1</i>	S.niv_ST1015_0273	Putative bifunctional cyclase/dehydratase	70	100.0	9.2e-165
AHL46691.1	<i>msn06</i>	S.niv_ST1015_0274	Monooxygenase	74	100.0	7.6e-39
AHL46692.1	<i>msn07</i>	S.niv_ST1015_0275	Monooxygenase	85	98.1	2.7e-44
AHL46693.1	<i>msnC2</i>	S.niv_ST1015_0276	Putative cyclase	84	99.0	6.5e-152
AHL46694.1	<i>msn08</i>	S.niv_ST1015_0277	Luciferase-like monooxygenase	89	99.7	1.5e-168
AHL46695.1	<i>msn09</i>	S.niv_ST1015_0278	Putative NADPH:quinone oxidoreductase	85	100.0	1.1e-157
AHL46696.1	<i>msn010</i>	S.niv_ST1015_0279	Ketoreductase	80	100.0	8,00E-114
AHL46697.1	<i>msnK3</i>	S.niv_ST1015_0280	Acyl carrier protein	86	95.5	1.7e-36
AHL46698.1	<i>msn011</i>	S.niv_ST1015_0281	Ketoreductase	87	100.0	7.4e-128
AHL46699.1	<i>msnC3</i>	S.niv_ST1015_0282	Putative bifunctional cyclase/dehydratase	82	100.0	1.5e-146
AHL46700.1	<i>msnR1</i>	S.niv_ST1015_0283	SARP regulatory protein	74	100.0	2.5e-113
AHL46701.1	<i>msnH7</i>	S.niv_ST1015_0284	Hypothetical protein	69	99.7	3.9e-112
AHL46702.1	<i>msnH8</i>	Ausente	Hypothetical protein			
AHL46703.1	<i>msnR2</i>	Sniv_1015_0285c	Regulatory protein	53	100.0	2,00E-257
AHL46704.1	<i>msnM1</i>	Ausente	Adenosylhomocysteinase			
AHL46705.1	<i>msnM2</i>	Ausente	N5,N10-methylene tetrahydrofolate reductase			
AHL46706.1	<i>msnM3</i>	Ausente	Methionine synthase			

En la Figura 5.17 se muestra los genes del *cluster* de la *msn*, la secuencia parcial del *cluster msn* en *cos2* y los genes que comparte el presunto *cluster* de la *dmsn*.

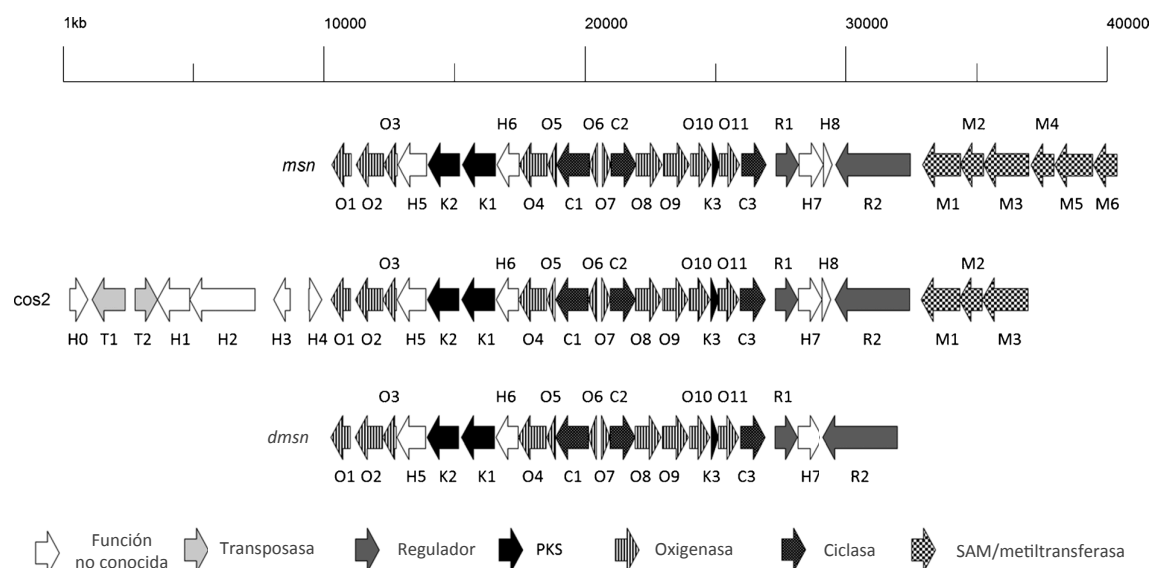


Figura 5.17. Esquema del grupo de genes que se encuentran formando parte del *cluster* de la mensacarcina (arriba), grupo de genes en la secuencia parcial reportada para el *cluster* de la mensacarcina contenido en el cósmido 2 (medio), grupo de genes predichos para el presunto *cluster* de la desmetilmensacarcina en el genoma de la cepa *S. niveiscabiei* ST1015. Modificado de Maier *et al.*, (2015).

Obtención del mutante *knockout* para los genes *dmsnK1* y *dmsnK2* de *S. niveiscabiei* ST1015

Se seleccionaron los genes *dmsnK1* y *dmsnK2* en el presunto *cluster* de la desmetilmensacarcina para construir un mutante que no fuera capaz de producir el compuesto fitotóxico desmetilmensacarcina. Estos genes codifican para policétido sintetasas y son esenciales para la construcción del esqueleto de la molécula. Para generar el mutante *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsnK1-K2* se realizó un *knockout* para los genes *dmsnK1* y *dmsnK2* de *S. niveiscabiei* ST1015. La estrategia fue insertar en el plásmido pAMR4, a cada lado del gen de resistencia de apramicina (*aac(3)IV*), las regiones flanqueantes de un tamaño de ~3 Kb de los genes que se deseaban deletar. Lo esperado era que por doble recombinación homóloga en el genoma de la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 se sustituyeran estos genes por el gen *aac(3)IV*. El esquema de trabajo se ilustra en la Figura 5.6. Se diseñaron *primers* y se amplificaron las regiones flanqueantes a los genes *dmsnK1* y *dmsnK2*. Al primer fragmento se lo denominó FU (fragmento *upstream*) y comprendió la región desde la secuencia parcial del gen *dmsnC1* hasta la secuencia parcial del gen *dmsnH6* de 3.014 pb. Al segundo fragmento se lo denominó FD (fragmento *downstream*) y comprendió la región desde una secuencia parcial del gen *dmsnK2* hasta la secuencia parcial del gen *dmsnO1* de 3.074 pb. Se amplificaron estas regiones con los *primers* MIL01/MIL02 y MIL03/MIL04, respectivamente usando como molde el ADN genómico de *S. niveiscabiei* ST1015. Entre las regiones FU y FD existe una porción génica de unos 2429pb que sería eliminada durante el evento de doble recombinación homóloga. A esa región, ubicada entre FU y FD, se la llama intergénica y se la anota como RI. Las reacciones de amplificación se

optimizaron y se obtuvieron los productos deseados utilizándose como temperaturas de *annealing* 57 y 62°C para amplificar los fragmentos FU y FD, respectivamente. Los amplicones FU y FD se clonaron en el vector pCR-Blunt II-TOPO creando pTopoFU (fragmento *upstream*) y pTopoFD (fragmento *downstream*). Para verificar la construcción pTopoFU se seleccionaron 4 colonias de transformantes las cuales crecieron en LBA con kanamicina, se realizó minipreps y posteriormente la digestión con la enzima de restricción EcoRI. Al clonar el inserto se esperaban 3 fragmentos (3519pb, 1984pb y 1030pb) Figura 5.18A. Se seleccionó el clon 1 y la secuencia del inserto FU fue confirmada por secuenciación utilizando los *primers* del vector; M13F/M13R y los *primers* internos; MIL07/MIL08/MIL15. Para verificar la construcción pTopoFD se seleccionaron 4 colonias de transformantes las cuales crecieron en LBA con kanamicina, se realizó minipreps y posteriormente la digestión con la enzima de restricción BamHI ya que de haber sido clonado el inserto se liberarían 3 fragmentos (4932pb, 1398pb y 263pb) Figura 5.18B. Se seleccionó el clon 2 y la secuencia del inserto FD fue confirmada por secuenciación con los *primers* del vector; M13F/M13R y el *primer* MIL13/MIL14 interno al fragmento.

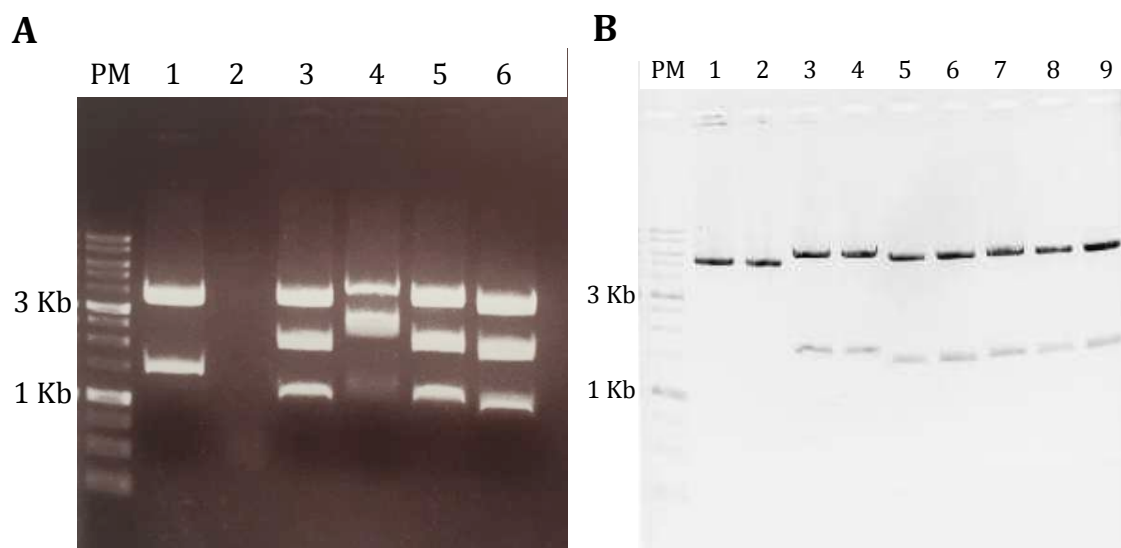


Figura 5.18. Verificación de las construcciones pTopoFU y pTopoFD. Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1,0%. **A.** Resultados de la digestión con las enzima EcoRI para los clones transformantes del vector pTopoFU: (PM); peso molecular; (1); control negativo (vector pTopo con un inserto 1500pb, (2); sin sembrar, (3-6) clones 1, 2, 3 y 4. **B.** Resultados de la digestión con las enzima BamHI para los clones transformantes de vector pTopoFD: (PM); peso molecular; (1,2); control negativo (vector pTopo con un inserto 1500pb, (3,4); clon 1, (5-6) clon 2, (7-8) clon 3, y (9) clon 4.

En una segunda etapa, se escindió el inserto FU del vector pTopoFU por doble digestión con las enzimas BamHI y MfeI y se clonó en el vector pAMR4 el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas generándose el vector pAMR4_FU. Para verificar la construcción pAMR4_FU se seleccionaron 4 colonias de transformantes las cuales crecieron en LBA con apramicina, se realizó miniprep y se amplificó utilizando los *primers* internos al FU MIL07/MIL08. Si se hubiera

clonado el fragmento FU se esperaba un amplicón de 1925 pb. Se obtuvo el producto de amplificación esperado para 3 de los 4 transformantes seleccionados (Figura 5.19A). Se seleccionó el clon 2 y se verificó el inserto mediante secuenciado utilizando los *primers* MIL01/MIL02. Luego se escindió el inserto FD del vector pTopoFD por doble digestión con las enzimas AvrII y HindIII y se clonó en el vector pAMR4_FU el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas generándose el vector pAMR4SnUD. Para verificar la construcción pAMR4SnUD se seleccionaron 4 colonias de transformantes las cuales crecieron en LBA con apramicina, se realizó minipreps y posteriormente doble digestión con la enzima de restricción AvrII y HindIII, esperando 2 fragmentos (13.5 Kb y 3 Kb) si el inserto FD se hubiera clonado correctamente (Figura 5.19B). Se seleccionó el clon 3 y se confirmó mediante secuenciación utilizando el *primer* MIL04.

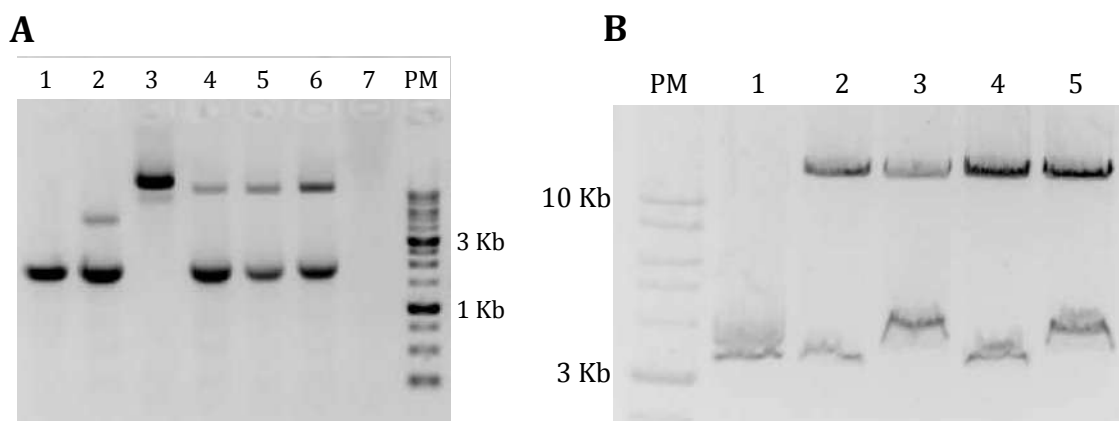


Figura 5.19. Verificación de las construcciones pAMR4_FU y pAMR4SnUD. Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1,0%. **A.** Resultados de la reacción de PCR con los *primers* MIL07/MIL08 a partir de: (1); ADN genómico cepa ST1015, (2); pTopoFU, (3-6) clones transformantes con el vector pAMR4_FU, 2, 3, 4 y 5, (7); agua, (PM); peso molecular. **B.** Resultados de la doble digestión con las enzima AvrII y HindIII para los clones transformantes de vector pAMR4SnUD: (PM); peso molecular; (1); pTopoFD, (2-5); clones 1, 2, 3 y 4.

Todos los pasos anteriores se realizaron utilizando la cepa de *E. coli* DH5 α , luego se transformó la cepa de *E.coli* ET12567 conteniendo el plásmido pUZ8002 con la construcción pAMR4SnUD. Se seleccionaron 5 transformantes que crecieron en el medio LBA con cloranfenicol, apramicina y kanamicina, se les realizó miniprep y se verificó la transformación mediante amplificación con los *primers* dirigidos al FU MIL07/MIL08 donde el producto esperado era 1925 pb (Figura 5.20).

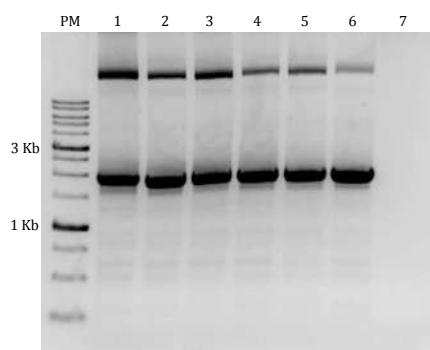


Figura 5.20. Verificación de la transformación *E.coli* ET12567 con pAMR4SnUD. Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1,0%. (PM); peso molecular. Resultados de la reacción de PCR con los primers MIL07/MIL08 a partir de: (1-4); clones 1, 2, 3 y 4, (5); pTopoFU, (6) pAMR4SnUD y (7); agua.

La construcción pAMR4SnUD se introdujo en la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 por conjugación desde la cepa de *E.coli* ET12567 conteniendo el plásmido pUZ8002. Se seleccionaron los exconjugantes que no producían el pigmento azul indigoidina el cual se produce al insertar en el cromosoma todo el vector pAMR4SnUD por simple recombinación homóloga (Figuras 5.21).

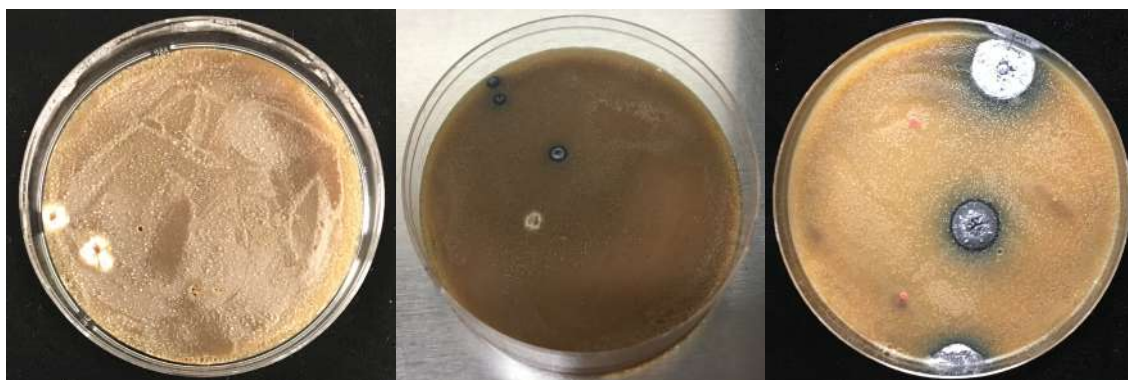


Figura 5.21. Resultados de 3 conjugaciones de *E.coli* ET12567 (pUZ8002) conteniendo pAMR4SnUD con la cepa de *S. niveiscabiei* ST1015. Se muestran placas de SFM después de 11 días de realizada la conjugación. Las colonias de *Streptomyces* que tiene halo azul son exconjugantes donde ocurrió simple recombinación homóloga y en las colonias sin halo azul se presume que hubo doble recombinación homóloga.

Verificación de mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ msnK1-K2

Se seleccionaron 5 colonias exconjugantes que no producían indigoidina. De manera de obtener cultivos monospóricos se realizó un aislamiento por estrías en medio ISP2 conteniendo apramicina. Se seleccionaron para cada exconjugantes 4 colonias aisladas, a las que se le realizó un nuevo aislamiento en medio ISP2 con apramicina. Para los 4 aislamientos de cada exconjugantes se verificó que fueran resistentes a la apramicina inoculándolos en medio ISP2 con apramicina y sensibles a kanamicina inoculándolos en medio ISP2 con kanamicina (Figura 5.22).

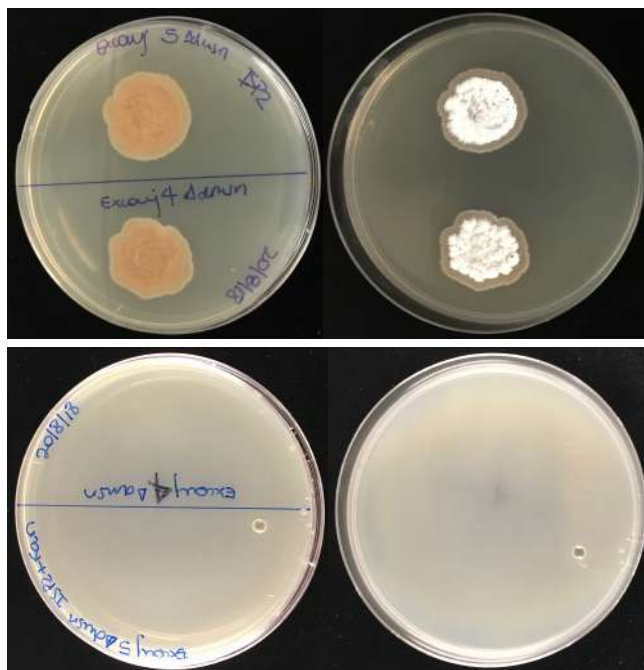


Figura 5.22. Exconjugantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2_4 y 5 inoculados en placa con medio ISP2 con Apramicina (Arriba) e inoculados en placa con medio ISP2 con Kanamicina (Abajo).

Cumplieron con las verificaciones anteriores 3 aislamientos realizados a partir del exconjugante 1 los cuales llamamos *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2_1_2, *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2_1_3 y *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2_1_4. 2 aislamientos obtenidos a partir del exconjugante 2 (*S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2_2_1, *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2_2_2), 2 aislamientos a partir del exconjugante 3 (*S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2_3_1 y *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2_3_2), un aislamiento obtenido a partir del exconjugante 4 (*S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2_4) y un aislamiento a partir del exconjugante 5 (*S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2_5). Se realizó la extracción de ADN de los mismos y se verificaron mediante varias reacciones de PCR. En la Figura 5.23 se muestra la ubicación de los *primers* en el *cluster* de *dmsn* para verificar las mutaciones en el gen *dmsnK1* y secuencia parcial del gen *dmsnK2* generando los mutantes *knockout* *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2.

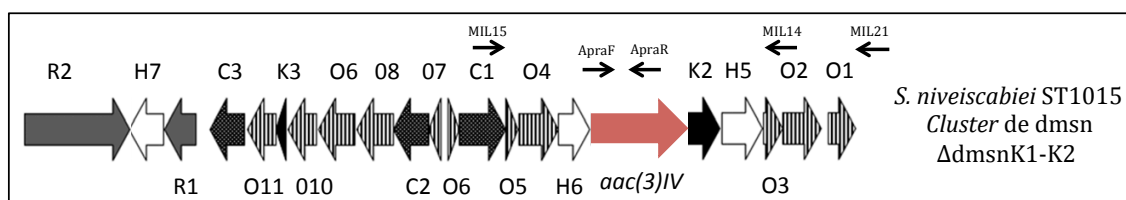


Figura 5.23. Esquema del presunto *cluster* de *dmsn* para los mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2. Arriba se señalan con flechas negras la ubicación de los *primers* utilizados para la confirmación de la mutación. Modificado de Maier et al., (2015).

Se realizó confirmación de los mutantes *knockout* en los que por doble recombinación homóloga se espera se sustituyera el gen de resistencia a la apramicina *aac3(IV)*, por el gen *dmsnK1* y secuencia parcial del gen *dmsnK2*. Se realizaron reacciones de PCR utilizando varios pares de primers. Si la mutación fuera la esperada con los *primers* MIL15/ApraR, se obtendría un producto de amplificación de 2.864 pb (Figura 5.24A), con los *primers* MIL14/ApraF el tamaño del producto de amplificación esperado es de 2.776 pb (Figura 5.24A), con el par de *primers* MIL15/MIL14 el tamaño del producto de amplificación sería de 5.392 pb (Figura 5.24B), con los *primers* *dmsnK1F/dmsnK1R* que amplifican el gen *dmsnK1* no se espera producto de amplificación (Figura 5.24C) y con el par de primers ApraF/MIL21 se esperaba un producto de amplificación de un tamaño de 4.179 pb (Figura 5.24D). Los resultados de la verificación de los mutantes se muestran en la Tabla 5.12.

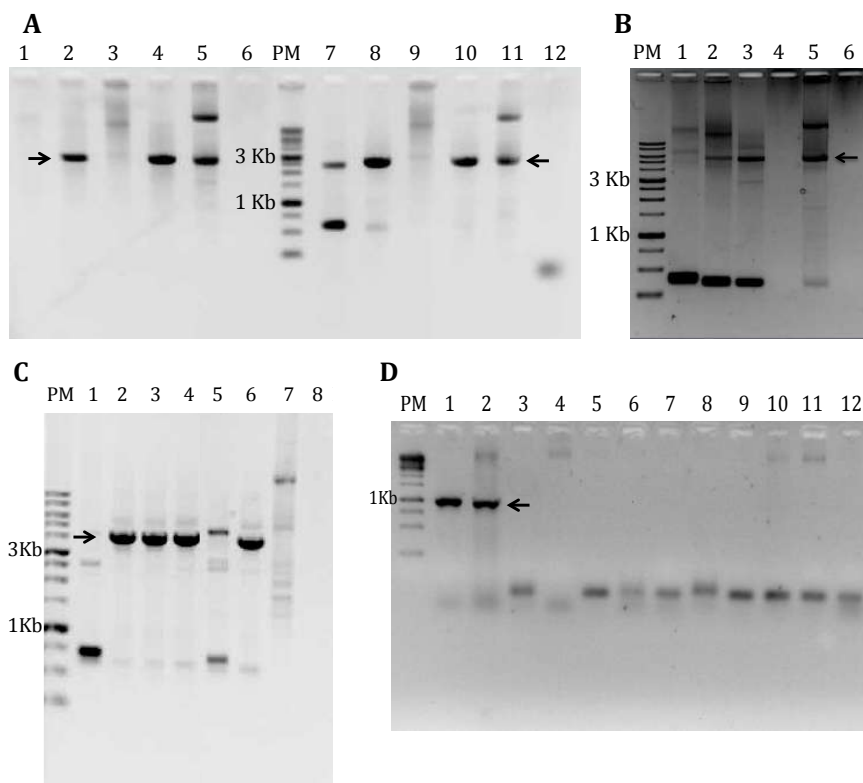


Figura 5.24. Verificación de los mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2. Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1,0%. **A.** Resultados de la reacción de PCR con los *primers* MIL15/ApraR del carril1-6 (ST1015 wt, mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2 1_2, 1_3, 1_4, vector pAMR4SnUD, agua). PM (peso molecular). Resultados de la reacción de PCR con los *primers* MIL14/ApraF del carril 7-12 mismas muestras que para la PCR anterior. **B.** Resultados de la reacción de PCR con los *primers* MIL15/MIL14. PM, Peso molecular y del carril1-6 (mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2 1_2, 1_3, 1_4, ST1015 wt, vector pAMR4SnUD, agua). **C.** Resultados de la reacción de PCR con los *primers* ApraF/MIL21. PM, Peso molecular, del carril1-8 (ST1015 wt, mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2 1_2, 1_3, 1_4, 4, 5, vector pAMR4SnUD, agua). **D.** Resultados de la reacción de PCR con los *primers* dmsnK1F/dmsnK1R. PM, Peso molecular, del carril1-12 (1 y 2 ST1015 wt, 3-12 mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2 1_2, 1_3, 1_4, 2_1, 2_2, 3_1, 3_2, 4, 5, agua).

Tabla 5.12 Resultados de la verificación de los mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2.

Mutantes <i>S. niveiscabiei</i> ST1015 Δ dmsnK1-K2	Presencia del fragmento FU y gen de resistencia	Presencia del fragmento FD y gen de resistencia	Presencia de los dos fragmentos y el gen de resistencia	Recombinación en el lugar correcto del cromosoma de ST1015	Ausencia del gen <i>dmsnK1</i>
	MIL15/ApraR	MIL14/ApraF	MIL14/MIL15	MIL21/ApraF	dmsnK1F/dmsnK1R
1_2	✓	✓	✓	✓	✓
1_3	✓	✓	✓	✓	✓
1_4	✓	✓	✓	✓	✓
2_1	ND	ND	ND	ND	✓
2_2	ND	ND	ND	ND	✓
3_1	ND	ND	ND	ND	✓
3_2	ND	ND	ND	ND	✓
4_1	✗	✓	ND	✗	✓
5_1	✗	✓	ND	✓	✓

✓: Resultado esperado; ✗: Resultado no esperado; ND: no determinado.

Evaluación de los mutantes de *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2

Test de patogenicidad en rabanito de las cepas

Se evaluaron mediante el ensayo de patogenicidad en rabanito 6 mutantes de *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2 (1_2, 1_4, 2_1, 3_1, 4 y 5), como control positivo la cepa de ST1015 *wild type* (WT) y como control negativo agua estéril. Para los mismos se realizó el test de patogenicidad donde no se observó diferencias con la cepa ST1015 *wild type*. En la Figura 5.25 se muestran los resultados del test de patogenicidad en rabanito, donde la actividad patogénica se manifiesta al comparar el crecimiento de una plántula de rabanito expuesta a las cepas de *Streptomyces* con potencial patógeno, con un control negativo. Los mutantes comparados con la cepa ST1015 mantienen el fenotipo patogénico.

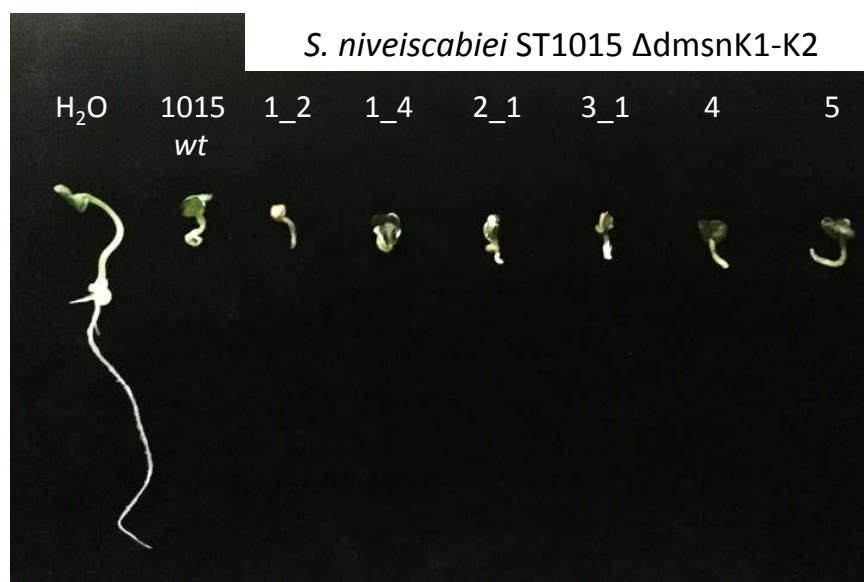


Figura 5.25. Plántulas de rabanito luego de su inoculación con cepas y agua como control (-).

Test de bioactividad en rabanito de los sobrenadantes de los mutantes en medio OBB

De la misma forma que con la suspensión de células, se llevaron a cabo los ensayos de bioactividad con los sobrenadantes obtenidos en medio OBB de las cepas de 6 mutantes de *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2 (1_2, 1_4, 2_1, 3_1, 4 y 5) y como control positivo la cepa de ST1015 WT. Como control negativo se utilizó medio OBB y agua. En la Figura 5.26 se observan imágenes de los resultados de los ensayos. Los sobrenadantes de los mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2 no fueron bioactivos en las plántulas de rabanito comparados con los controles, por lo tanto no están presentes en el medio ensayado compuestos fitotóxicos.

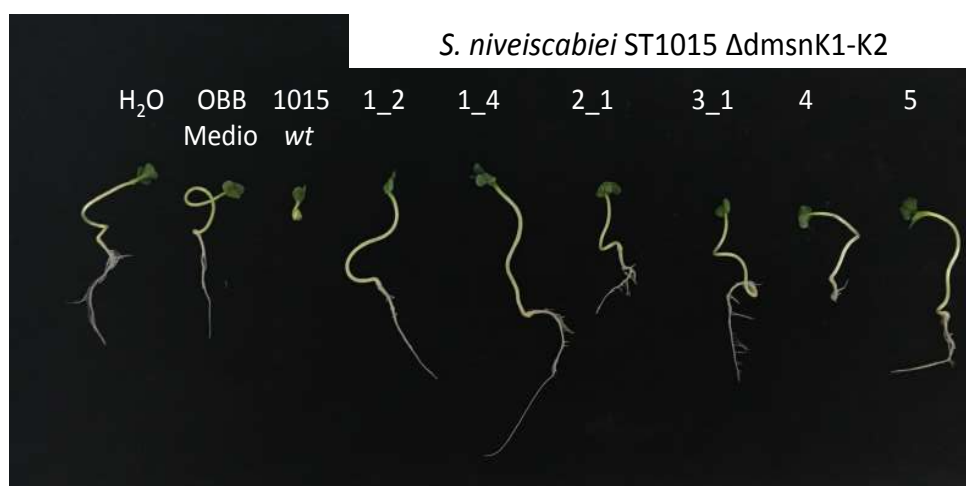


Figura 5.26. Plántulas de rabanito luego de su inoculación con sobrenadantes de cultivos de cepas en medio OBB, como controles negativos se utilizó medio OBB y agua.

Análisis del perfil metabolómico de los sobrenadantes de los mutantes en medio OBB

Se analizaron los perfiles metabolómicos de los sobrenadantes en el medio OBB para las cepas de 6 mutantes de *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta dmsnK1-K2$ (1_2, 1_4, 2_1, 3_1, 4 y 5) y como control positivo la cepa de ST1015 WT. Se tomó como control negativo el medio de cultivo OBB sin inocular. En la Figura 5.27 se muestran los espectros de ^1H RMN. Lo que se puede observar a grandes rasgos es que la acumulación en las frecuencias del rango 4.5-3.5 se observan picos correspondientes a los azúcares del medio de cultivo. En la zona de los aromáticos con desplazamientos en el rango de 6.5-8.5 se observan picos para la cepa ST1015 WT y los mutantes analizados comparados con el control del medio OBB. Para visualizar si se encuentra la desmetilensacarcina en los sobrenadantes se muestra el espectro en algunos rangos donde se presentan picos característicos de este compuesto. En el espectro recortado (Figura 5.28) se pueden observar los picos característicos de la desmetilensacarcina en los desplazamientos 7.6 ppm (doblete), 7.46 ppm (triplete), 7.34 ppm (doblete), 5.76 ppm (singulete), 1.39 ppm (doblete) y en 0.96 ppm (doblete) para el sobrenadante de la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 WT, para los mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta dmsnK1-K2$ no se observan los picos característicos de la desmetilensacarcina en los sobrenadantes.

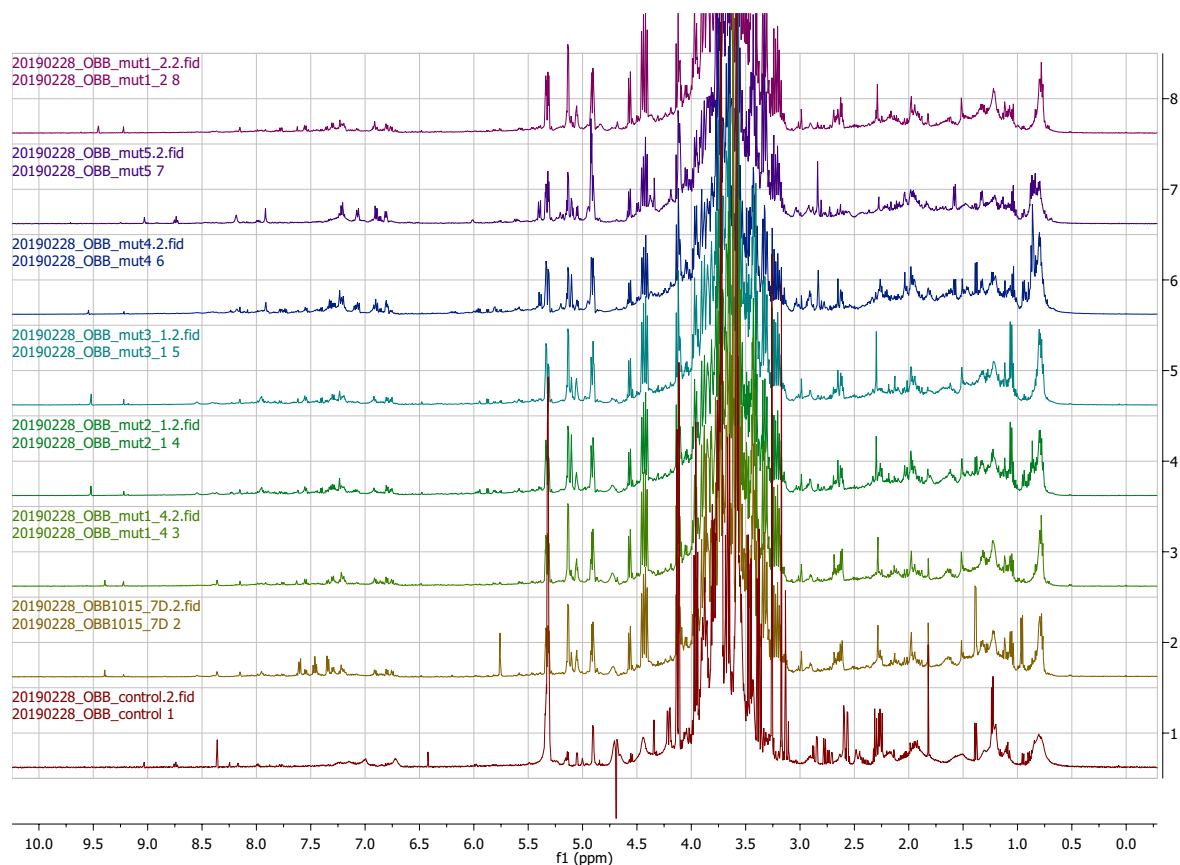


Figura 5.27. Espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en DO_2 . Desde abajo se muestran los espectros del blanco (medio OBB sin inocular), los sobrenadantes de las cepa ST1015wt, mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta\text{dmsnK1-K2}$ (1_2, 1_4, 2_1, 3_1, 4 y 5) de 7 días post inoculación en medio OBB. En el eje de las x se muestran los desplazamientos químicos en ppm.

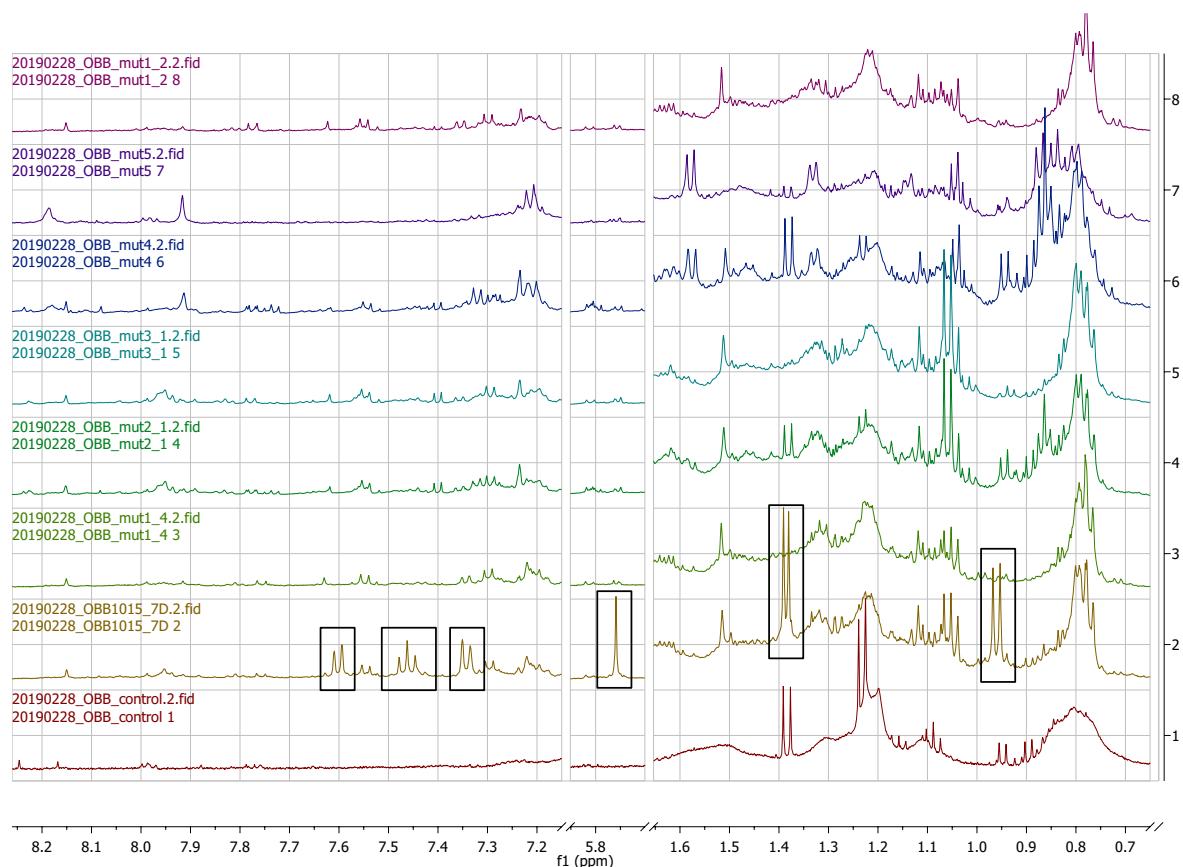


Figura 5.28. Espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en DO_2 recortados en rangos. Desde abajo se muestran los espectros del blanco (medio OBB sin inocular), los sobrenadantes de las cepa ST1015wt, mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta\text{dmsnK1-K2}$ (1_2, 1_4, 2_1, 3_1, 4 y 5) de 7 días post inoculación en medio OBB. Los picos característicos de la dmsn se encuentran recuadrados. En el eje de las x se muestran los desplazamientos químicos en ppm.

Complementación genética del mutante *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta\text{dmsnK1-K2}$

El mutante complementario ST1015 $\Delta\text{dmsnK1-K2}$ -C debe ser capaz de producir nuevamente el compuesto desmetilmensacarcina. Para su construcción se insertan en el genoma del mutante *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta\text{dmsnK1-K2}$ los genes que fueron mutados mediante el vector de expresión e integrativo pAU3-45-cdmsn. En una primera etapa se generó el vector de expresión integrativo pAU3-45-ermEp. Para ello se amplificó la región del promotor *ermE* con los *primers* imf33/imf158 utilizando como molde el ADN del vector pIJ8641. Se obtuvo un producto de amplificación de 398 pb que fue clonado utilizando el pCR®-Blunt IITOP0, generando el vector pTopo_ermE. Para verificar la construcción se seleccionaron 4 clones transformantes los cuales crecieron en LBA con kanamicina a los cuales se les realizó amplificación mediante PCR de colonia con los *primers* imf33/imf158 obteniendo para los cuatro clones el producto del tamaño esperado de 398pb (Figura 5.29). Se seleccionó el clon 2, se realizó miniprep y se verificó mediante secuenciado con los *primers* M13F.

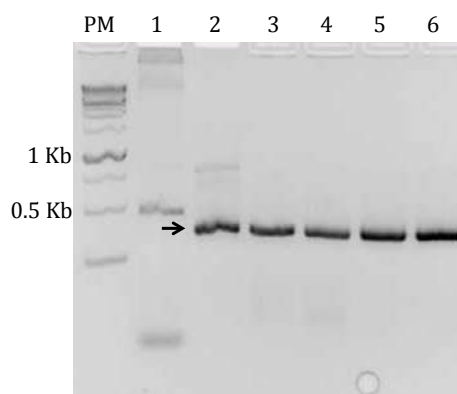


Figura 5.29. Verificación de la construcción pTopo_ermE. Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1,0%. Resultados de la reacción de PCR con los primers imf33/imf158 a partir de: (1); pAU3-45, (2); pIJ8641, (3-6) clones transformantes con el vector pTopo_ermE, 1, 2, 3 y 4, (PM); peso molecular.

En una segunda etapa, se escindió el inserto *ermE* del vector pTopo_ermE mediante digestión con la enzima BamHI y se clonó en el vector pAU3-45 el cual fue previamente digerido con la misma enzima generándose el vector pAU3-45-ermEp. Para verificar la construcción pAU3-45-ermEp se seleccionaron 10 colonias transformantes las cuales se crecieron en LBA con apramicina. Se amplificó mediante PCR a partir de colonia. Se utilizaron los *primers* imf33 el cual es interno al fragmento y el *primer* pSETrev que se encuentra en el vector del lado izquierdo al sitio de clonado. Si el promotor se insertó correctamente se espera un amplicón de ~400 pb. Se obtuvo el producto de amplificación esperado para 5 de los 10 clones transformantes seleccionados (Figura 5.30). Se seleccionó el clon 3, se realizó miniprep y se verificó la dirección del promotor *ermE* mediante secuenciado utilizando el *primer* del vector pSETforw.

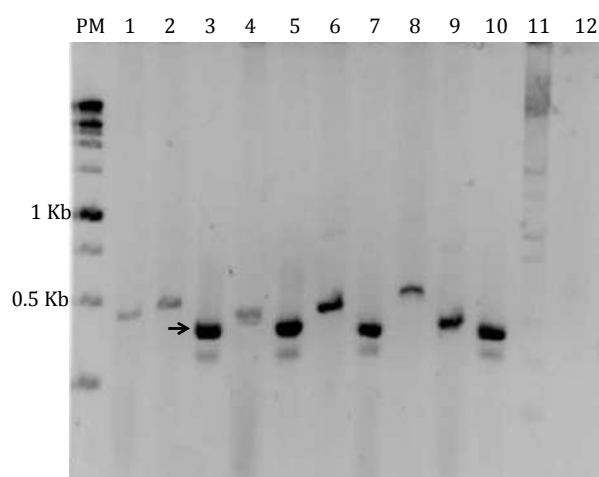


Figura 5.30. Verificación de la construcción pAU3-45-ermEp. Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1,0%. (PM); peso molecular. Resultados de la reacción de PCR con los primers imf33/pSETrev a partir de: (1-10); clones transformantes con el vector pAU3-45-ermEp, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, (11); pAU3-45, (12); agua.

Se amplificó mediante PCR utilizando como molde ADN de *S. niveiscabiei* ST1015 el fragmento de 6.182pb que contiene la región desde el gen *dmsnK1* hasta el gen *dmsn01* del *cluster* de la desmetilmensacarcina utilizando los *primers* MIL20/MIL21 los cuales poseen el sitio de restricción para la enzima XbaI. Dicho fragmento se clonó en el vector pCR-Blunt II-TOPO creando pTopo_cdmsn. Se verificó la construcción seleccionando 4 clones transformantes, para los cuales se les realizó miniprep y digestión con la enzima XbaI. Se confirmó la presencia de los fragmentos esperados de aproximadamente 3.5kb y 6.2 Kb para los cuatro clones. Se purificó la banda de ~6.2kb correspondiente al fragmento cdmsn y se clonó en el vector pAU3-45-ermEp el cual fue previamente digerido con la enzima XbaI y desfosforilado con la enzima CIP, generándose el vector pAU3-45-cdmsn. Para verificar la construcción y la correcta dirección del fragmento cdmsn se realizó PCR a partir de la colonia de 10 clones transformantes crecidos en LBA con apramicina utilizando los *primers* pSETrev externo al fragmento y el primer interno MIL13. De los 10 clones transformantes para 2 se obtuvieron productos del tamaño esperado 2.3 kb (Figura 5.31). Se seleccionó el clon 6, se le realizó miniprep y secuenciado con los primers pSETrev/pSETforw verificándose la correcta dirección del promotor *ermE* y la secuencia cdmsn que contiene los genes a ser expresados.

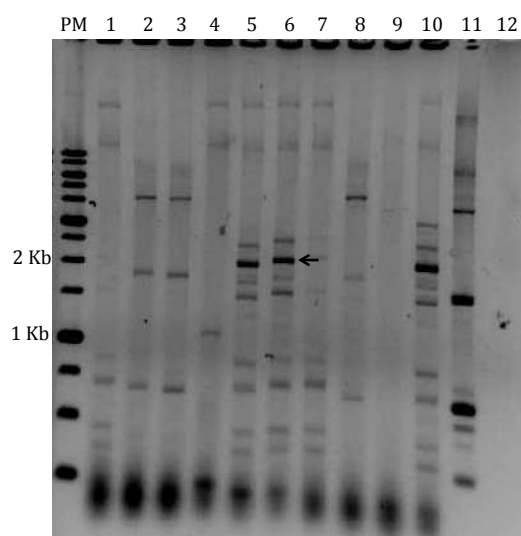


Figura 5.31. Verificación de la construcción pAU3-45-cdmsn. Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1.0%. (PM); peso molecular. Resultados de la reacción de PCR con los primers pSETrev/MIL13 a partir de: (1-10); clones transformantes con el vector pAU3-45-cdmsn, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, (11) ; pAU3-45-ermEp, (12); agua.

Las manipulaciones previas se realizaron utilizando la cepa de *E. coli* DH5 α . Luego se realizaron las transformaciones de *E.coli* ET12567(pUZ8002) con el plásmido pAU3-45-cdmsn y con el plásmido pAU3-45. La transformación de *E.coli* ET12567(pUZ8002) con el vector pAU3-45-cdmsn se confirmó mediante la selección de 4 clones transformantes a los que se les realizó amplificación con los *primers* pSETrev/MIL13. Se obtuvo el producto del tamaño esperado 2.3

kb para el clon 4, el cual fue seleccionado para realizar la conjugación con la cepa mutante *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2_1_4, que se denominó *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2.

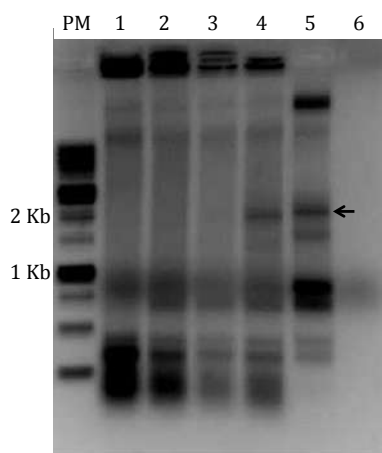


Figura 5.32 Verificación de la transformación de pAU3-45-cdmsn en *E.coli* ET12567(pUZ8002). Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1.0%. (PM); peso molecular. Resultados de la reacción de PCR con los primers pSETrev/MIL13 a partir de: (1-4); clones transformantes con el vector pAU3-45-cdmsn, 1, 2, 3 y 4 (5); pAU3-45-cdmsn, (6); agua.

Posteriormente se realizaron las conjugaciones en el mutante *knockout* seleccionado *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2 y *E.coli* ET12567(pUZ8002) con el plásmido pAU3-45-cdmsn y con *E.coli* ET12567(pUZ8002) conteniendo el plásmido pAU3-45.

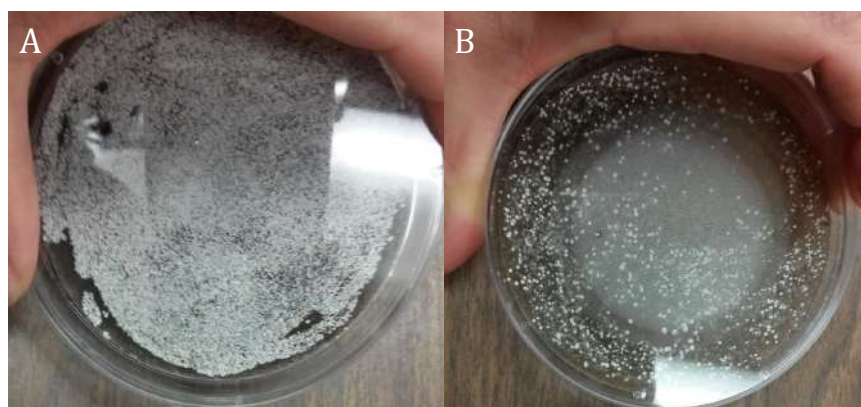


Figura 5.33 Resultados de conjugaciones de la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2 con: A. *E.coli* ET12567 (pUZ8002) conteniendo el vector pAU3-45. B. *E.coli* ET12567 (pUZ8002) conteniendo el vector pAU3-45-cdmsn. Se muestran placas de SFM con apramicina, ácido nalidixico y tiostreptona después de 11 días realizada la conjugación.

Se seleccionaron los exconjugantes de *Streptomyces* que poseen la capacidad de crecer en apramicina y tiostreptona. Se seleccionaron 3 exconjugantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2 que integraron el vector pAU3-45-cdmsn en su genomas. Estos se denominaron *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2-C_N, ST1015 Δ dmsnK1-K2-C_O y ST1015 Δ dmsnK1-K2-C_P. Se realizó extracción de ADN de los mutantes complementarios nombrados anteriormente, para los cuales

se confirmó la inserción del vector en el genoma mediante PCR utilizando *primers* dirigidos al gen *dmsnK1* (*dmsnK1F/dmsnK1R*). Se confirmó para los tres exconjugantes que el producto de amplificación era del tamaño esperado 971 pb (Figura 5.34B). Además, la amplificación con los *primers* dirigidos al vector pSETforw/pSETrev no dio lugar a ningún producto tal como se esperaba (Figura 5.34A). Se seleccionaron 4 exconjugantes de *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsnK1*-K2 que integraron el vector pAU3-45 en su genomas. Estos se denominaron *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsnK1*-K2-pAU3-45_E, ST1015 Δ *dmsnK1*-K2-pAU3-45_F, ST1015 Δ *dmsnK1*-K2-pAU3-45_G y ST1015 Δ *dmsnK1*-K2-pAU3-45_H. Se realizó extracción de ADN de los exconjugantes nombrados anteriormente, para los cuales se confirmó la inserción del vector pAU3-45 en el genoma mediante PCR utilizando *primers* dirigidos al gen *dmsnK1* (*dmsnK1F/dmsnK1R*). Para los cuatro exconjugantes se observó que no hubo productos de amplificación lo cual era lo esperado (Figura 5.34B). Paralelamente, se observó producto del tamaño esperado 148 pb cuando se realizó la amplificación con los *primers* dirigidos al vector pSETforw/pSETrev (Figura 5.34A).

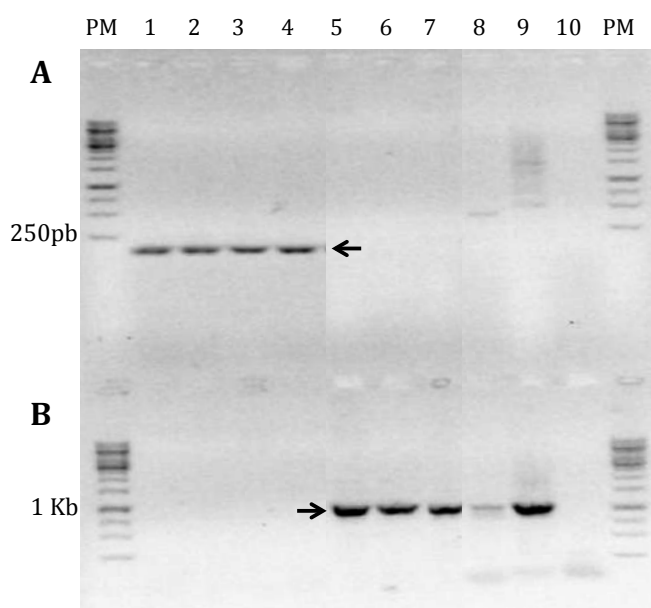


Figura 5.34. Verificación de los mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsnK1*-K2-C y *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsnK1*-K2-pAU3-45. Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1.0%. **A.** Resultados de la reacción de PCR con los *primers* pSETforw/pSETrev. **B.** Resultados de la reacción de PCR con los *primers* *dmsnK1F/dmsnK1R*. PM (peso molecular), del carril 1-4 (mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsnK1*-K2-pAU3-45_E, F, G y H), del carril 5-7 (mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsnK1*-K2-C_N, O y P), 8 (*S. niveiscabiei* ST1015 wild type), 9 (pAU3-45-cdmsn), 10 (agua), PM (peso molecular).

Evaluación de los mutantes y cepa *wild type* de *S. niveiscabiei* ST1015

Test de patogenicidad en rabanito de las cepas

Se evaluaron mediante el ensayo de patogenicidad en rabanito los mutantes de *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsn*K1-K2 (mutante 1_4), *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsn*K1-K2-C (mutantes N, O y P), *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsn*K1-K2-pAU3-45 (mutante G) y la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 WT. Para los mutantes no se observó diferencias con la cepa ST1015 WT. En la Figura 5.35 se muestran los resultados del test de patogenicidad en rabanito, donde la actividad patogénica se manifiesta al comparar el crecimiento de una plántula de rabanito expuesta a las cepas de *Streptomyces* con potencial patogénico con un control negativo. Los mutantes comparados con la cepa ST1015 mantienen el fenotipo patogénico.

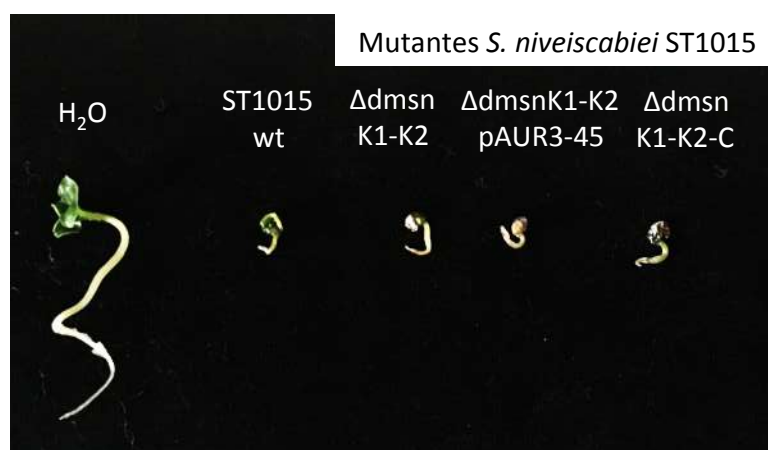


Figura 5.35. Plántulas de rabanito luego de su inoculación con cepas y agua como control (-).

Test de bioactividad en rabanito de los sobrenadantes

De la misma forma que con la suspensión de células, se llevaron a cabo los ensayos de bioactividad con los sobrenadantes obtenidos en medio OBB de las cepas *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsn*K1-K2 (mutante 1_4), *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsn*K1-K2-C (mutantes N, O y P), *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsn*K1-K2-pAU3-45 (mutante G) y la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 WT. Como control negativo se utilizó medio OBB y agua. En la Figura 5.36 se observan imágenes de los resultados de los ensayos. Los sobrenadantes del mutante *Knockout S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsn*K1-K2, mutante control *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsn*K1-K2-pAU3-45 y los mutantes a los que se les insertó el complemento de la mutación *S. niveiscabiei* ST1015 Δ *dmsn*K1-K2-C (mutantes O y P), no fueron bioactivos en las plántulas de rabanito por lo tanto no están produciendo compuestos fitotóxicos. Al contrario el sobrenadante del mutante complementario

Δ dmsnK1-K2-C (mutante N) se mostro fitotóxico como la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 WT, lo que está indicando que se complementó la mutación realizada.



Figura 5.36. Plántulas de rabanito luego de su inoculación con sobrenadantes de cultivos de cepas en medio OBB, como control negativos se utilizo medio OBB.

Análisis del perfil metabolómico de los sobrenadantes

Se analizaron los perfiles metabolómicos de los sobrenadantes en el medio OBB de las cepas *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2 (mutante 1_4), *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2-C (mutantes N, O y P), *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2-pAU3-45 (mutante G) y la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 WT. Se utilizó como control negativo el medio de cultivo OBB sin inocular. En la Figura 5.37 se muestran los espectros de ^1H RMN apilados para las distintas cepas. Lo que podemos observar a grandes rasgos es que la acumulación en las frecuencias del rango 4.5-3.5 se observan picos correspondientes a los azúcares del medio de cultivo. En la zona de los aromáticos con desplazamientos en el rango de 6.5-8.5 se observan picos para la cepa ST1015 WT y los mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2-C_O y *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2-C_N comparados con el control del medio OBB. Para visualizar si se encuentra la desmetilensacarcina en los sobrenadantes se muestra el espectro en algunos rangos donde se presentan picos característicos de la misma. En el espectro recortado (Figura 5.38) se puede observar los picos característicos de la desmetilensacarcina en los desplazamientos 7.6 ppm (doblete), 7.46 ppm (triplete), 7.34 ppm (doblete), 5.76 ppm (singulete), 1.39 ppm (doblete) y en 0.96 ppm (doblete) para el sobrenadante de la cepa *S. niveiscabiei* ST1015 *wild type* y para el mutante donde se complemento la mutación *S. niveiscabiei* ST1015 Δ dmsnK1-K2-C_N. Para los demás mutantes analizados no se observan los picos característicos de la desmetilensacarcina en sus sobrenadantes.

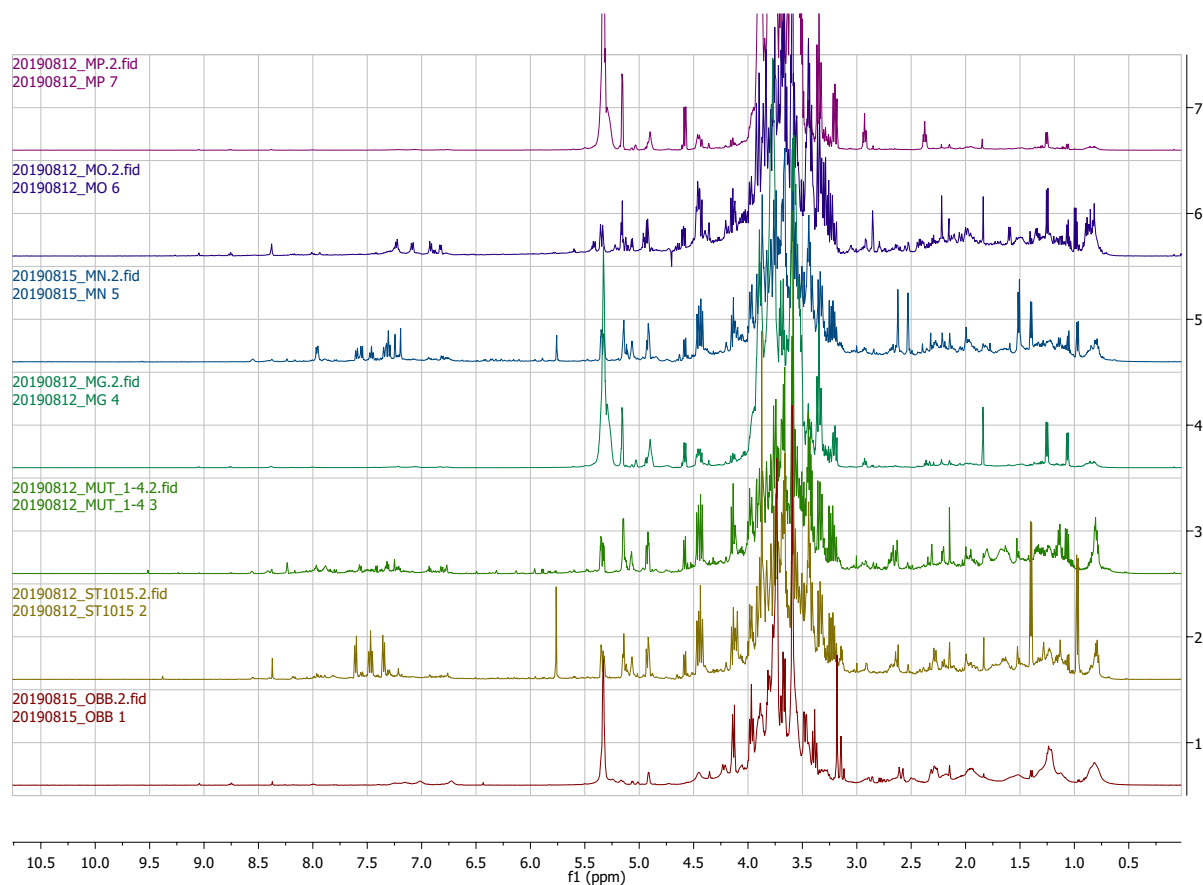


Figura 5.37 Espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en DO_2 . Desde abajo se muestran los espectros del blanco (medio OBB sin inocular), los sobrenadantes de las cepa ST1015wt, mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta\text{dmsnK1-K2}$, *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta\text{dmsnK1-K2-pAU3-45}$ (mutante G), *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta\text{dmsnK1-K2-C}$ (mutantes N, O y P) de 7 días post inoculación en medio OBB. En el eje de las x se muestran los desplazamientos químicos en ppm.

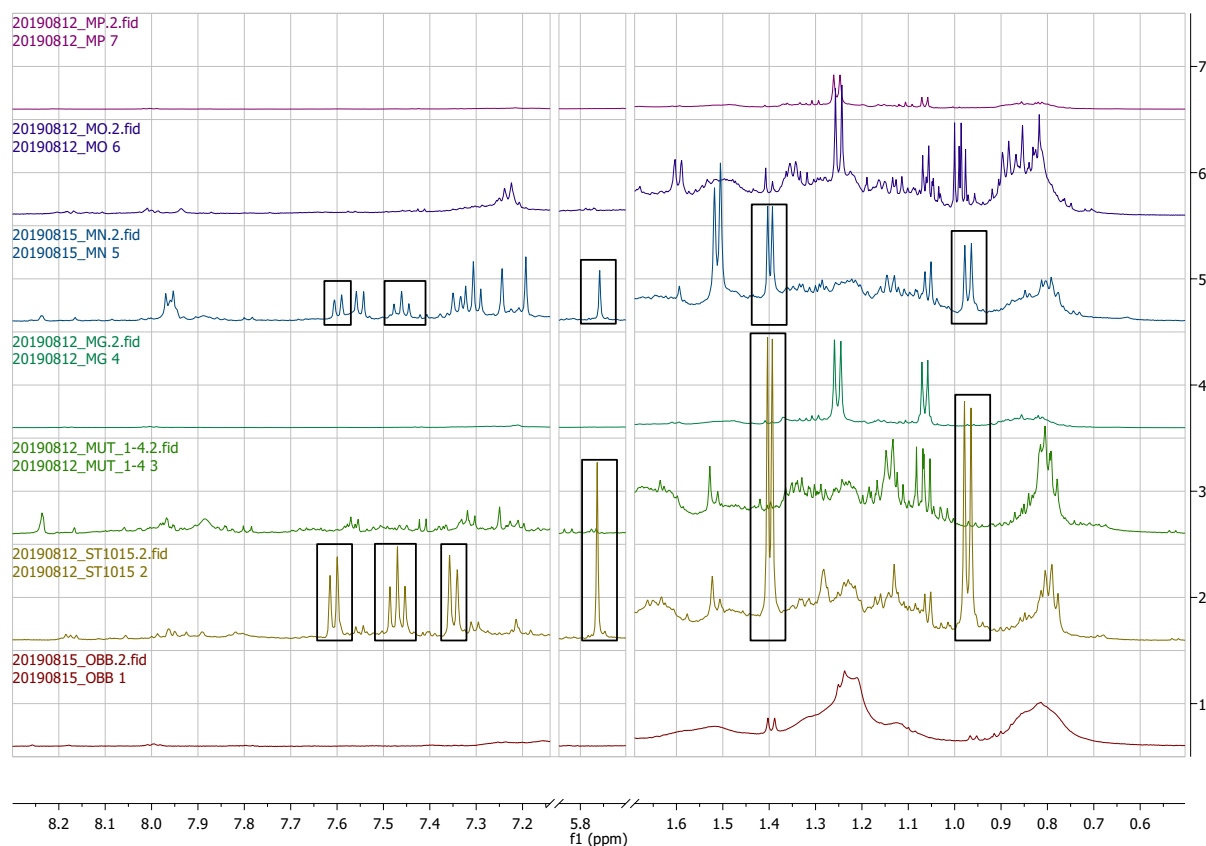


Figura 5.38 Espectros apilados de ^1H RMN (500 MHz) de sobrenadantes en DO_2 recortados en rangos. Desde abajo se muestran los espectros del blanco (medio OBB sin inocular), los sobrenadantes de las cepa ST1015wt, mutantes *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta\text{dmsnK1-K2}$, *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta\text{dmsnK1-K2-pAU3-45}$ (mutante G), *S. niveiscabiei* ST1015 $\Delta\text{dmsnK1-K2-C}$ (mutantes N, O y P) de 7 días post inoculación en medio OBB. En el eje de las x se muestran los desplazamientos químicos en ppm.

Búsqueda, identificación, y anotación del presunto *cluster* de biosíntesis para la desmetilmensacarcina en cepas de *S. niveiscabiei* y *S. acidiscabies*

Se utilizó el software antiSMASH para el análisis de las secuencias genómicas de las cepas *S. niveiscabiei* ST1015, ST1020 y *S. acidiscabies* ST105 y los genomas de la base de datos pertenecientes a las cepas *S. niveiscabiei* NRRL B-24457 y 9 cepas de *S. acidiscabies* (84-104, 85-06, 98-48, 98-49, a2, a10, FL01 y NCPPB 4445). Se observó que todas las cepas con excepción de la cepa *S. acidiscabies* NCPPB 4445 poseen similitud con el *cluster* de mensacarcina (Tabla 5.13). Para la cepas de *S. niveiscabiei* se conservan más del 50% de los genes del *cluster* reportado. De las 10 cepas de *S. acidiscabies* analizadas 5 poseen el 11% de los genes (ST105, 85-06, 98-48, 98-49 y a2), 3 cepas (84-104 a10 y FL01) poseen el 84% de los genes y la cepa NCPPB 4445 no posee similitud con el *cluster* de msn reportado.

Tabla 5.13. Resultados de antiSMASH para el *cluster* de mensacarcina de los diferentes genomas analizados.

Especie	Cepa	Cluster de Mensacarcina	
		Contig	Similitud %
<i>S. niveiscabiei</i>	ST1015	GC*	84
	ST1020	198	53
	NRRL B-24457	1106	57
<i>S. acidiscabies</i>	ST105	166	11
	84-104	206	84
	85-06	885	11
	98-48	601	11
	98-49	46	11
	a2	18	84
	a10	9	84
	FL01	321	11
	NCPPB 445		0

*GC: Genoma completo

Análisis del presunto *cluster* de dmsn para la cepa ST1020

Mediante el software antiSMASH, y la comparación del genoma de la cepa ST1020 en forma de borrador con la secuencia parcial del *cluster* de la mensacarcina reportado y utilizando los programas ABACAS y BLAST, se determinó que *contigs* del genoma de la cepa ST1020 tienen secuencias con alta similitud al *cluster* de la mensacarcina previamente reportado. Según el programa de ABACAS el presunto *cluster* de la dmsn esta formado por 3 *contigs* que se ordenan de la siguiente forma: 198, 476 y 507 (Figura 5.39).

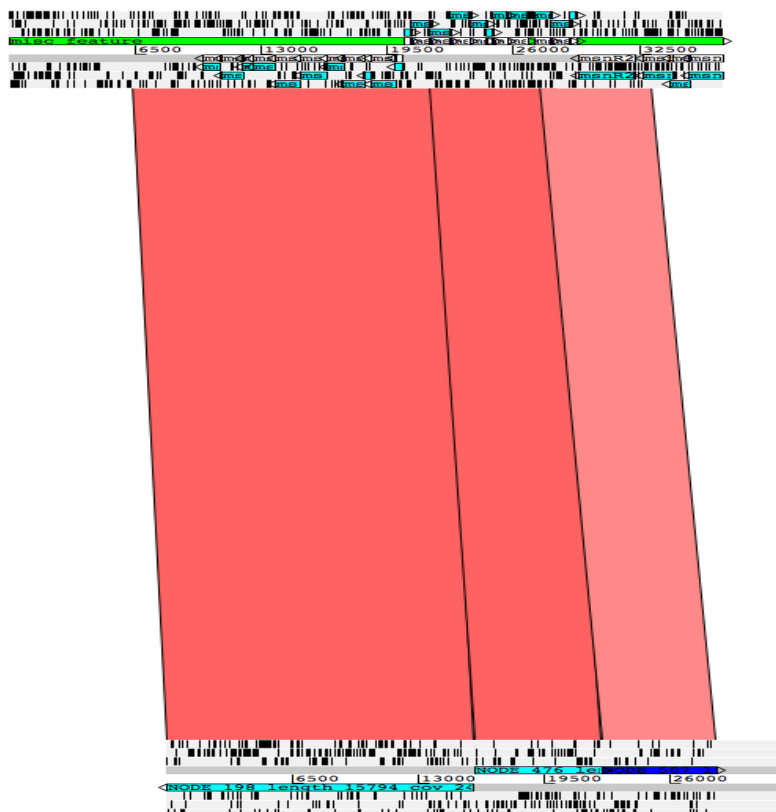


Figura 5.39. Resultados de la comparación del cluster de mensacarina de *S. bottropensis* Goe C4/4 (arriba) con el genoma de *S. niveiscabiei* ST1020 (abajo) mediante ABACAS y visualizados en el programa ACT. Los NODE corresponden al número de *contigs* del genoma.

Mediante la comparación por BLAST de la secuencia del potencial *cluster* de la dmsn en la cepa ST1015 con la pseudomolécula del potencial *cluster* en la cepa ST1020 generada mediante ABACAS con los tres *contigs* nombrados anteriormente se observó que tienen una similitud de secuencia del 99.9% (Tabla 5.14). Los resultados del BLAST y las pseudomoléculas anotadas del *cluster* dmsn para ambas cepas se visualizan en la Figura 5.40. El presunto *cluster* para la cepa ST1020 posee todos los genes que se encuentran en el potencial *cluster* dmsn de la cepa ST1015 con la excepción de los genes *dmsn08* y *dmsnH6*, los cuales se encontrarían en la zona de unión de los *clusters* 198-476 y 476-507 respectivamente.

Tabla 5.14. Resultados de la comparación de la secuencia del potencial *cluster* de dmsn de *S. niveiviscabiei* ST1015 con la secuencia genómica de ST1020 mediante la herramienta BLAST.

Secuencia de Cluster de dmsn ST1015 (pb)		Secuencia de presunto Cluster de dmsn ST1020 (pb)		Largo de alineamiento	Mismatch	Gaps	% Identidad	e-Value
Desde	Hasta	Desde	Hasta					
1	15761	34	15794	15761	2	0	99.99	0.0
15763	21635	16510	22382	5873	2	0	99.97	0.0
21642	27439	22482	28279	5798	1	0	99.98	0.0

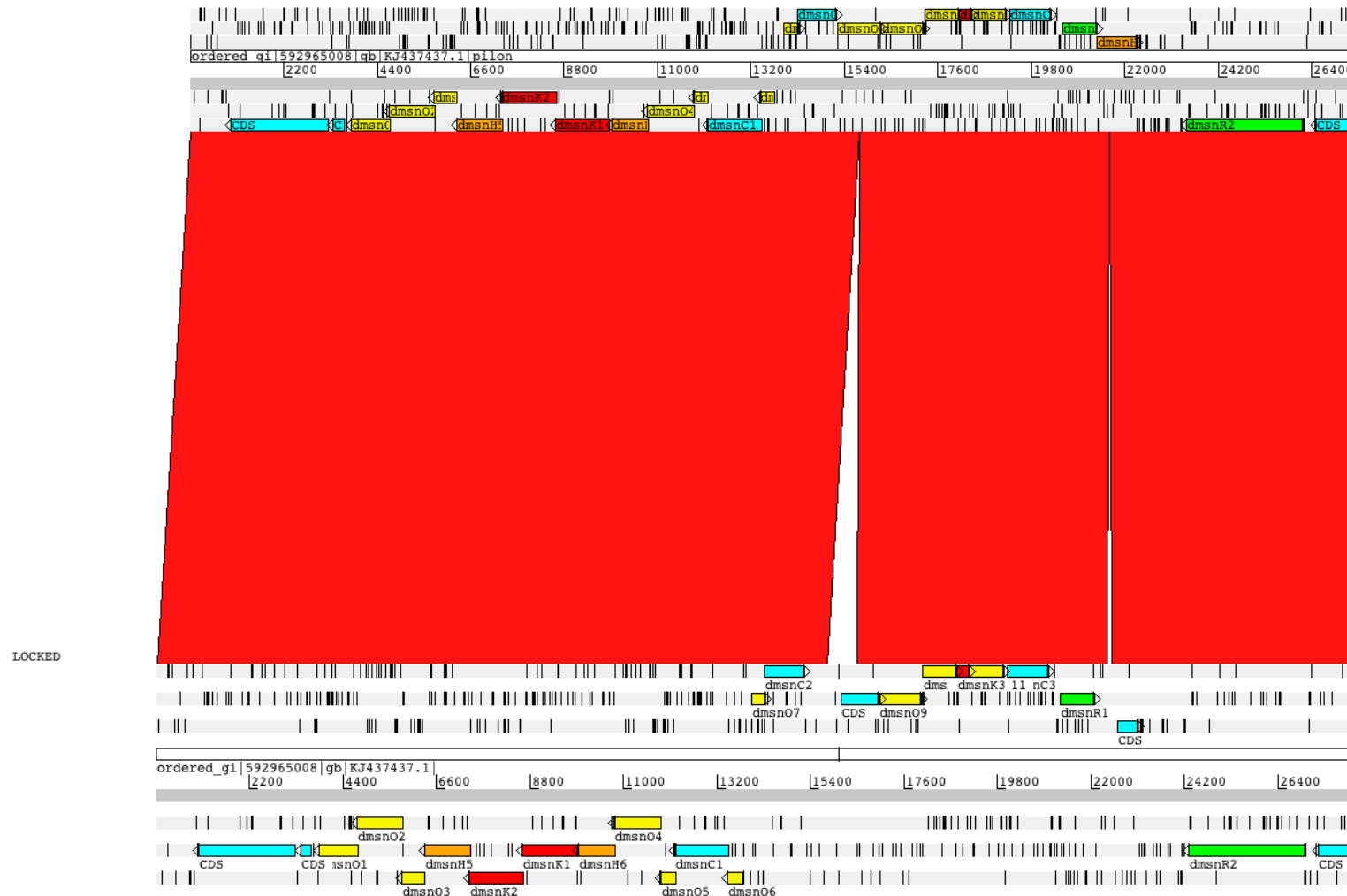


Figura 5.40. Resultados de la comparación del potencial *cluster* de dmsn de *S. niveiviscabiei* ST1015 (arriba) con el presunto *cluster* de dmsn de *S. niveiviscabiei* ST1020 (abajo) mediante BLAST y visualizados en el programa ACT.

Análisis del presunto *cluster* de *dmsn* para la cepa ST105

Mediante el software antiSMASH, y la comparación del genoma de la cepa ST105 en forma de borrador con la secuencia parcial del *cluster* de la mensacarcina reportado utilizando los programas ABACAS y BLAST se determinó qué *contigs* del genoma de la cepa ST105 tienen secuencias con alta similitud al *cluster* de la mensacarcina previamente reportado. Según el programa de ABACAS el presunto *cluster* en la cepa ST105 está formado por 2 *contigs* que se ordenan de la siguiente forma: 37 y 169. Según los resultados de antiSMASH el *contig* 166 tiene 11% de los genes del *cluster* de mensacarcina. En la Figura 5.41 se muestran los resultados del BLAST de la pseudomolécula generada por ABACAS y la secuencia parcial del *cluster* de la *msn*. Se conservan algunos genes pero genes esenciales como *msnK2* se encuentra su secuencia parcial y no se encuentra el gen *msnK1*. Se realizó la búsqueda de los genes *msnK1* y *msnK2* mediante BLASTn en el genoma de la cepa ST105 y los mismos se encuentran en el *contig* 166 el cual no forma parte del *cluster* analizado (Tabla 5.15).

Tabla 5.15. Resultados del BLASTn de la secuencia de los genes *msnK1* y *msnK2* en el genoma de la cepa ST105.

Gen Comparado	Localización en el Genoma de ST105			Largo del alineamiento	% Identidad	e-Value
	Contigs	Desde	Hasta			
<i>msnK1</i>	166	19119	17854	1267	91.32	0.0
<i>msnK2</i>	166	17681	17002	681	89.28	0.0
<i>msnK2</i>	169	13347	13633	287	86.76	1,00E-86

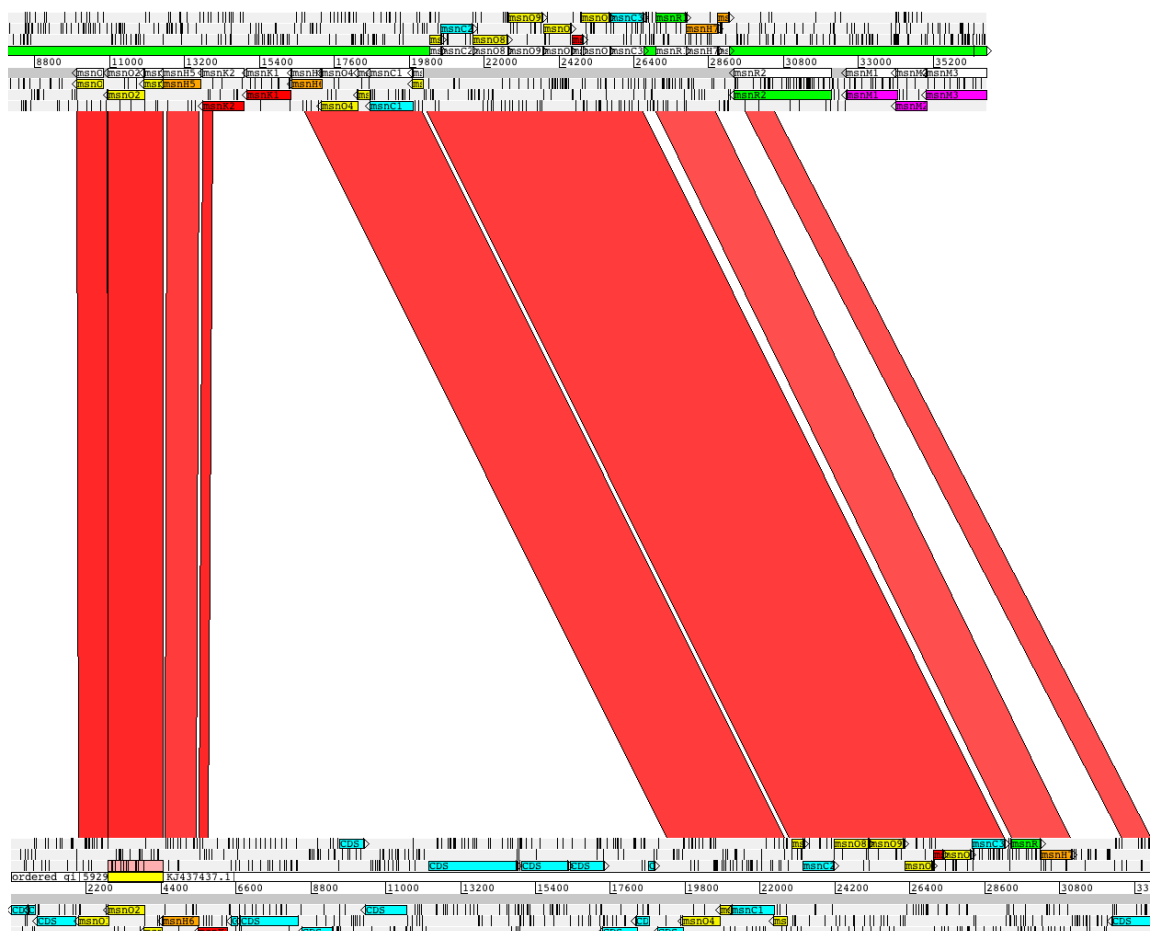


Figura 5.41. Resultados de la comparación del *cluster* de *msn* de *S. bottropensis* (arriba) con la pseudomolécula de presunto *cluster* de *msn* de *S. acidiscabiei* ST105 (abajo) mediante BLAST y visualizados en el programa ACT.

Presencia del gen *dmsnK1* en las cepas de *S. niveiscabiei* de la colección

Se amplificaron mediante PCR con los *primers* dirigidos al gen *dmsnK1* los ADNs genómicos de 15 cepas de *S. niveiscabiei* de la colección. Se observó producto de amplificación del tamaño esperado para las cepas ST107, ST109, ST1010, ST1011, ST1012, ST1013, ST1015, ST1016, ST1017, ST1018, ST1019, ST1020 y ST1021. No se observó amplificación para las cepas ST108 y ST1014 (Figura 5.42). Los productos se confirmaron por secuenciación como el gen *msnK1* reportado por Yan *et al.*, 2012 en el cósmido cos2.

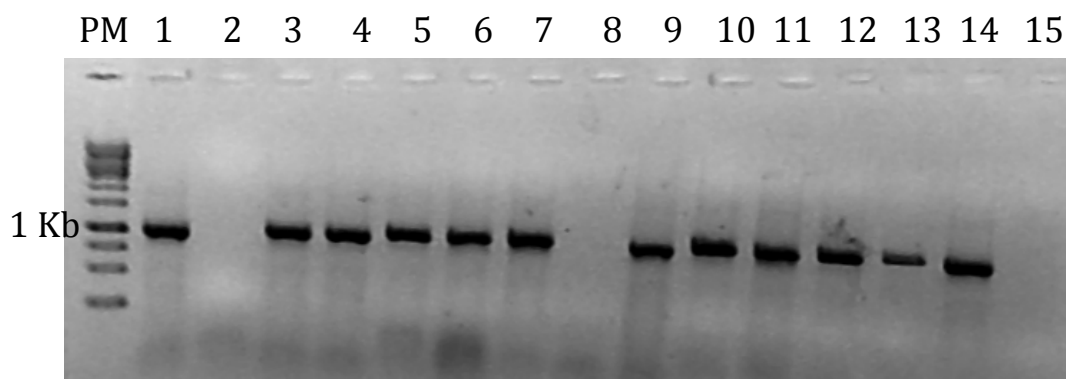


Figura 5.42. Fotografía de la corrida electroforética en gel de agarosa 1.0% de los resultados de la reacción de PCR con los *primers* dmsnK1F/ dmsnK1R a partir del ADN genómico de cepas de *S. niveiscabiei* (1-14); ST107, ST108, ST109, ST1010, ST1011, ST1012, ST1013, ST1014, ST1015, ST1016, ST1017, ST1018, ST1019, ST1020 y ST1021 (15); agua (PM); peso molecular.

Discusión

De manera de conocer el potencial patogénico de nuestras cepas y debido a que los factores de virulencia reportados hasta el momento en los *Streptomyces* patógenos son secretados pudiendo ser metabolitos o enzimas (Li *et al.*, 2019) nos enfocamos en la búsqueda de *clusters* de biosíntesis de metabolitos en los genomas secuenciados y cepas representativas de especies de *Streptomyces* causantes de enfermedades en plantas. El análisis de las secuencias genómicas disponibles en borrador para la cepas ST105, ST129, ST1015, ST1020 y ST1229 permitió predecir un total de 82, 54, 83, 79 y 47 *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios, respectivamente. Tal como era de esperar el número de *clusters* fue significativamente grande dado que el género *Streptomyces* se destaca por la producción de metabolitos secundarios (Bérdy, 2005; Loria *et al.*, 2006). Se observó que el número de *clusters* no se correlacionó con el tamaño del genoma. Una de las posibles causas es que al analizar secuencias genómicas en estado de borrador fragmentos de un mismo *cluster* se podrían encontrar en *contigs* diferentes. Dicho de otra forma, la cantidad de *clusters* predichos para un genoma, en parte depende de cuan fragmentada se encuentre la secuencia genómica. Esto pudo ser confirmado al comparar los resultados de los análisis de la secuencia genómica borrador y cerrada para la cepa *S. niveiscabiei* ST1015. Para el primer caso se predijeron 83 *clusters* mientras que para el genoma completo se obtuvieron 39 *clusters*. En una primera instancia se centró el estudio a la búsqueda de *clusters* de metabolitos secundarios que ya habían sido asociados a la sarna común como las fitotoxinas taxtomina, concanamicinas, coronafacoil fitotoxinas, borrelidina y FD-891 (Bignell *et al.*, 2014; Bignell *et al.*, 2010; Bown *et al.*, 2017; Haydock *et al.*, 2005; Kudo *et al.*, 2010; Olano *et al.*, 2004). Una vez analizados los genomas con la herramienta antiSMASH se constataron similitudes para los *clusters* de biosíntesis de la taxtomina y la concanamicina A. Para las demás

toxinas mencionadas no se observó similitud de los genomas evaluados con sus respectivos *clusters*. Los resultados de antiSMASH muestran que el *cluster* de taxtomina se conserva (al menos en parte) en todas las cepas analizadas con excepción de las cepas aisladas en Uruguay *S. niveiscabiei* ST1015 y ST1020, y las cepas aisladas en Corea *S. luridiscabiei* NRRL B-24455 y *S. puniscabiei* NRRL B-24456. Para las 4 cepas mencionadas se reportó que no producen taxtomina (este trabajo; Park *et al.*, 2003). Por lo tanto, estas cepas tienen un gran potencial para la búsqueda de nuevos factores de virulencia. El *cluster* de biosíntesis de la toxina concanamicina A se encuentra en las dos cepas de *S. scabiei* ST129 y NRRL B-16523, *S. europaeiscabiei* NRRL B-24443, *S. stelliscabiei* NRRL B-24447 y en la cepa que causa sarna en boniato *S. ipomoeae* 91-03. Las concanamicinas se aislaron por primera vez de *S. diastatochromogenes* S-45 (Kinashi *et al.*, 1984) y se han reportado en cepas de la especie patógena *S. scabiei* (Natsume *et al.*, 1998, 2001, 2005). Los resultados de este trabajo a través del análisis de genomas nos permiten suponer que hay otras especies de *Streptomyces* patógenos que son potenciales productoras de estos compuestos. Estudios previos han determinado que las concanamicinas contribuyen a la gravedad de las lesiones en el tubérculo de papa (Natsume *et al.*, 2018). Una vez encontrados los *clusters* de biosíntesis de metabolitos asociados a la patogenicidad en las cepas analizadas, se dirigió el estudio a la identificación del *cluster* de biosíntesis de la desmetilmensacarcina. Para ello se tomó como referencia el *cluster* de biosíntesis de la mensacarcina (msn) reportado en la cepa *S. bottropensis* GÖ C4/4 (Arnold, 2002; Yan *et al.*, 2012). Dicho compuesto difiere en un metilo con el compuesto de interés, por lo que el supuesto de partida fue que ambos *clusters* serían similares. La secuencia del *cluster* de la msn disponible es parcial y está clonado dentro de un cósmido *cos2* (Yan *et al.*, 2012). Mediante los resultados de antiSMASH se constató en las 3 cepas de *S. niveiscabiei* (ST1015, ST1020 y NRRL B-24457) y las dos cepas de *S. acidiscabies* (ST105 y 84-104) analizadas que poseían similitud con el *cluster* de msn. Para confirmar que dicho *cluster* era el responsable de la producción de la desmetilmensacarcina (dmsn) se decidió iniciar su búsqueda y posterior ensamblaje en el genoma de la cepa ST1015. Una vez ensamblado se constató que el potencial *cluster* para la dmsn en el genoma de la cepa ST1015 posee 84% de los genes que se encuentran en la secuencia parcial del *cos2* y 76% con respecto al *cluster* completo de la msn. Estos *clusters* difieren principalmente en los genes que codifican para metiltransferasas (Maier *et al.*, 2015). El *cluster* completo en la cepa *S. bottropensis* GÖ C4/4, posee 6 genes (*msnM1-msnM6*), en el *cos2* solo se encuentran 3 (*msnM1-msnM3*), y en el potencial *cluster* en la cepa ST1015 no se encuentra ninguno de estos. Es interesante que cuando se expresa heterológamente en *Streptomyces albus* el *cluster* de la msn clonado en *cos2* se obtiene como producto la didesmetilmensacarcina (no posee ningún metilo), mientras que en la cepa ST1015 se produce la desmetilmensacarcina (posee un metilo) y sin embargo no se encuentra ninguna

metiltransferasas. Maier y colaboradores reportaron la función en la biosíntesis de cada enzima codificada en el *cluster* de la *msn* en el *cos2* (Maier *et al.*, 2015). No existen estudios de las metiltransferasas y no se encuentran disponibles las secuencias de los genes que codifican para las metiltransferasas M4, M5 y M6 según Yan *et al.*, 2012. Una vez identificado el potencial *cluster* de la *dmsn* en el genoma de la cepa ST1015 era necesario confirmar que dicho *cluster* era el responsable de la producción del compuesto y además evaluar su contribución a la patogenicidad en la cepa ST1015. Para ésto se generaron mutantes *knockout* eliminándose el gen *dmsnK1* y la secuencia parcial del gen *dmsnK2*. Ambos genes forman parte del PKS mínimo y son esenciales en la etapa inicial de la síntesis del compuesto. Se utilizó la estrategia reportada por Knirschova y colaboradores en la cual los genes a ser eliminados se intercambian por un gen de resistencia a la apramicina mediante doble recombinación homóloga (Knirschova *et al.*, 2015). Se obtuvieron mutantes *knockout* para los cuales no se observó la producción del compuesto lo que indicaría que el *cluster* predicho estaría involucrado en su producción. Por otra parte, al evaluar el sobrenadante del cultivo en medio OBB para los mutantes *knockout* no se observó fitotoxicidad en el ensayo con plántulas de rabanito. Estos resultados permitieron inferir que dicho compuesto sería el único o principal compuesto fitotóxico secretado por *Streptomyces niveiscabiei* ST1015 en nuestras condiciones de trabajo. Sin embargo, cuando se evaluó la patogenicidad en el ensayo de rabanito de las cepas mutantes *knockout* no se observó un fenotipo diferente a la cepa ST1015 *wild type*, por lo que el compuesto desmetilmensacarcina seguramente contribuiría pero no sería esencial para la patogenicidad. Por tanto para llevar a cabo un estudio más exhaustivo de la asociación de la desmetilmensacarcina a la enfermedad se deberían hacer otros ensayos en planta como la inoculación de mini tubérculos, observación del tipo de lesión y la contribución a la gravedad de los síntomas. Por ejemplo para la fitotoxina de coronofacoil N-coronafacoil-L-isoleucina (CFA-Ile) que es producida por *S. scabiei* 87-22 se observaron tanto en la cepa WT como en un mutante que no produce el compuesto y diferencias sutiles en el fenotipo patogénico en ensayos en rabanito (Bignell *et al.*, 2010). Sin embargo, un mutante que sobre expresa dicho compuesto produce lesiones de mayor gravedad con respecto a la cepa WT en tejidos de papa (Cheng *et al.*, 2019). El *cluster* de *dmsn* se encuentra ubicado en el extremo del cromosoma a unos 243.000 pares de bases. Se ha reportado que los extremos del cromosoma en el género *Streptomyces* poseen la mayoría de los *clusters* de metabolitos secundarios y son dinámicos, por lo que el *cluster* de la *dmsn* tendría posibilidad de perderse y transferirse (Nett *et al.*, 2009; Volff & Altenbuchner, 1998). Para estudiar qué tan conservado se encuentra el *cluster* de la *dmsn* en las cepas patógenas analizadas utilizamos el software antiSMASH. Se constató presencia del *cluster* de *dmsn* en dos de las especies patógenas estudiadas *S. niveiscabiei* y *S. acidiscabies*. Para determinar qué proporción del *cluster* se encuentra en cada genoma borrador se debería hacer un análisis más completo en las demás

cepas como el reportado en este trabajo para la cepa ST1015. Para las cepas de *S. niveiscabiei*, se observó que todas son potenciales productoras del compuesto debido a que en ellas se reportó presencia parcial del *cluster* de la *dmsn*. En el caso de la cepa de referencia *S. niveiscabiei* NRRL B-24457, que produce taxtomina (Park *et al.*, 2003), se detectó además de la presencia del *cluster* para dicha toxina, el *cluster* para la *dmsn*. Las cepas no productoras de taxtomina *S. niveiscabiei* ST1015 y ST1020 poseen el *cluster* de la *dmsn*. Sin embargo solo se detectó la producción del metabolito para la cepa ST1015. Es interesante que la cepa ST1020, que posee todos los genes del *cluster* para la *dmsn* no es capaz de producirlo y sin embargo sigue siendo patógena. Estos resultados indicarían que aún quedan por elucidar determinantes de patogenicidad para estas cepas. Estos factores de virulencia podrían ser metabolitos o enzimas que se secretan cuando la bacteria estaría en contacto con la planta. Para determinar la presencia del *cluster* en las cepas de *S. niveiscabiei* de la colección se realizó la amplificación del gen *dmsnK* y se confirmó su presencia en todas. Estos resultados muestran que el *cluster* o parte del mismo se conserva en el genoma de la especie *S. niveiscabiei*. También se reportó presencia de genes del *cluster* de la *dmsn* en cepas de la especie de *Streptomyces acidiscabies*. De los diez genomas analizados nueve poseen potencial para producir el compuesto. En el caso de la cepa ST105 que fue analizada en más detalle, el *cluster* no se encuentra completo por lo que seguramente no produzca el metabolito. Es de destacar que las dos especies que conservan genes del *cluster* de la *dmsn* son las especies patógenas reportadas más estrechamente relacionadas. Estos resultados se encuentran en el capítulo 2. A su vez el compuesto se reportó por primera vez para una cepa de *S. bottropensis* GÖ C4/4, que no fue relacionada con la sarna común. Sin embargo cepas de esta especie se han reportado como patógenas de papa por lo que este metabolito, al igual que la taxtomina hasta el momento sólo se ha asociado a especies que causan sarna común. En resumen, se conoció el potencial de producción de metabolitos secundarios de cepas aisladas en Uruguay. Además, se identificó el *cluster* de biosíntesis de la desmetilmensarcina el cual corresponde a una policétido sintasa de tipo II. El metabolito fitotóxico seguramente contribuya pero no es esencial para la patogenicidad y parecería estar distribuido en más de una especie patógena de papa.

Bibliografía

- Arnold M. 2002. CD-aktive metabolite aus Streptomyceten sowie Untersuchung der Biosyntheseleistungen des Mensacarcin-Bildners *Streptomyces* sp. Gö C4/4. Göttingen: Cuvillier Verlag.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. The Journal of antibiotics, 58(1), 1.
- Bierman, M., Logan, R., O'brien, K., Seno, E. T., Rao, R. N., & Schonher, B. E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to *Streptomyces* spp. Gene, 116(1), 43-49.
- Bignell, D. R., Tahlan, K., Colvin, K. R., Jensen, S. E., & Leskiw, B. K. (2005). Expression of ccaR, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on bldG. Antimicrobial agents and chemotherapy, 49(4), 1529-1541.
- Bignell, D. R., Seipke, R. F., Huguet-Tapia, J. C., Chambers, A. H., Parry, R. J., & Loria, R. (2010). *Streptomyces scabies* 87-22 contains a coronafacic acid-like biosynthetic cluster that contributes to plant-microbe interactions. Molecular plant-microbe interactions, 23(2), 161-175.
- Bignell, D. R. D., Fyans, J. K., & Cheng, Z. (2014). Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. Journal of applied microbiology, 116(2), 223-235.
- Bignell, D. R., Cheng, Z., & Bown, L. (2018). The coronafacoyl phytotoxins: structure, biosynthesis, regulation and biological activities. Antonie van Leeuwenhoek, 111(5), 649-666.
- Blin, K., Wolf, T., Chevrette, M. G., Lu, X., Schwalen, C. J., Kautsar, S. A., ... & Dickschat, J. S. (2017). antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. Nucleic acids research, 45(W1), W36-W41.
- Bown, L., Li, Y., Berru , F., Verhoeven, J. T., Dufour, S. C., & Bignell, D. R. (2017). Coronafacoyl phytotoxin biosynthesis and evolution in the common scab pathogen *Streptomyces scabiei*. Appl. Environ. Microbiol., 83(19), e01169-17.
- Cao, Z., Khodakaramian, G., Arakawa, K., & Kinashi, H. (2012). Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 76(2), 353-357.
- Cheng, Z., Bown, L., Piercey, B., & Bignell, D. R. (2019). Positive and negative regulation of the virulence-associated coronafacoyl phytotoxin in the potato common scab pathogen *Streptomyces scabies*. Molecular Plant-Microbe Interactions, (ja).
- Fyans, J. K., Bown, L., & Bignell, D. R. (2016). Isolation and characterization of plant-pathogenic *Streptomyces* species associated with common scab-infected potato tubers in Newfoundland. Phytopathology, 106(2), 123-131.
- Gust, B., O'Rourke, S., Bird, N., Kieser, T., & Chater, K. F. (2003). Recombineering in *Streptomyces coelicolor*. Norwich: The John Innes Foundation.
- Haydock, S. F., Appleyard, A. N., Mironenko, T., Lester, J., Scott, N., & Leadlay, P. F. (2005). Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide concanamycin A in *Streptomyces neyagawaensis* ATCC 27449. Microbiology, 151(10), 3161-3169.

- Hertweck, C. (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(26), 4688-4716.
- Kawasaki, T., Hayashi, Y., Kuzuyama, T., Furihata, K., Itoh, N., Seto, H., & Dairi, T. (2006). Biosynthesis of a natural polyketide-isoprenoid hybrid compound, furaquinocin A: identification and heterologous expression of the gene cluster. *Journal of bacteriology*, 188(4), 1236-1244.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Kinashi, H., Someno, K., & Sakaguchi, K. (1984). Isolation and characterization of concanamycins A, B and C. *The Journal of antibiotics*, 37(11), 1333-1343.
- Knirschova, R., Novakova, R., Mingyar, E., Bekeova, C., Homerova, D., & Kormanec, J. (2015). Utilization of a reporter system based on the blue pigment indigoidine biosynthetic gene bpsA for detection of promoter activity and deletion of genes in *Streptomyces*. *Journal of microbiological methods*, 113, 1-3.
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2017). Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome research*, 27(5), 722-736.
- Kudo, F., Motegi, A., Mizoue, K., & Eguchi, T. (2010). Cloning and Characterization of the Biosynthetic Gene Cluster of 16-Membered Macrolide Antibiotic FD-891: Involvement of a Dual Functional Cytochrome P450 Monooxygenase Catalyzing Epoxidation and Hydroxylation. *ChemBioChem*, 11(11), 1574-1582.
- Lapaz, M. I., Huguet-Tapia, J. C., Siri, M. I., Verdier, E., Loria, R., & Pianzola, M. J. (2017). Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant disease*, 101(8), 1362-1372.
- Li, Y., Liu, J., Díaz-Cruz, G., Cheng, Z., & Bignell, D. R. (2019). Virulence mechanisms of plant-pathogenic *Streptomyces* species: an updated review. *Microbiology*.
- Loman, N. J., Quick, J., & Simpson, J. T. (2015). A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nature methods*, 12(8), 733.
- Loria, R., Bukhalid, R. A., Fry, B. A., & King, R. R. (1997). Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease*, 81(8), 836-846.
- Loria, R., Kers, J., & Joshi, M. (2006). Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 469-487.
- Loria, R., Bignell, D. R., Moll, S., Huguet-Tapia, J. C., Joshi, M. V., Johnson, E. G., ... & Gibson, D. M. (2008). Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(1), 3-10.
- 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.
- Maier, S., Pflüger, T., Loesgen, S., Asmus, K., Brötz, E., Paululat, T., ... & Bechthold, A. (2014). Insights into the bioactivity of mensacarcin and epoxide formation by MsnO8. *ChemBioChem*, 15(5), 749-756.

- Maier, S., Heitzler, T., Asmus, K., Brötz, E., Hardter, U., Hesselbach, K., ... & Bechthold, A. (2015). Functional Characterization of Different ORFs Including Luciferase-Like Monooxygenase Genes from the Mensacarcin Gene Cluster. *ChemBioChem*, 16(8), 1175-1182.
- Natsume, M., Ryu, R., & Abe, H. (1996). Production of phytotoxins, concanamycins A and B by *Streptomyces* spp. causing potato scab. *Japanese Journal of Phytopathology*, 62(4), 411-413.
- Natsume, M., Yamada, A., Tashiro, N., & Abe, H. (1998). Differential production of the phytotoxins thaxtomin A and concanamycins A and B by potato common scab-causing *Streptomyces* spp. *Japanese Journal of Phytopathology*, 64(3), 202-204.
- Natsume, M., Mizuto, T. A. K. I., Tashiro, N., & Hiroshi, A. B. E. (2001). Phytotoxin production and aerial mycelium formation by *Streptomyces scabies* and *S. acidiscabies* in vitro. *Journal of general plant pathology*, 67(4), 299-302.
- Natsume, M., Komiya, M., Koyanagi, F., Tashiro, N., Kawaide, H., & Abe, H. (2005). Phytotoxin produced by *Streptomyces* sp. causing potato russet scab in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 71(5), 364-369.
- Natsume, M., Nagagata, A., Aittamaa, M., Okaniwa, N., Somervuo, P., Fiedler, H. P., ... & Valkonen, J. P. (2018). Phytotoxin produced by the netted scab pathogen, *Streptomyces turgidiscabies* strain 65, isolated in Sweden. *Journal of general plant pathology*, 84(2), 108-117.
- Nett, M., Ikeda, H., & Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural product reports*, 26(11), 1362-1384.
- Olano, C., Wilkinson, B., Sánchez, C., Moss, S. J., Sheridan, R., Math, V., ... & Méndez, C. (2004). Biosynthesis of the angiogenesis inhibitor borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tü4055: cluster analysis and assignment of functions. *Chemistry & biology*, 11(1), 87-97.
- Park, D. H., Kim, J. S., Kwon, S. W., Wilson, C., Yu, Y. M., Hur, J. H., & Lim, C. K. (2003). *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 2049-2054.
- Plitzko, B., Kaweesa, E. N., & Loesgen, S. (2017). The natural product mensacarcin induces mitochondrial toxicity and apoptosis in melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292(51), 21102-21116.
- Sambrook J., Russell D.W. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shirling EB, Gottlieb D, 1966. Methods of characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16, 313-40.
- Sun, J., Kelemen, G. H., Fernández-Abalos, J. M., & Bibb, M. J. (1999). Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology*, 145(9), 2221-2227.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.

- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W71-W74.
- Volff, J. N., & Altenbuchner, J. (1998). Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Molecular microbiology*, 27(2), 239-246.
- Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., ... & Earl, A. M. (2014). Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PloS one*, 9(11), e112963.
- Yan, X., Probst, K., Linnenbrink, A., Arnold, M., Paululat, T., Zeeck, A., & Bechthold, A. (2012). Cloning and heterologous expression of three type II PKS gene clusters from *Streptomyces bottropensis*. *ChemBioChem*, 13(2), 224-230.

CAPÍTULO 6

Consideraciones finales y perspectivas

La papa (*Solanum tuberosum*), de origen andino, es el tercer cultivo de importancia del mundo, luego del arroz y el trigo. En Uruguay es el primer cultivo hortícola en superficie cultivada. La sarna común es una enfermedad de relevancia en la papa, está distribuida mundialmente y es causada por un complejo de especies del género *Streptomyces*. Esta enfermedad se caracteriza por lesiones necróticas en la superficie del tubérculo y la presencia de síntomas de sarna reduce la calidad comercial y sanitaria de los tubérculos de la papa semilla. En Uruguay esta enfermedad constituye uno de los principales problemas sanitarios asociados al cultivo de papa, observándose principalmente lesiones superficiales. En el otoño de 2010 hubo pérdidas económicas significativas en el cultivo de papa debido a que los tubérculos poseían una sintomatología con una gravedad nunca antes observada. Para abordar esta problemática y buscando mejorar las estrategias de control de la enfermedad, se hizo indispensable conocer las especies patógenas presentes, su variabilidad genética, así como los mecanismos de patogenicidad de las cepas. Durante el desarrollo de trabajos previos se generó una colección de 70 cepas de *Streptomyces* spp. patógenas causantes de sarna común provenientes de tubérculos de papa y suelos de diferentes regiones paperas. Se constató la diversidad de la colección así como lo dificultoso de identificar especies de este género. La colección de aislamientos mostró además gran diversidad respecto a la patogenicidad e incluso algunas de las cepas patógenas no presentó ninguno de los genes marcadores de patogenicidad reportados hasta esa fecha. Los trabajos realizados generaron información pero a su vez dieron lugar al surgimiento de nuevas preguntas. Por tanto, se planteó como objetivo de esta tesis, dilucidar los determinantes de patogenia presentes en los aislamientos de *Streptomyces* patógenos de papa presentes en Uruguay, su potencial para la transferencia horizontal de genes y contribuir a una mejor identificación de este complejo de especies. A partir del conocimiento y los insumos obtenidos previamente se decidió seleccionar cinco de las cepas que fueran representativas de la colección para enviar a secuenciar. Dos de éstas (*Streptomyces* spp ST1015 y ST1020) resultaron muy interesantes dado que no poseían los genes de patogenicidad reportados y no pudieron ser identificadas. Finalmente, mediante análisis filogenético y comparación de genomas estas cepas se identificaron como *S. niveiscabiei* representando el primer reporte de esta especie en Uruguay. Cabe destacar que esta especie había sido aislada únicamente en Corea. Además, de manera de lograr una mejor identificación del resto de las cepas de nuestra colección, se incorporó el gen *gyrB* al sistema de MLSA existente. Esta implementación confirmó que se trata de una buena herramienta para la identificación de especies del género *Streptomyces* si bien debe usarse como parte de una taxonomía polifásica. Sin embargo, algunas cepas analizadas mediante este sistema quedaron sin identificar lo que dejó en evidencia la complejidad de este género y que posiblemente en la colección puedan existir nuevas especies de *Streptomyces* asociadas a la

sarna común. Por tanto se debería continuar en la identificación del resto de la cepas y buscar estrategias que mejoren o complemente las actuales. Otra problemática a abordar fue la posibilidad de generación de patógenos emergentes debido a la movilidad de islas de patogenicidad presentes en muchas de las especies de este género. Mediante la comparación de las secuencias de islas de patogenicidad descritas con los genomas secuenciados y la amplificación de genes involucrados en la patogenicidad y movilidad se determinó que en la colección existen cepas con el potencial para la transferencia. La mayoría de estas cepas pertenecen a la especie *S. scabiei*, que es el patógeno más antiguo distribuido mundialmente. Por lo antedicho tiene sentido que esta especie sea la diseminadora de la capacidad de virulencia mediante la transferencia del *cluster* de taxtomina, considerado el determinante de virulencia principal de esta enfermedad. Además, se determinó que la cepa ST1140 emparentada con *S. europaeiscabiei* posee potencial para la transferencia del *cluster* mencionado. Por otro lado, las cepas ST1020 y ST1015 que no producen taxtomina no poseen el sitio intacto *att* que se encuentra en el gen *aviX* por lo que no tienen la capacidad de incorporar el *cluster* de taxtomina por transferencia horizontal. En la búsqueda de nuevos factores de virulencia asociados a la sarna común, en este trabajo se aisló un metabolito fitotóxico. Éste se identificó como la desmetilmensacarcina, aislada por primer vez por Arnold en Alemania en el 2002 a partir de *Streptomyces bottropensis* y reportada con actividad antibiótica y antitumoral. El presente trabajo de tesis demuestra por primera vez la asociación de la desmetilmensacarcina con la fitotoxicidad. Por otra parte, los ensayos realizados dejaron en evidencia que este compuesto es más tóxico en los discos de papa que la taxtomina, generando una necrosis más profunda en el tejido del tubérculo. Se identificó el *cluster* de biosíntesis de la desmetilmensacarcina correspondiendo a un policétido sintasa de tipo II (PKS-II). Mediante la generación de mutantes y análisis genómicos se determinó que el metabolito fitotóxico contribuiría, a la patogenicidad aunque no sería esencial. El compuesto se induciría en un contexto de componentes vegetales y se estableció que estaría distribuido en más de una especie patógena de papa. Restaría por responder cómo contribuye este metabolito fitotóxico a la enfermedad, cuál es su sitio de acción y cómo es el proceso de regulación para su producción. A su vez se debería establecer si las demás cepas de la colección y otras cepas patógenas conservan los genes del *cluster* de la dmsn y si son capaces de producirlo. Este trabajo deja en evidencia que hay otros factores de virulencia por elucidar en estas cepas patógenas y que la enfermedad es resultado de un conjunto de mecanismos de patogenicidad. Más allá de la sarna común y los *Streptomyces* como patógenos, en esta tesis se generó información sobre el conocimiento del genoma y el potencial de producción de enzimas y de metabolitos secundarios de cinco cepas aisladas en Uruguay que puede ser utilizado en otros ámbitos de investigación. Cabe destacar que la desmetilmensacarcina es un precursor de la mensacarcina el cual es un

potente antitumoral que no se ha logrado sintetizar químicamente y la cepa en la cual se reportó previamente lo produce con menor rendimiento que la cepa de *S. nivesicabiei* ST1015 aislada en Uruguay. Debido a que el compuesto tiene una potencial aplicación, sería de interés producirlo a mayor escala. Además para obtener la mensacarcina se debe buscar alguna estrategia para la incorporación del metilo faltante.

ANEXO I

Medios de cultivo

Agar Yeast malt extract (YME) (ISP2) (Shirling & Gottlieb, 1966)

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

Se realizaron la tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajustó el pH del medio a 7.0. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C y se repartió en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente.

Caldo Oat Bran Broth (OBB)

Harina de avena.....	20 g
Solución de elementos trazas.....	2 ml
Agua destilada.....	1000 ml

Solución de elementos traza para el medio OBB

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ . 6H ₂ O.....	200 mg
CuCl ₂ . 2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ . 4H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ . 10H ₂ O.....	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O.....	10 mg
Agua destilada.....	1000 ml

Se realizó la toma en peso de 20 g de harina de avena y se combinaron con 500 ml de agua. Luego se calentó en el microondas durante 4 a 5 minutos a máxima potencia hasta que hierva. Cuando comenzó a hervir se redujo la potencia del microondas a 1 y se hirvió durante 15-20 minutos. Posteriormente se enfrió el medio a temperatura ambiente durante 45-60 minutos con

agitación. Luego se filtró el medio a través de un embudo *buechner* conteniendo 4 capas de gasas. Una vez filtrado se agregó 200-300 ml a través del embudo para lavar los restos de medio. Se ajustó el pH a 7.2 con 1M NaOH. Se agregó dos ml de la solución de elementos traza y se ajustó el volumen a 1000 ml. Se repartieron alícuotas de 50 ml en matraces de 250 ml y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C.

Agar Potato Mashed Broth (PMA)

Puré de papa instantaneo.....	12.5 g
Agar.....	5 g
Agua destilada.....	250 ml

Se realizaron la tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C y se repartió en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente. Para realizar el medio líquido se pesó 3.125 g de puré de papa y se agregaron 250 ml de agua. Luego se repartió de a 50 ml en matraces de 250 ml y se esterilizaron como se describió anteriormente.

International Streptomyces Project Medium 4 (ISP4) (Shirling & Gottlieb, 1966)

Agar ISP4 (Difco).....	37 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se realizaron la toma en peso del medio deshidratado y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajustó el pH del medio a 7.2. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C y se repartió en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente.

Agar Soy Flour Mannitol (SFM) (Kieser *et al.*, 2000)

2x Manitol agar (autoclavado).....	125 ml
2x Caldo de Harina de soja (autoclavado).....	125ml
MgCl ₂ 1M (autoclavado).....	2.5 ml

2x Manitol agar

Manitol.....	5 g
Agar.....	5 g
Agua destilada.....	125 ml

2x Caldo de Harina de soja

Harina de soja.....	5 g
Agua destilada.....	125 ml

Se realizaron la tomas en peso de cada componente y el correspondiente volumen de agua destilada para la preparación de los medios 2x Manitol agar y 2x Caldo de Harina de soja, se utilizaron recipientes de 250 ml y 500 ml respectivamente. Se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121°C. Luego de la esterilización y en condiciones asépticas se mezclaron ambos medios en el recipiente de 500ml y se agregaron 2.5 ml de la solución de MgCl₂ 1M. Luego se repartió en placas de Petri de a 30 ml aproximadamente.

Caldo Tryptic Soy Broth (TSB)

Medio TSB deshidratado (Merck).....	30 g
Agua destilada.....	1000ml

Se realizaron la toma en peso del medio deshidratado y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajustó el pH del medio a 7.3. Se repartió en tubos de a 5ml o 50 ml en matraces de 250 ml y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C.

Caldo *Thaxtomin Defined Medium* (TDM)

(NH) ₂ SO ₄	2 g
MgSO ₄	0.06 g
Agua destilada.....	700 ml

Adherir al tiempo de uso

Fuente de carbono al 5% (autoclavado o filtrado)	200 ml
Solución de elementos trazas (Filtrado).....	1 ml
26 g/l K ₂ HPO ₄ pH7.2 (autoclavado).....	100 ml

Solución de elementos traza para el medio TDM

CaCl ₂	1 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O.....	1 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	1 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se realizaron la tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada 700 ml. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C. Al momento de uso bajo condiciones asépticas se agregaron 100 ml de la fuente de carbono, 1 ml de la solución de elementos trazas y 100 ml de la solución de K₂HPO₄ previamente esterilizadas. Luego se repartieron alícuotas de 50 ml en matraces de 250 ml previamente esterilizados.

Agar Luri-Bertani (LBA) (Shirling & Gottlieb, 1966)

Extracto de Levadura.....	5 g
Triptona.....	10 g
NaCl.....	10 g
Agar.....	18 g
Agua destilada.....	1000ml

Se realizaron la tomas en peso de cada componente y se agregó el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajustó el pH del medio a 7.0. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C. Se dejó enfriar a 45-50 °C y se agregaron antibióticos en caso de corresponder. Inmediatamente el medio se homogeneizó y se repartió en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente. En el caso de preparar caldo LB, se omitió la incorporación de agar y no se llevó a punto de ebullición previo a la esterilización por autoclave.

Stocks de Antibióticos utilizados

Antibiótico	Concentración	Disolver en
Ampicilina	100 mg/ml	Agua Destilada
Apramycina	100 mg/ml	Agua Destilada
Cloranfenicol	25 mg/ml	EtOH
Higromycina	100 mg/ml	Agua Destilada
Kanamycina	50 mg/ml	Agua Destilada
Acido Nalidixico	50 mg/ml	En 0.3N NaOH
Thiostrepton	50 mg/ml	DMSO
Carbenicilina	100 mg/ml	Agua Destilada

Se prepararon los *Stocks* de cada antibióticos los cuales se encontraban 1000x concentrados con respecto a la concentración de uso. En la tabla se detalla la concentración y en con que se debe disolver cada antibiótico.

ANEXO II

Este anexo contiene análisis de datos correspondientes a cada capítulo.

Anexos correspondientes al Capítulo 2

Datos de secuencias genómicas utilizadas

Tabla II.1. Características generales y números de accesoión de las secuencias de los genomas de *Streptomyces* utilizados en este estudio.

Cepa	Tamaño (Mb)	Estatus de la secuencia	Genbank número de accesoión
<i>S. scabiei</i> NCPPB 4066	10.0	Borrador	NZ_JPPW00000000.1
<i>S. scabiei</i> NCPPB 4086	10.4	Borrador	NZ_JPPX00000000.1
<i>S. scabiei</i> 87-22	10.1	Completo	NC_013929.1
<i>S. scabiei</i> 84-34	10.0	Borrador	NZ_LRTN01000001.1
<i>S. scabiei</i> 84-232	9.8	Borrador	NZ_LRSS01000001.1
<i>S. scabiei</i> 85-08	9.9	Borrador	NZ_LRQW01000001.1
<i>S. scabiei</i> 95-18	10.5	Borrador	NZ_LRQX01000001.1
<i>S. scabiei</i> 96-06	9.0	Borrador	NZ_LSZY01000531.1
<i>S. scabiei</i> 96-08	11.2	Borrador	NZ_LRTM01000001.1
<i>S. scabiei</i> 96-15	9.2	Borrador	NZ_LRTO01000001.1
<i>S. scabiei</i> S58	10.0	Borrador	NZ_BCMM01000001.1
<i>S. scabiei</i> NRRL B-16523	9.8	Borrador	NZ_LBNJ01000001.1
<i>S. turgidiscabies</i> Car8	10.8	Borrador	NZ_AEJB00000000.1
<i>S. turgidiscabies</i> T45	10.5	Borrador	NZ_BCMN01000001.1
<i>S. stelliscabies</i> P3825	10.4	Borrador	NZ_KQ257836.1
<i>S. acidiscabies</i> 84-104	11.0	Borrador	NZ_AHBF00000000.1
<i>S. acidiscabies</i> 85-06	10.9	Borrador	NZ_LYDU01001046.1
<i>S. acidiscabies</i> 98-48	10.5	Borrador	NZ_LYDS01000001.1
<i>S. acidiscabies</i> 98-49	10.2	Borrador	NZ_LYDT01000007.1
<i>S. acidiscabies</i> a2	10.6	Borrador	NZ_BCML01000001.1
<i>S. acidiscabies</i> a10	10.7	Borrador	NZ_BCMK01000001.1
<i>S. acidiscabies</i> FL01	10.5	Borrador	NZ_LYDV01000001.1
<i>S. ipomoeae</i> 91-03	10.4	Borrador	AEJC00000000.1
<i>S. acidiscabies</i> NCPPB 4445	9.9	Borrador	NZ_KQ257789.1
<i>S. europaeiscabies</i> 89-04	10.5	Borrador	NZ_LRTQ01000001.1
<i>S. europaeiscabies</i> 96-14	10.5	Borrador	NZ_LRTR01000001.1
<i>S. europaeiscabies</i> NRRL B-24443	10.0	Borrador	NZ_LCTL01000001.1
<i>S. luridiscabies</i> NRRL B-24455	7.9	Borrador	LIQV01000001.1
<i>S. niveiscabies</i> NRRL B-24457	9.5	Borrador	LIRL01000001.1
<i>S. puniscabies</i> NRRL B-24456	8.8	Borrador	NZ_LSZY01000531.1
<i>S. puniscabies</i> TW1S1	9.7	Completo	NZ_CP017248.1
<i>S. stelliscabies</i> NRRL B-24447	10.0	Borrador	LBNW01000001.1
<i>S. stelliscabies</i> P3825	10.4	Borrador	NZ_KQ257836.1

<i>S. diastatochromogenes</i> ATCC 12309	12.3	Borrador	NZ_LRTP01000001.1
<i>S. erythrochromogenes</i> NRRL B-2112	7.5	Borrador	NZ_KL647063.1
<i>S. avermitilis</i> MA-4680	9.1	Completo	BA000030
<i>S. bingchenggensis</i> BCW-1	11.9	Completo	NC_016582.1
<i>S. flavogriseus</i> ATCC33331	11.5	Completo	CP002475
<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350	8.5	Completo	NC_010572.1
<i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>jinggangensis</i> 5008	10.4	Completo	NC_017766
<i>Streptomyces</i> sp. <i>sirex</i> AA-E	7.4	Completo	NC_015953
<i>S. violaceus</i> niger Tu 41113	11.5	Completo	NC_015951
<i>S. bottropensis</i> ATCC 25435	8.9	Borrador	NZ_KB405098.1
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	9.0	Completo	NC_003888.3
<i>S. griseolus</i> NRRL B-2925	7.5	Borrador	NZ_JOFC01000001.1
<i>S. flavochromogenes</i> NRRL B-2684	8.9	Borrador	NZ_JNZO01000001.1
<i>S. flavovariabilis</i> NRRL B-16367	8.7	Borrador	NZ_JNXD01000001.1
<i>Saccharopolyspora erythrae</i> NRRL-2338	8.2	Completo	NC_009142

Matriz de similitud

A continuación se agregan Tablas II.2 -II.4, correspondientes a la matriz de semejanzas realizada comparando las secuencias concatenadas de los cinco genes utilizados para el MLSA. El análisis fue realizado con 51 secuencias utilizando el modelo Kimura de dos parámetros en el programa MEGA7. En amarillo se muestran las distancias correspondientes entre cada par de secuencias comparadas y sin color se muestra los datos correspondientes al error.

ANEXO II- Datos en general

	Streptomyces griseus subsp. griseus NBRC_13350	Streptomyces griseolus strain NRRL B-2925	Streptomyces flavochromogenes strain NRRL B-2684	Streptomyces erythromogenes strain NRRL B-2112	Streptomyces diastatochromogenes strain ATCC 12309	Streptomyces coelicolor A3(2)	Streptomyces bottropensis ATCC 25435	Streptomyces bingchenggensis BCW-1	Saccharopolyspora erythraea NRRL 2338	Streptomyces flavovariabilis strain NRRL B-16367	Streptomyces scabiei 87.22	St124
Streptomyces griseus subsp. griseus NBRC_13350		0.005	0.007	0.008	0.008	0.007	0.008	0.008	0.014	0.007	0.008	0.008
Streptomyces griseolus strain NRRL B-2925	0.052		0.007	0.008	0.007	0.007	0.007	0.009	0.015	0.007	0.007	0.007
Streptomyces flavochromogenes strain NRRL B-2684	0.098	0.114		0.007	0.007	0.007	0.007	0.008	0.015	0.006	0.007	0.007
Streptomyces erythromogenes strain NRRL B-2112	0.116	0.122	0.101		0.007	0.008	0.007	0.009	0.014	0.007	0.007	0.007
Streptomyces diastatochromogenes strain ATCC 12309	0.119	0.123	0.11	0.109		0.006	0.006	0.008	0.015	0.006	0.006	0.006
Streptomyces coelicolor A3(2)	0.113	0.122	0.105	0.119	0.095		0.006	0.008	0.015	0.005	0.006	0.006
Streptomyces bottropensis ATCC 25435	0.119	0.124	0.105	0.103	0.08	0.084		0.009	0.014	0.005	0.003	0.003
Streptomyces bingchenggensis BCW-1	0.142	0.147	0.134	0.144	0.144	0.144	0.156		0.015	0.008	0.009	0.009
Saccharopolyspora erythraea NRRL 2338	0.335	0.343	0.333	0.338	0.341	0.33	0.339	0.35		0.015	0.015	0.015
Streptomyces flavovariabilis strain NRRL B-16367	0.118	0.121	0.094	0.117	0.094	0.072	0.092	0.132	0.345		0.006	0.006
Streptomyces scabiei 87.22	0.121	0.119	0.103	0.101	0.079	0.084	0.027	0.147	0.337	0.091		0
St124	0.121	0.119	0.103	0.101	0.079	0.084	0.027	0.147	0.337	0.091		0
St1232	0.121	0.119	0.103	0.101	0.079	0.084	0.027	0.147	0.337	0.091	0	0
St1113	0.12	0.119	0.102	0.101	0.079	0.084	0.027	0.147	0.336	0.091	0.001	0.001
St129	0.12	0.119	0.102	0.101	0.079	0.084	0.027	0.147	0.336	0.091	0.001	0.001
St127	0.12	0.119	0.102	0.101	0.079	0.084	0.027	0.147	0.336	0.091	0.001	0.001
Streptomyces stelliscabiei NRRL B-24447	0.12	0.123	0.106	0.102	0.08	0.086	0.011	0.153	0.341	0.093	0.025	0.025
Streptomyces europaeiscabiei NRRL B-24443	0.124	0.122	0.105	0.104	0.072	0.083	0.045	0.144	0.345	0.091	0.043	0.043
St1229	0.124	0.123	0.106	0.105	0.072	0.083	0.045	0.145	0.346	0.092	0.044	0.044
St1140	0.121	0.124	0.105	0.105	0.074	0.083	0.047	0.148	0.344	0.092	0.047	0.047
Streptomyces turgidiscabiei NRRL B-24078	0.12	0.123	0.114	0.1	0.087	0.091	0.091	0.145	0.356	0.09	0.09	0.09
St115	0.115	0.121	0.108	0.115	0.093	0.087	0.08	0.139	0.337	0.1	0.081	0.081
St105	0.114	0.121	0.107	0.115	0.093	0.087	0.08	0.138	0.337	0.1	0.08	0.08
St113	0.114	0.121	0.107	0.115	0.093	0.087	0.08	0.138	0.337	0.1	0.08	0.08
Streptomyces acidiscabiei 84-104	0.114	0.121	0.107	0.115	0.093	0.087	0.08	0.138	0.337	0.1	0.08	0.08
St116	0.114	0.121	0.107	0.115	0.093	0.087	0.08	0.138	0.337	0.1	0.08	0.08
St114	0.114	0.121	0.107	0.115	0.093	0.087	0.08	0.138	0.337	0.1	0.08	0.08
St111	0.113	0.12	0.106	0.114	0.091	0.086	0.079	0.137	0.336	0.099	0.08	0.08
St106	0.114	0.121	0.107	0.115	0.093	0.087	0.08	0.138	0.337	0.1	0.08	0.08
St103	0.114	0.121	0.108	0.113	0.091	0.086	0.08	0.137	0.337	0.099	0.081	0.081
St112	0.113	0.121	0.107	0.113	0.091	0.085	0.08	0.136	0.335	0.098	0.08	0.08
St108	0.109	0.114	0.106	0.109	0.093	0.088	0.084	0.132	0.339	0.097	0.084	0.084
St107	0.109	0.114	0.106	0.109	0.093	0.088	0.084	0.132	0.339	0.097	0.084	0.084
St109	0.109	0.114	0.106	0.109	0.093	0.088	0.084	0.132	0.339	0.097	0.084	0.084
St1018	0.11	0.115	0.107	0.11	0.094	0.088	0.085	0.133	0.34	0.098	0.085	0.085
St1011	0.109	0.114	0.106	0.109	0.093	0.088	0.084	0.132	0.339	0.097	0.084	0.084
St1015	0.109	0.114	0.106	0.109	0.093	0.088	0.084	0.132	0.339	0.097	0.084	0.084
St1020	0.109	0.114	0.106	0.109	0.093	0.088	0.084	0.132	0.339	0.097	0.084	0.084
St1013	0.109	0.114	0.106	0.109	0.093	0.088	0.084	0.132	0.339	0.097	0.084	0.084
Streptomyces niveiscabiei NRRL B-24457	0.108	0.113	0.101	0.106	0.093	0.085	0.08	0.129	0.336	0.091	0.078	0.078
St1218	0.115	0.123	0.1	0.113	0.088	0.076	0.093	0.143	0.336	0.078	0.091	0.091
Streptomyces durhamensis NRRL ISP-5539	0.116	0.123	0.102	0.115	0.085	0.073	0.087	0.147	0.33	0.072	0.085	0.085
St121	0.111	0.121	0.108	0.117	0.099	0.082	0.087	0.145	0.338	0.09	0.089	0.089
Streptomyces reticuliscabiei NRRL B-24446	0.126	0.126	0.115	0.116	0.106	0.113	0.111	0.139	0.362	0.091	0.104	0.104
Streptomyces puniscabiei NRRL B-24456	0.113	0.124	0.095	0.111	0.098	0.094	0.099	0.139	0.351	0.07	0.099	0.099
Streptomyces ipomoeae NRRL B-12321	0.117	0.121	0.093	0.115	0.092	0.094	0.077	0.132	0.348	0.079	0.079	0.079
St119	0.113	0.118	0.088	0.116	0.098	0.083	0.097	0.128	0.338	0.064	0.096	0.096
St1134	0.138	0.136	0.126	0.129	0.13	0.13	0.132	0.079	0.338	0.122	0.127	0.127
Streptomyces violaceusniger CGMCC 4.1423	0.132	0.13	0.123	0.126	0.127	0.125	0.132	0.078	0.336	0.12	0.125	0.125
Streptomyces luridiscabiei LMG 21390	0.032	0.048	0.098	0.114	0.119	0.11	0.127	0.144	0.338	0.113	0.124	0.124
Streptomyces cavaiscabiei AS 4.1836	0.021	0.056	0.095	0.115	0.115	0.113	0.119	0.148	0.34	0.114	0.119	0.119

	St1232	St1113	St129	St127	Streptomyces_stelliscabiei_NRRL_B-24447	Streptomyces_europaeiscabiei_NRRL_B-24443	St1229	St1140	Streptomyces_turgidiscabies_NRRL_B-24078	St115	St105	St113	Streptomyces_acidiscabies_84-104
Streptomyces_griseus_subsp._griseus_NBRC_13350	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
Streptomyces_griseolus_strain_NRRL_B-2925	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.008	0.007	0.008	0.008	0.008
Streptomyces_flavochromogenes_strain_NRRL_B-2684	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
Streptomyces_erythrochromogenes_NRRL_B-2112	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.008	0.008	0.008	0.008
Streptomyces_diastatochromogenes_strain_ATCC_12309	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
Streptomyces_coelicolor_A3(2)	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
Streptomyces_bottropensis_ATCC_25435	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	0.005	0.005	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
Streptomyces_bingchenggensis_BCW-1	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.008	0.008	0.008	0.008
Saccharopolyspora_erythraea_NRRL2338	0.015	0.015	0.015	0.015	0.014	0.015	0.015	0.015	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014
Streptomyces_flavovariabilis_strain_NRRL_B-16367	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
Streptomyces_scabiei_87.22	0	0.001	0.001	0.001	0.003	0.004	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St124	0	0.001	0.001	0.001	0.003	0.004	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St1232		0.001	0.001	0.001	0.003	0.004	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St1113	0.001		0	0	0.003	0.004	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St129	0.001	0		0	0.003	0.004	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St127	0.001	0	0		0.003	0.004	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
Streptomyces_stelliscabiei_NRRL_B-24447	0.025	0.025	0.025	0.025		0.004	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
Streptomyces_europaeiscabiei_NRRL_B-24443	0.043	0.042	0.042	0.042	0.041		0.001	0.002	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006
St1229	0.044	0.043	0.043	0.043	0.042	0.001		0.002	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St1140	0.047	0.047	0.047	0.047	0.044	0.014	0.014		0.005	0.006	0.006	0.006	0.006
Streptomyces_turgidiscabies_NRRL_B-24078	0.09	0.089	0.089	0.089	0.088	0.076	0.077	0.077		0.007	0.007	0.007	0.007
St115	0.081	0.08	0.08	0.08	0.082	0.08	0.081	0.081	0.1		0	0	0
St105	0.08	0.08	0.08	0.08	0.081	0.079	0.08	0.081	0.1		0	0	0
St113	0.08	0.08	0.08	0.08	0.081	0.079	0.08	0.081	0.1		0	0	0
Streptomyces_acidiscabies_84-104	0.08	0.08	0.08	0.08	0.081	0.079	0.08	0.081	0.1		0	0	0
St116	0.08	0.08	0.08	0.08	0.081	0.079	0.08	0.081	0.1		0	0	0
St114	0.08	0.08	0.08	0.08	0.081	0.079	0.08	0.081	0.1		0	0	0
St111	0.08	0.079	0.079	0.079	0.081	0.078	0.079	0.079	0.098	0.004	0.003	0.003	0.003
St106	0.08	0.08	0.08	0.08	0.081	0.079	0.08	0.081	0.1		0	0	0
St103	0.081	0.08	0.08	0.08	0.082	0.079	0.08	0.081	0.098	0.006	0.006	0.006	0.006
St112	0.08	0.08	0.08	0.08	0.082	0.079	0.08	0.08	0.097	0.007	0.006	0.006	0.006
St108	0.084	0.083	0.083	0.083	0.086	0.081	0.082	0.082	0.096	0.028	0.028	0.028	0.028
St107	0.084	0.083	0.083	0.083	0.086	0.081	0.082	0.082	0.096	0.028	0.028	0.028	0.028
St109	0.084	0.083	0.083	0.083	0.086	0.081	0.082	0.082	0.096	0.028	0.028	0.028	0.028
St1018	0.085	0.084	0.084	0.084	0.087	0.082	0.083	0.083	0.097	0.029	0.029	0.029	0.029
St1011	0.084	0.083	0.083	0.083	0.086	0.081	0.082	0.082	0.096	0.028	0.028	0.028	0.028
St1015	0.084	0.083	0.083	0.083	0.086	0.081	0.082	0.082	0.096	0.028	0.028	0.028	0.028
St1020	0.084	0.083	0.083	0.083	0.086	0.081	0.082	0.082	0.096	0.028	0.028	0.028	0.028
St1013	0.084	0.083	0.083	0.083	0.086	0.081	0.082	0.082	0.096	0.028	0.028	0.028	0.028
Streptomyces_niveiscabiei_NRRL_B-24457	0.078	0.077	0.077	0.077	0.08	0.079	0.08	0.08	0.097	0.027	0.027	0.027	0.027
St1218	0.091	0.09	0.09	0.09	0.094	0.088	0.088	0.086	0.091	0.096	0.095	0.095	0.095
Streptomyces_durhamensis_NRRL_ISP-5539	0.085	0.084	0.084	0.084	0.089	0.087	0.087	0.085	0.089	0.091	0.091	0.091	0.091
St121	0.089	0.088	0.088	0.088	0.087	0.086	0.086	0.084	0.104	0.056	0.056	0.056	0.056
Streptomyces_reticuliscabiei_NRRL_B-24446	0.104	0.104	0.104	0.104	0.107	0.091	0.092	0.092	0.041	0.126	0.126	0.126	0.126
Streptomyces_puniciscabiei_NRRL_B-24456	0.099	0.099	0.099	0.099	0.098	0.094	0.095	0.093	0.1	0.11	0.11	0.11	0.11
Streptomyces_ipomoeae_NRRL_B-12321	0.079	0.079	0.079	0.079	0.078	0.07	0.07	0.071	0.105	0.096	0.096	0.096	0.096
St119	0.096	0.095	0.095	0.095	0.098	0.094	0.095	0.092	0.102	0.095	0.095	0.095	0.095
St1134	0.127	0.127	0.127	0.127	0.131	0.138	0.137	0.14	0.132	0.137	0.137	0.137	0.137
Streptomyces_violaceusniger_CGMCC_4.1423	0.125	0.125	0.125	0.125	0.131	0.135	0.134	0.137	0.129	0.136	0.136	0.136	0.136
Streptomyces_luridiscabiei_LMG_21390	0.124	0.123	0.123	0.123	0.127	0.121	0.121	0.12	0.113	0.116	0.115	0.115	0.115
Streptomyces_caviscabies_AS_4.1836	0.119	0.118	0.118	0.118	0.12	0.12	0.12	0.119	0.114	0.119	0.119	0.119	0.119

	St116	St114	St111	St106	St103	St112	St108	St107	St109	St1018	St1011	St1015	St1020
<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
<i>Streptomyces griseolus</i> strain NRRL B-2925	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
<i>Streptomyces flavochromogenes</i> strain NRRL B-2684	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
<i>Streptomyces erythrochromogenes</i> NRRL B-2112	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> strain ATCC 12309	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
<i>Streptomyces bottropensis</i> ATCC 25435	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
<i>Streptomyces bingchengensis</i> BCW-1	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL2338	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
<i>Streptomyces flavovariabilis</i> strain NRRL B-16367	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
<i>Streptomyces scabiei</i> 87.22	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St124	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St1232	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St1113	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St129	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St127	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
<i>Streptomyces stelliscabiei</i> NRRL B-24447	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
<i>Streptomyces europaeiscabiei</i> NRRL B-24443	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St1229	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St1140	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
<i>Streptomyces turgidiscabies</i> NRRL B-24078	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
St115	0	0	0.001	0	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
St105	0	0	0.001	0	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
St113	0	0	0.001	0	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
<i>Streptomyces acidiscabies</i> 84-104	0	0	0.001	0	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
St116		0	0.001	0	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
St114	0	0	0.001	0	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
St111	0.003	0.003		0.001	0.001	0.001	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
St106	0	0	0.003		0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
St103	0.006	0.006	0.005	0.006		0.001	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
St112	0.006	0.006	0.005	0.006	0.003		0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
St108	0.028	0.028	0.026	0.028	0.027	0.027		0	0	0.001	0	0	0
St107	0.028	0.028	0.026	0.028	0.027	0.027	0		0	0.001	0	0	0
St109	0.028	0.028	0.026	0.028	0.027	0.027	0	0		0.001	0	0	0
St1018	0.029	0.029	0.027	0.029	0.028	0.028	0.001	0.001	0.001		0.001	0.001	0.001
St1011	0.028	0.028	0.026	0.028	0.027	0.027	0	0	0	0.001		0	0
St1015	0.028	0.028	0.026	0.028	0.027	0.027	0	0	0	0.001	0		0
St1020	0.028	0.028	0.026	0.028	0.027	0.027	0	0	0	0.001	0	0	
St1013	0.028	0.028	0.026	0.028	0.027	0.027	0	0	0	0.001	0	0	0
<i>Streptomyces niveiscabiei</i> NRRL B-24457	0.027	0.027	0.025	0.027	0.027	0.026	0.008	0.008	0.008	0.009	0.008	0.008	0.008
St1218	0.095	0.095	0.094	0.095	0.094	0.094	0.089	0.089	0.089	0.09	0.089	0.089	0.089
<i>Streptomyces durhamensis</i> NRRL ISP-5539	0.091	0.091	0.09	0.091	0.09	0.089	0.085	0.085	0.085	0.086	0.085	0.085	0.085
St121	0.056	0.056	0.055	0.056	0.055	0.053	0.055	0.055	0.055	0.056	0.055	0.055	0.055
<i>Streptomyces reticuliscabiei</i> NRRL B-24446	0.126	0.126	0.126	0.126	0.124	0.124	0.123	0.123	0.123	0.124	0.123	0.123	0.123
<i>Streptomyces puniscabiei</i> NRRL B-24456	0.11	0.11	0.109	0.11	0.11	0.109	0.101	0.101	0.101	0.102	0.101	0.101	0.101
<i>Streptomyces ipomoeae</i> NRRL B-12321	0.096	0.096	0.094	0.096	0.095	0.095	0.09	0.09	0.09	0.091	0.09	0.09	0.09
St119	0.095	0.095	0.094	0.095	0.092	0.091	0.084	0.084	0.084	0.085	0.084	0.084	0.084
St1134	0.137	0.137	0.135	0.137	0.135	0.134	0.129	0.129	0.129	0.13	0.129	0.129	0.129
<i>Streptomyces violaceusniger</i> CGMCC 4.1423	0.136	0.136	0.134	0.136	0.134	0.133	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128
<i>Streptomyces luridiscabiei</i> LMG 21390	0.115	0.115	0.115	0.115	0.116	0.115	0.11	0.11	0.11	0.111	0.11	0.11	0.11
<i>Streptomyces caviscabies</i> AS 4.1836	0.119	0.119	0.118	0.119	0.119	0.119	0.113	0.113	0.113	0.114	0.113	0.113	0.113

Anexos correspondientes al Capítulo 3

Tablas II.5. Resultados del BLAST realizado con las secuencias amplificadas con los *primers* dirigidas al gen *fas*.

Cepa	Descripción	Query Cover	E-value	% de Identidad	Número de Accession
<i>S. turgidiscabies</i>	isopentyl transferase [Streptomyces turgidiscabies Car8]	75%	0.0	100%	AAW49305.1
ST108	cobaltochelatase subunit CobN [Streptomyces sp. ST1015]	64%	1,00E-47	100.00%	WP_112483218.1
ST109	cobaltochelatase subunit CobN [Streptomyces sp. ST1015]	62%	1,00E-47	100.00%	WP_112483218.1
ST1012	cobaltochelatase subunit CobN [Streptomyces sp. ST1015]	54%	3,00E-47	100.00%	WP_112483218.1
ST1016	cobaltochelatase subunit CobN [Streptomyces sp. ST1015]	46%	2,00E-47	100.00%	WP_112483218.1
ST1017	cobaltochelatase subunit CobN [Streptomyces sp. ST1015]	45%	2,00E-47	100.00%	WP_112483218.1
ST1020	cobaltochelatase subunit CobN [Streptomyces sp. ST1015]	51%	4,00E-47	100.00%	WP_112483218.1
ST1021	cobaltochelatase subunit CobN [Streptomyces sp. ST1015]	52%	3,00E-47	100.00%	WP_112483218.1

Tablas II.6. Resultados del BLAST realizado con las secuencias amplificadas con los *primers* dirigidas al gen *txtA*.

Cepa	Description	Query Cover	E-value	% de Identidad	Número de Accession
<i>S. turgidiscabies</i>	MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces]	99%	0.0	100.00%	WP_010350605.1
ST105	MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces]	100%	1,00E-141	99.59%	WP_010350605.1
ST108	MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces]	100%	0.0	100.00%	WP_010350605.1
ST1016	MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces]	99%	5,00E-180	100.00%	WP_010350605.1
ST1113	MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces]	99%	4,00E-133	100.00%	WP_010350605.1
ST1140	non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces europaeiscabiei]	92%	1,00E-130	100.00%	WP_046706285.1
ST125	non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces stelliscabiei]	99%	6,00E-118	99.52%	WP_046912623.1
ST126	MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces]	99%	6,00E-155	100.00%	WP_010350605.1
ST127	non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces scabiei]	99%	8,00E-104	100.00%	WP_086748809.1
ST128	MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces]	99%	3,00E-84	100.00%	WP_01035
ST129	MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces]	93%	2,00E-140	100.00%	WP_010350605.1
ST1210	MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces]	95%	2,00E-174	100.00%	WP_010350605.1
ST1229	MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces]	99%	0%	100.00%	WP_010350605.1
ST1230	MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces]	99%	0.0	100.00%	WP_010350605.1
ST1236	non-ribosomal peptide synthetase [Streptomyces stelliscabiei]	99%	4E-154	100.00%	WP_046912623.1

Tablas II.7. Resultados del BLAST realizado con las secuencias amplificadas con los *primers* dirigidos al gen *int*.

Cepa	Description	Query Cover	E-value	% de Identidad	Número de Accession
ST1016	integrase [Streptomyces scabiei]	99%	7,00E-132	100.00%	KFG04747.1
ST1113	integrase [Streptomyces scabiei]	96%	2,00E-127	100.00%	KFG04747.1
ST1114	integrase [Streptomyces scabiei]	99%	3,00E-130	100.00%	KFG04747.1
ST1140	integrase [Streptomyces scabiei]	99%	2,00E-134	100.00%	KFG04747.1
ST125	site-specific integrase [Streptomyces sp. Ru73]	99%	2,00E-117	82.47%	WP_107501213.1
ST126	site-specific recombinase XerD [Streptomyces sp. Ag109_G2-6]	98%	4,00E-117	83.85%	RPF45713.1
ST127	integrase [Streptomyces scabiei]	96%	4,00E-128	100.00%	KFG04747.1
ST128	integrase [Streptomyces scabiei]	96%	4,00E-128	100.00%	KFG04747.1
ST129	integrase [Streptomyces scabiei]	99%	8,00E-130	100.00%	KFG04747.1
ST1210	integrase [Streptomyces scabiei]	99%	3,00E-128	100.00%	KFG04747.1
ST1227	integrase [Streptomyces scabiei]	99%	1,00E-133	100.00%	KFG04747.1
ST1230	integrase [Streptomyces scabiei]	99%	4,00E-132	99.46%	KFG04747.1
ST1236	integrase [Streptomyces scabiei]	99%	9,00E-138	100.00%	KFG04747.1
ST1016	integrase [Streptomyces scabiei]	99%	7,00E-132	100.00%	KFG04747.1

Tablas II.8. Resultados del BLAST realizado con las secuencias amplificadas con los *primers* dirigidos al gen *Lan*.

Cepa	Description	Query Cover	E-value	% de Identidad	Número de Accession
ST1113	conserved hypothetical protein [Streptomyces scabiei 87.22]	99%	4,00E-62	100.00%	CBG70300.1
ST1114	conserved hypothetical protein [Streptomyces scabiei 87.22]	99%	4,00E-62	100.00%	CBG70300.1
ST1140	conserved hypothetical protein [Streptomyces scabiei 87.22]	94%	2,00E-58	100.00%	CBG70300.1
ST125	conserved hypothetical protein [Streptomyces scabiei 87.22]	98%	5,00E-63	100.00%	CBG70300.1
ST126	conserved hypothetical protein [Streptomyces scabiei 87.22]	99%	4,00E-62	100.00%	CBG70300.1
ST127	conserved hypothetical protein [Streptomyces scabiei 87.22]	99%	5,00E-63	100.00%	CBG70300.1
ST128	conserved hypothetical protein [Streptomyces scabiei 87.22]	99%	4,00E-62	100.00%	CBG70300.1
ST129	conserved hypothetical protein [Streptomyces scabiei 87.22]	99%	5,00E-63	100.00%	CBG70300.1
ST1210	conserved hypothetical protein [Streptomyces scabiei 87.22]	98%	5,00E-63	100.00%	CBG70300.1
ST1229	hypothetical protein [Streptomyces europaeiscabiei]	99%	1,00E-54	100.00%	WP_119581087.1
ST1230	conserved hypothetical protein [Streptomyces scabiei 87.22]	99%	4,00E-62	100.00%	CBG70300.1
ST1236	conserved hypothetical protein [Streptomyces scabiei 87.22]	98%	5,00E-63	100.00%	CBG70300.1

Anexos correspondientes al Capítulo 5

Datos obtenidos de antiSMASH para los genomas de cepas de referencia.

Tabla II.9. *Clusters* de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. niveiscabiei* NRRL B-24457.

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Hasta		
1	Siderophore	63	1	2,224		
2	NRPS	108	1	2,659		
3	Terpene	125	1	12,829	Albaflavenone	100%
4	T1PKS	144	1	5,746		
5	NRPS	161	1	1,944		
6	Butyrolactone	199	1	1,643		
7	NRPS-like	273	1	2,187		
8	NRPS	277	1	2,865		
9	NRPS, Siderophore	516	1	42,400	Pactamycin	22%
10	Amglyccycl	517	1	2,350	Cetoniacytone A	9%
11	NRPS	528	1	14,664	Laspartomycin	6%
12	NRPS	529	1	21,628	Coelichelin	81%
13	NRPS	530	1	4,606		
14	T2PKS	541	1	18,008	SF2575	13%
15	T1PKS	548	1	23,398	Uncialamycin	18%
16	NRPS	549	1	13,969	Kutznerides	6%
17	Terpene	552	1	24,467	Hopene	76%
18	Lanthipeptide	556	1	13,098	Informatipeptin	28%
19	Siderophore	556	14,594	29,058		
20	Other, T3PKS	561	20,289	57,704	Furaquinocin A	26%
21	NRPS	566	5,272	27,830	Pacidamycin	18%
22	NRPS	575	1	1,906		
23	NRPS,T1PKS,hglE-KS	577	1	38,672	Coelibactin	36%
24	T1PKS,PKS-like	580	1	22,491	Pactamycin	11%
25	NRPS	588	1	17,311	Coelibactin	18%
26	NRPS-like	618	1	20,630		
27	NRPS-like, melanin	624	1	10,735	Melanin	40%
28	NRPS-like	642	1	21,992	Kedarcidin	1%
29	Fused	668	7,228	30,813		
30	NRPS-like	670	1	4,532	Conglobatin	15%
31	T2PKS	676	1	15,901	Xantholipin	40%
32	NRPS	696	1	6,097		
33	Terpene	707	1	14,419	Ebelactone	5%
34	T2PKS	719	1	7,733	Jadomycin	42%
35	NRPS	762	1	8,798	Surugamide A / surugamide D	19%
36	NRPS	763	1	2,977		
37	T3PKS	779	1	13,140	Herboxidiene	7%
38	NRPS	783	1	5,706		
39	NRPS	788	1	5,891		
40	Phosphonate	800	1	6,699		
41	Ectoine	808	1	9,776	Ectoine	100%
42	NRPS	839	1	10,912	Salinamide A	28%

43	Siderophore	855	1	6,866		
44	NRPS	857	1	9,365	JBIR-78 / JBIR-95	44%
45	Siderophore	858	1	9,914	Desferrioxamine B	66%
46	Nucleoside, Betalactone, NRPS-like	916	957	33,927	Nikkomycin	75%
47	NRPS	927	1	3,549		
48	NRPS-like,T1PKS	938	1	7,032		
49	Lanthipeptide	946	3,391	28,410		
40	Bacteriocin	950	1	4,458		
41	NRPS	984	1	2,274		
42	NRPS	1037	1	3,137		
43	Indole	1041	1	8,306	Terfestatin	23%
44	T1PKS	1042	1	10,088		
45	Bacteriocin	1057	1	7,890	Informatipeptin	28%
46	NRPS-like	1062	1	2,245		
47	T2PKS	1106	1	12,215	Mensacaricin	57%
48	TransAT-PKS,NRPS	1123	1	17,059	Phthoxazolin	4%
49	TransAT-PKS-like	1124	1	3,248		
50	T1PKS	1143	1	19,535	Jawsamycin	23%
51	NRPS	1186	1	5,460		
52	NRPS	1193	1	5,961	Ulleungmycin	5%
53	NRPS	1241	1	17,669		
54	Furan	1246	9,709	20,806	Laspartomycin	6%
55	NRPS	1268	1	22,385	Thaxtomin	54%
56	NRPS	1279	1	2,538		
57	Arylpolyene	1291	1	5,817	Pactamycin	13%
58	Terpene, Butyrolactone	1301	1	13,670	Gamma-butyrolactone	100%
59	Terpene	1323	1	7,986		
60	NRPS	1332	1	3,576	Dechlorocuracomycin	8%
61	Terpene	1337	1	5,416		
62	NRPS	1364	1	7,525		
63	Terpene	1369	1	5,670		
64	NRPS	1435	1	2,379		

Tabla II.10. Clusters de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. stelliscabiei* NRRL B-24447

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Hasta		
1	T1PKS	13	1	42,694	Concanamycin A	53%
2	Butyrolactone	20	1	6,541		
3	Siderophore	21	1	3,701		
4	Siderophore	22	1	7,536		
5	Siderophore	33	1	6,643		
6	NRPS	34	1	22,130	Scabichelin	50%
7	Bacteriocin	35	1	9,898	Informatipeptin	42%
8	Ectoine	42	14,496	24,906	Ectoine	50%
9	T1PKS	43	4,923	29,123	RK-682	45%
10	NRPS	67	1	2,819		

11	Betalactone	94	68,682	89,266		
12	NRPS	113	1	11,100		
13	Lanthipeptide	118	1,196	15,198	Informatipepti n	28%
14	Indole	135	9,065	30,561	Terfestatin	28%
15	Lanthipeptide	147	1,937	14,903		
16	LAP, butyrolactone	175	1	15,931	Granaticin	10%
17	T1PKS	178	1	18,335	Mediomycin A	28%
18	T1PKS	180	1	9,387		
19	NRPS	198	1	8,356	Friulimicin	15%
20	Terpene	199	14,129	25,618		
21	NRPS-like	207	1	20,734		
22	T2PKS	212	1	13,758	Spore pigment	58%
23	T1PKS	215	1	23,104	Concanamycin A	46%
24	NRPS-like	264	1	13,657	Enduracidin	8%
25	Siderophore	287	1	10,986		
26	Terpene	318	1	21,883	Isorenieratene	100%
27	Terpene	342	39,997	52,506	Geosmin	100%
28	Siderophore	390	11,809	20,880	Desferrioxamin e B	83%
29	Butyrolactone	425	6,998	14,277	Griseoviridin / viridogrisein	8%
30	NRPS	445	1	36,762	Thaxtomin	54%
31	NRPS-like	471	1	11,436	Laspartomycin	4%
32	Ladderane, NRPS	476	1	36,853	Skyllamycin	8%
33	NRPS	480	1	2,119		
34	Melanin	518	1	6,897	Melanin	60%
35	Terpene	534	1	24,576	Hopene	92%
36	T1PKS	556	1	18,011		
37	Terpene	560	1	7,696		
38	NRPS	565	1	15,391	Ecumicin	10%
39	Melanin, NRPS	568	2,893	34,632	Scabichelin	60%
40	NRPS	691	1	5,797		
41	Terpene	773	1	6,496	2- methylisoborne ol	100%
42	NRPS	796	1	2,437		
43	Bacteriocin	828	1	3,672		
44	Ectoine	836	1	1,244	Ectoine	75%
45	Lanthipeptide	867	1	21,876		
46	PKS-like	908	1	7,790	Sceliphrolacta m	8%

Tabla II.11. Clusters de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. luridiscabiei* NRRL B-24455.

BGC	Tipo	Contig	Desde	Hasta	BGC conocido más cercano	Similitud
1	Bacteriocin	4	1	9,801		
2	T1PKS	25	1	23,913	Argimycin P	24%
3	T3PKS	41	1	32,737	Herboxidiene	6%
4	Terpene	61	2,861	23,161	Murayaquinone	10%

5	Terpene	62	11,145	37,719	Hopene	69%
6	NRPS	79	1	19,983	Skylamycin	6%
7	NRPS	85	1	13,179		
8	T1PKS	94	1	25,141	SGR PTMs	33%
9	NRPS	109	1	20,817	Tirandamycin	66%
10	T1PKS	114	1	5,865	Micromonolactam	100%
11	Terpene	115	8,141	18,733	Cinnamycin B	11%
12	T3PKS	127	1	7,337		
13	Siderophore	135	3,849	18,554	Ficellomycin	3%
14	NRPS	146	1	29,656	Griseobactin	58%
15	Lanthipeptide	152	1	9,987		
16	NRPS	157	1	25,437	Arsenopolyketides	37%
17	NRPS	157	33,048	66,805	Coelichelin	81%
18	NRPS-like	184	1	27,011	Bottromycin A2	21%
19	NRPS	208	1	24,275	SGR PTMs	83%
20	Lanthipeptide	218	1	12,209	AmfS	100%
21	Arylpolyene	222	1	10,655	WS9326	5%
22	Lasso peptide	241	1	12,573	Keywimysin	80%
23	T1PKS	300	1	11,840	Arsenopolyketides	16%
24	T3PKS	308	1	19,495	Alkylresorcinol	100%
25	Terpene	325	1	14,692	2-methylisoborneol	100%
26	Terpene	352	1	15,116	Isorenieratene	100%
27	NRPS	390	1	26,134	Phosphonoglycans	3%
28	NRPS	401	1	23,076	Amicetin	8%
29	Linaridin	402	1	12,614	Pentostatine / vidarabine	9%
30	Siderophore	405	1	6,518	Desferrioxamine B	80%
31	Butyrolactone	432	1	2,396	Coelimycin	16%
32	Bacteriocin	445	2,946	10,911		
33	NRPS,thiopeptide,LAP	446	995	28,051	Lactazole	33%
34	Terpene	473	1	15,077	Steffimycin	19%
35	NRPS,PKS-like	479	1	56,004	Coumermycin A1	9%
36	Ectoine	496	10,654	19,762	Ectoine	100%
37	Terpene	512	1	20,219	Geosmin	100%
38	T2PKS	567	1	6,368	Sch47554 / Sch47555	10%
39	T1PKS	578	1	4,457	Micromonolactam	100%
40	LAP	742	1	16,206	Nocathiacin	4%
41	Melanin	746	37,930	46,072	Melanin	100%
42	NRPS-like,T1PKS	747	1	23,646		
43	TransAT-PKS,NRPS	751	1	45,200	Cosmomycin D	5%

Tabla II.12. *Clusters* de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. turgidiscabies* Car8.

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Hasta		
1	Siderophore	18	6,229	19,407		
2	Siderophore	21	1	10,946		
3	Bacteriocin	35	1	6,300		
4	NRPS, ectoine	41	1	27,921	Ectoine	75%
5	T1PKS	65	1	29,835	Streptazone E	50%
6	T2PKS	68	1	11,464	A-74528	55%
7	Ladderane	77	1	11,409	Skyllamycin	10%
8	NRPS,T1PKS	94	1	45,008	Lagunapyrone A / lagunapyrone B / lagunapyrone C	22%
9	Bacteriocin	112	37,933	49,885		
10	NRPS-like	119	1	18,398	Indigoidine	100%
11	Ectoine	120	31,859	42,281	Ectoine	100%
12	NRPS	191	59,774	106,085	Diisonitrile antibiotic SF2768	66%
13	Siderophore	206	36,569	48,356	Desferrioxamine B	83%
14	NRPS-like	235	1	40,920		
15	NRPS-like	242	2,640	43,446		
16	Terpene	269	1	16,965	Hopene	92%
17	Terpene	276	1	22,158	Formicamycins A-M	11%
18	Bacteriocin	300	3,127	13,345	Informatipeptin	28%
19	Terpene	307	1	11,653	Albaflavenone	100%
20	hglE-KS,T1PKS,terpene	316	18,093	69,584	2-methylisoborneol	100%
21	NRPS	320	1	28,704	Calcium-dependent antibiotic	17%
22	Melanin	321	1	2,796	Melanin	100%
23	Terpene	332	3,310	24,116	Calcimycin	6%
24	Lanthipeptide	334	348,841	374,097		
25	NRPS	334	415,368	464,240	Thaxtomin	81%
26	hglE-KS	358	1	23,678	Herboxidiene	2%
27	Betalactone	386	1	14,629		
28	Bacteriocin	389	7,641	18,876		
29	T1PKS	405	1	6,344		
30	NRPS-like	415	1	13,199		
31	T2PKS	416	1	5,162	Spore pigment	58%
32	NRPS	448	1	51,086	Scabichelin	100%
33	Lanthipeptide	450	1	9,159	Informatipeptin	28%
34	Terpene, butyrolactone	470	1	20,315	Gamma-butyrolactone	100%
35	T1PKS	496	1	18,842	Chlorothricin	4%
36	Siderophore	526	1	8,103		
37	Terpene	580	1	10,294		

38	NRPS	592	1	58,939	Cysteamide	63%
39	T1PKS, NRPS	607	16,953	71,962	Kistamicin A	12%
40	Lanthipeptide	620	1	16,483		

Tabla II.13. Clusters de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. acidiscabies* 84-104.

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Hasta		
1	Terpene	71	1	11,322	Geosmin	100%
2	T1PKS	72	1	28,634	Chaxamycin A / chaxamycin B / chaxamycin C / chaxamycin D	10%
3	Betalactone,NRPS-like,T1PKS	93	1	16,624		
4	Terpene	97	17,005	38,609		
5	Lanthipeptide	103	1	16,747		
6	Arylpolyene	106	13,329	40,164	Pactamycin	30%
7	T2PKS	108	1	46,094	Fluostatins M-Q	23%
8	Terpene	108	83,943	104,986		
9	Amglyccycl,T1PKS	112	7,133	37,188	Cetoniacytone A	12%
10	T2PKS,PKS-like	118	15,028	61,585	SF2575	71%
11	Nucleoside,betalactone,NRPS-like	127	1	43,743	Nikkomycin	100%
12	Terpene,bacteriocin	129	55,348	77,667		
13	Phosphonate,PKS-like,T1PKS	129	92,811	147,258	Pactamycin	13%
14	Siderophore	131	14,065	26,035		
15	T1PKS,phosphonate,transAT-PKS,NRPS	132	9,588	142,140	Phthoxazolin	13%
16	Melanin	144	8,566	16,106	Melanin	60%
17	Indole	151	61,420	82,568	Terfestatin	23%
18	Terpene	158	23,594	38,745	Napyradiomycin	15%
19	NRPS	161	80,629	130,859	Cyclomarin	8%
20	NRPS	168	19,132	70,003	Coelichelin	100%
21	Terpene	173	18,533	45,301	Hopene	84%
22	Nucleoside	173	86,805	107,167	Toyocamycin	40%
23	T1PKS,hglE-KS	173	132,157	183,371		
24	Terpene	176	1,226	22,260	Ebelactone	5%
25	T1PKS	179	26,655	139,109	Monensin	67%
26	Ectoine	179	168,001	178,396	Ectoine	100%
27	T3PKS	188	70,937	111,986	Herboxidiene	6%
28	NRPS,T2PKS,T1PKS,NRPS-like	190	51,438	148,313	Kedarcidin	5%

29	Siderophore	191	14,622	28,453	Grincamycin	8%
30	Betalactone,NRPS	192	1	101,123	Malacidin	28%
31	Siderophore, lanthipeptide, bacteriocin	198	44,421	85,788	Informatipeptin	100%
32	T2PKS	206	46,381	119,021	Mensacaricin	84%
33	Terpene	207	113,937	135,052	Albaflavenone	100%
34	Butyrolactone	208	32,551	43,444	Streptovaricin	7%
35	Bacteriocin	212	210,752	222,602		
36	Butyrolactone	212	270,933	278,401	Gamma-butyrolactone	100%
37	Terpene	214	24,203	45,132		
38	T1PKS,furan	214	69,959	114,635	Sch47554 / Sch47555	5%
39	Lanthipeptide	217	43,418	69,863		
40	T1PKS	217	92,919	151,492	Versipelostatin	28%
41	T1PKS,other,T3PKS	222	11,380	75,155	Herboxidiene	5%
42	NRPS	239	122,130	152,059	Thaxtomin	27%
43	NRPS-like	241	128,569	165,421	Pristinamycin	2%
44	Siderophore	242	107,864	119,630	Desferrioxamine	83%
45	NRPS	244	31,394	93,318	JBIR-78 / JBIR-95	77%

Tabla II.14. Clusters de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. puniscabiei* NRRL B-24456.

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Hasta		
1	T3PKS, butyrolactone	5	1	25,418	Germicidin	100%
2	Terpene	15	1	15,477	Albaflavenone	100%
3	Other, CDPS	16	26,037	66,747	Kanamycin	1%
4	Terpene	17	1	24,398	Carotenoid	63%
5	LAP	24	5,060	26,638	AT2433	7%
6	Siderophore	38	15,963	27,741	Desferrioxamine B	83%
7	Bacteriocin	71	8,938	15,333		
8	Ectoine	131	5,275	15,724	Ectoine	100%
9	Phosphonate	135	1	38,651	Fosfazinomycin	7%
10	Terpene, melanin	144	1	17,975	Melanin	42%
11	Other	163	1	12,106	Pamamycin	10%
12	T3PKS	188	66	34,502	Herboxidiene	8%
13	Terpene	206	1	14,316	Geosmin	100%
14	Bacteriocin	220	1,928	11,888		
15	NRPS-like	239	1	32,504	Arginomycin	17%

16	Siderophore	319	593	7,706		
17	Terpene	335	3,330	30,028	Hopene	92%
18	hglE-KS	342	1	10,152		
19	Cyanobactin	376	1	2,076		
20	Bacteriocin,lanthipeptide	401	10,013	30,404	Informatipeptin	100%
21	Terpene	412	1	20,789		
22	NRPS-like	423	8,654	45,538		
23	Siderophore	431	1	7,654		
24	T1PKS,PKS-like	434	1	33,653	Tetronasin	3%
25	NRPS,T1PKS	446	2,850	48,151	Foxicins A-D	9%
26	Amglyccycl	529	1	8,265	Acarbose	7%
27	NRPS,melanin	579	1	35,961	Melanin	100%
28	Furan	594	39,036	60,217	Colabomycin	13%
29	Lanthipeptide	613	27,549	52,732		
30	NRPS	617	1	38,755	JBIR-34, JBIR-35	79%
31	Other,thiopeptide,T2PKS	625	1	59,319	Granaticin	29%

Tabla II.15. *Clusters* de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. europaeiscabiei* NRRL B-24443

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Desde		
1	Siderophore	1	68,812	79,722		
2	T1PKS	16	1	4,023		
3	Terpene	56	1	1,966		
4	Terpene	72	1	18,260	Geosmin	100%
5	Siderophore	92	1	6,578	Desferrioxamine B	83%
6	T1PKS,NRPS	93	1	34,288	Niphimycins C-E	32%
7	T1PKS,NRPS-like	158	1	31,702	PM100117 / PM100118	14%
8	T1PKS	185	1	7,790		
9	Terpene	215	4,415	31,120	Hopene	92%
10	NRPS	240	1	23,726	Thaxtomin	54%
11	NRPS-like	241	1	13,067		
12	T1PKS	256	1	11,857	Thiocoraline	18%
13	T1PKS	264	1	3,798	Micromonolactam	100%
14	T1PKS	272	1	14,204		
15	T1PKS,NRPS	273	1	5,944		
16	NRPS-like	288	1	17,991	Stenothricin	13%
17	Linaridin	297	1	15,306	Pentostatine / vidarabine	9%
18	NRPS-like	303	1	39,060	Polyoxin	5%
19	Butyrolactone	306	1	3,069	Merochlorin	4%
20	PKS-like	321	1	5,705	PM100117 / PM100118	14%
21	T1PKS	328	1	9,345	Niphimycins C-E	29%
22	Lanthipeptide	332	1	12,131		
23	Indole	349	1	13,820	Terfestatin	28%
24	Terpene	403	105,437	116,974	Isorenieratene	37%
25	Siderophore	468	3,748	10,672		
26	T1PKS	486	1	14,699	PM100117 / PM100118	25%
27	T1PKS	495	1	10,285	Micromonolactam	100%
28	NRPS-like	496	1	7,624	Concanamycin A	21%
29	Bacteriocin	499	1	4,957		
30	Bacteriocin	508	1,275	11,520	Informatipeptin	42%
31	Melanin	557	1	5,353	Istamycin	5%
32	NRPS	558	1	36,333	Scabichelin	100%
33	Terpene	562	1	6,199		
34	T1PKS	567	1	4,184	Micromonolactam	100%
35	Melanin	508	7,407	17,772	Melanin	57%
36	T1PKS	594	1	5,510	Micromonolactam	100%
37	Siderophore	727	1	2,953		
38	T2PKS	736	1	15,980	Spore pigment	83%
39	Terpene	767	1	8,141		
40	Terpene	807	1	4,162	Carotenoid	27%
41	NRPS	833	1	2,192		
42	Ectoine	844	1	3,242	Ectoine	75%
43	Melanin	941	1	1,598	Melanin	100%
44	Siderophore	945	1	1,264		

Tabla II.16. Clusters de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. scabiei* NRRL B-16523.

BGC	Tipo	Localización			BGC conocido más cercano	Similitud
		Contig	Desde	Hasta		
1	NRPS	14	1	33,731	Thiazostatin / watasemycin A / watasemycin B / 2-hydroxyphenylthiazoline enantiopyochelin / isopyochelin	66%
2	Siderophore	35	1	3,259		
3	T1PKS	55	1	3,570		
4	Terpene	66	1	1,108	Sioxanthin	100%
5	NRPS	99	1	1,191		
6	T1PKS	126	1	9,245	Concanamycin A	17%
7	Betalactone	127	6,332	26,190	Isofuranonaphthoquinone	8%
8	Lanthipeptide	151	1	11,038		
9	T1PKS	165	1	35,597	Niphimycins C-E	12%
10	Indole	165	65,188	79,446	Terfestatin	14%
11	Terpene	167	1	6,717		
12	T1PKS	174	1	5,029	Micromonolactam	100%
13	Terpene	175	2,808	29,495	Hopene	92%
14	Terpene	229	1	12,517	Geosmin	100%
15	NRPS	239	1	8,123	Malacidin	10%
16	Terpene	292	1	13,484	Ebelactone	5%
17	Siderophore	299	1	6,926		
18	Melanin	313	3,487	13,849	Melanin	57%
19	Bacteriocin, bottromycin	330	1	18,893	Bottromycin A2	45%
20	Terpene	337	3,624	15,103	Isorenieratene	37%
21	NRPS, lanthipeptide	346	1	40,925	Thaxtomin	54%
22	T1PKS	361	1	11,751		
23	Siderophore	418	4,154	11,726		
24	NRPS	427	1	35,245	Scabichelin	100%
25	Terpene	432	1	17,545		
26	T2PKS	441	1	7,948	Spore pigment	75%
27	Bacteriocin	443	1,145	11,390	Informatipeptin	42%
28	Butyrolactone	452	1	8,927	Granaticin	5%
29	Ectoine	457	1	3,516	Ectoine	75%
30	Butyrolactone	473	2,776	13,801	Sch47554 / Sch47555	3%
31	T1PKS	498	1	24,515	RK-682	36%
32	NRPS-like	537	1	25,408	S56-p1	11%
33	T1PKS	541	1	16,216	Concanamycin A	21%
34	Siderophore	558	5,128	11,717	Grincamycin	8%
35	Lanthipeptide	600	1	6,393		
36	T1PKS	602	1	31,907	Concanamycin A	75%
37	Siderophore	646	1	10,983	Desferrioxamine B	83%

38	NRPS-like	649	1	5,328		
39	Linaridin	650	14,446	25,008	Pentostatine / vidarabine	6%
40	NRPS	670	1	15,402		
41	Terpene	682	20,949	41,989	Formicamycins A-M	4%
42	Butyrolactone	684	1	2,925	Lactonamycin	3%
43	Melanin	691	1	8,434	Melanin	80%
44	PKS-like	698	1	14,017	Sceliphrolactam	8%
45	T1PKS	737	1	19,922	Concanamycin A	17%
46	NRPS-like	821	1	7,452		
47	Siderophore	854	1	4,170		
48	Terpene	895	1	10,501	FD-594	6%
49	Bacteriocin	936	1	4,173		

Tabla II.17. Clusters de metabolitos secundarios predichos por antiSMASH para la cepa *S. ipomoeae* 91-03.

BGC	Tipo	Localización			Most similar known cluster	Similitud
		Con tig	Desde	Hasta		
1	Bacteriocin	62	1,632	20,848	Botromycin A2	30%
2	Siderophore	64	1	2,054		
3	T3PKS	90	1	19,070	Alkylresorcinol	66%
4	NRPS	95	1	23,385	Laspartomycin	13%
5	Melanin	99	8,205	18,735	Melanin	60%
6	Lasso peptide	111	1	15,298	Citrulassin D	80%
7	Siderophore	113	6,922	17,456		
8	NRPS	119	1	7,109		
9	NRPS-like	138	1	23,841	Tetrapetalone A / tetrapetalone B tetrapetalone C tetrapetalone D	16%
10	Linaridin	150	1	15,110	Pentostatine / vidarabine	9%
11	Terpene	151	1	11,314	Albaflavenone	100%
12	Bacteriocin	154	1	6,466		
13	Terpene	161	1	12,323	Geosmin	100%
14	NRPS-like	161	28,427	66,938	S56-p1	11%
15	T2PKS	175	1,897	41,260	Frankiamicin	42%
16	T2PKS	212	1	25,207	Spore pigment	75%
17	T1PKS, NRPS	214	1	20,194	Clifednamide	50%
18	Bacteriocin	217	40,332	50,700	Bleomycin	6%
19	Siderophore	221	3,430	15,199	Desferrioxamine B	83%
20	NRPS-like	231	29,744	73,022	Lactomycins A- C	40%
21	T3PKS	257	1	17,176	Flaviolin	75%
22	Terpene	259	1	2,374		
23	T1PKS	276	1	8,527		
24	Betalactone	277	5,881	34,366	Pradimicin	7%
25	Siderophore	279	1	5,315		

26	Lanthipeptide	280	16,067	38,100	Arginomycin	6%
27	Bacteriocin	305	1	7,353		
28	Lanthipeptide	322	1	13,278		
29	PKS-like	356	1	33,281	Pyrronazol B	18%
30	Lanthipeptide	359	36,406	61,399	Kanamycin	2%
31	Ladderane	363	22,480	48,437	Asukamycin	4%
32	T1PKS	375	35,350	101,585	Naphthomycin	25%
33	Lanthipeptide	386	1,248	16,452		
34	Lanthipeptide	388	9,801	25,025		
35	T1PKS	397	1	35,482	Abyssomicin	10%
36	Terpene	407	1	12,039	Ebelactone	5%
37	Butyrolactone	423	14,842	20,931	Merochlorin	4%
38	T1PKS	436	1	26,002	Maduropeptin	3%
39	NRPS	459	1	29,263	Scabichelin	70%
40	Lanthipeptide	460	1	13,062		
41	Terpene	463	1	14,926	Indanomycin	8%
42	NRPS-like, T1PKS	465	1	30,102	Tautomycin	10%
43	Terpene	477	1	17,067	Hopene	84%
44	T1PKS, butyrolactone	484	6,395	57,065	Piericidin A1	50%
45	NRPS-like	503	1	24,200		
46	Terpene	518	1	14,093	2-methylisoborneol	75%
47	NRPS	525	1	38,687	S56-p1	15%
48	NRPS	543	1	38,864	Actinomycin	14%
49	NRPS-like	560	4,543	25,273	Calcium-dependent antibiotic	17%
50	Lanthipeptide	563	1	20,256	Lavendiol	6%
51	Ectoine	564	58,419	64,679	Ectoine	100%
52	Indole	569	1	19,428	Terfestatin	28%
53	NRPS	570	43,120	69,704	Arylomycin	22%
54	Siderophore	574	2,477	15,797		
55	NRPS	607	38,565	87,280	Thaxtomin	36%

Tablas II.18. Resultados del BLAST realizado con las secuencias amplificadas con los *primers* dirigidas al gen *dmsnK1*.

Cepa	Descripción	Query Cover	E-value	% de Identidad	Número de Accession
105	ketosynthase	99%	0.0	91.89%	KJ437437.1
107	ketosynthase	100%	0.0	92.15%	KJ437437.1
109	ketosynthase	99%	0.0	91.07%	KJ437437.1
1010	ketosynthase	99%	0.0	90.83%	KJ437437.1
1011	ketosynthase	100%	0.0	91.03%	KJ437437.1
1012	ketosynthase	98%	0.0	91.26%	KJ437437.1
1013	ketosynthase	99%	0.0	91.07%	KJ437437.1
1015	ketosynthase	99%	0.0	90.82%	KJ437437.1
1016	ketosynthase	98%	0.0	90.91%	KJ437437.1
1017	ketosynthase	99%	0.0	90.96%	KJ437437.1
1018	ketosynthase	98%	0.0	91.27%	KJ437437.1
1019	ketosynthase	100%	0.0	91.13%	KJ437437.1
1020	ketosynthase	99%	0.0	91.06%	KJ437437.1

ANEXO III

Se adjunta un pendrive con las secuencias de ADN, resultado de esta tesis.

ANEXO IV

A continuación se adjuntan los artículos publicados que contienen parte de los resultados generados durante esta tesis.

1. Lapaz, M. I., Huguet-Tapia, J. C., Siri, M. I., Verdier, E., Loria, R., & Pianzzola, M. J. (2017). Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant disease*, 101(8), 1362-1372.
2. Lapaz, M. I., López, A., Huguet-Tapia, J. C., Pérez-Baldassari, M. F., Iglesias, C., Loria, R., ... & Pianzzola, M. J. (2018). Isolation and structural characterization of a non-diketopiperazine phytotoxin from a potato pathogenic *Streptomyces* strain. *Natural product research*, 33(20), 2951-2957.