

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA**



DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

**Caracterización molecular de *Streptomyces*
spp. asociadas a la sarna común y evaluación
in vitro de antagonistas nativos de la
rizosfera de papa en Sinaloa.**

T E S I S

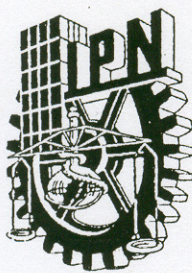
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA:

IB. ANALILIA RETE CORRAL

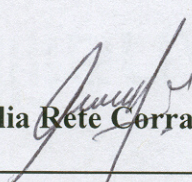
GUASAVE, SINALOA; MÉXICO DICIEMBRE DEL 2011



CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **Guasave, Sinaloa** el día **30** del mes de **Noviembre** del año **2011**, el (la) que suscribe **Analilia Rete Corral** alumno (a) del Programa de **Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente** con número de registro **B091721**, adscrito a **CIIDIR-SINALOA**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **Dra. Norma Elena Leyva López y Dr. Rubén Félix Gastélum** ceden los derechos del trabajo intitulado **Caracterización molecular de *Streptomyces* spp. asociadas a la sarna común y evaluación *in vitro* de antagonistas nativos de la rizosfera de papa en Sinaloa**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **lili_rete@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Analilia Rete Corral

Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

Guasave, Sinaloa a 30 de Noviembre del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR SINALOA en su sesión Extraordinaria No. 17 celebrada el día 14 del mes de Noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Rete	Corral	Analilia							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)							
		Con registro: <table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>B</td><td>0</td><td>9</td><td>1</td><td>7</td><td>2</td><td>1</td></tr></table>	B	0	9	1	7	2	1
B	0	9	1	7	2	1			

Aspirante de: **MAESTRIA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

"Caracterización molecular de *Streptomyces* spp. asociadas a la sarna común y evaluación *in vitro* de antagonistas nativos de rizosfera de papa en Sinaloa".

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Caracterizar molecularmente especies de *Streptomyces* asociadas a la sarna común de la papa.

Evaluación *in vitro* de antagonistas nativos de rizosfera de papa en Sinaloa.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dra. Norma Elena Leyva López y Dr. Rubén Félix Gastélum

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: CIIDIR-SINALOA

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios. (Financiamiento: Fundación Produce Sinaloa. FPS-903 2009-2010 Monto: \$451,440.00)

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dra. Norma Elena Leyva López

Dr. Rubén Félix Gastélum

Aspirante

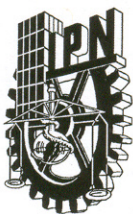
Presidente del Colegio

Analilia Rete Corral

Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 13:00 horas del día 30 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa

para examinar la tesis titulada:

Caracterización molecular de *Streptomyces* spp. asociadas a la sarna común y evaluación *in vitro* de antagonistas nativos de la rizosfera de papa en Sinaloa.

Presentada por el alumno:

Rete	Corral	Analilia							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro: <table border="1"><tr><td>B</td><td>0</td><td>9</td><td>1</td><td>7</td><td>2</td><td>1</td></tr></table>	B	0	9	1	7	2	1
B	0	9	1	7	2	1			

aspirante de:

Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente

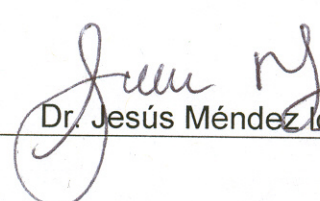
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

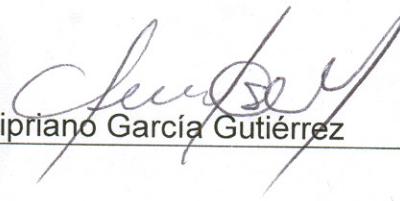
LA COMISIÓN REVISORA

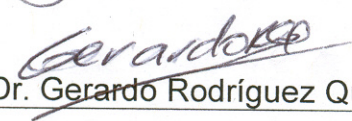
Directores de tesis


Dra. Norma Elena Leyva López

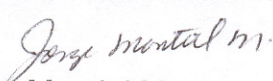

Dr. Rubén Félix Gastélum


Dr. Jesús Méndez Lozano


Dr. Cipriano García Gutiérrez


Dr. Gerardo Rodríguez Quiroz

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Fitopatógenos en el área de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la dirección de la Dra. Norma Elena Leyva López y el Dr. Rubén Félix Gastélum. Para la realización de este trabajo se recibió financiamiento por parte de Fundación Produce Sinaloa del proyecto FPS-903 2009-2010. El autor agradece al CIIDIR-SINALOA por su apoyo en la infraestructura para la realización del presente trabajo de investigación, así como también al IPN por las becas otorgadas (Beca PIFI y Beca Institucional).

DEDICATORIAS

A Dios

Porque siempre estuvo ahí en los momentos difíciles, por ser el amigo que siempre me acompaña a donde quiera que vaya y guía mis pasos.

A mis padres

Carmen Corral y Víctor Rete por el apoyo incondicional que me han brindado durante toda mi vida, gracias por todo su amor y comprensión ustedes son el motor para seguir siempre adelante. Los amo.

A mi hermano

Víctor M. Rete Corral por ser mi único hermano y un gran amigo, ya sabes que te adoro con toda mi alma, gracias por tu apoyo y comprensión en todo momento. Te amo.

A mi abuelito

Miguel Ángel Corral. Te me fuiste abuelito pero siempre te llevo en mi corazón, nunca olvidare las porras y tus sabios consejos. (Q.E.P.D)

A mi amiga Lore

Siempre cuidándome y apoyándome en todo, mi cómplice, mi amiga., nunca te olvidare. Descansa en paz Lorena Molina torres.

DIOS ME LOS BENDIGA SIEMPRE

AGRADECIMIENTOS

A Dios: por darme el regalo de vivir y permitirme culminar esta bella etapa de mi vida. Mil gracias.

A mi familia: se que sin su apoyo, sus porras y sus sabios consejos no estuviera donde estoy ahorita. Los amo a los tres.

A la Dra. Norma Elena Leyva López: por creer en mí y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por gran apoyo y sus consejos, la admiro mucho. Gracias mami Norma.

Al Dr. Rubén Félix Gastélum: porque a pesar de su falta de tiempo siempre me brindo gran apoyo durante la realización de este trabajo, gracias por recibirme hasta los fines de semana, por sus consejos y sugerencias.

Al Dr. Jesús Méndez Lozano: por sus consejos, comprensión y sugerencias durante este trabajo. Muchas gracias.

A la Dra. María Elena Santos Cervantes: por el apoyo brindado durante toda mi maestría, su paciencia y comprensión, muchísimas gracias, pero muy en especial por su amistad.

A mis tutores el Dr. Cipriano García Gutiérrez y al Dr. Gerardo Rodríguez Quiroz, gracias por sus sugerencias para mejorar este trabajo de investigación.

A la M. C. Mariela Espinoza por ser una muy buena maestra, a ti te debo todo lo que aprendí en el laboratorio. Gracias por su paciencia, eres una persona maravillosa y muy trabajadora.

A Karla Cota: mi amiga casi hermana, espero no tener 35 años y vivir contigo ¿ya chole no? Gracias por tu apoyo incondicional siempre, te quiero mucho y ya sabes que eres mi favorita.

A mis amigos: Nadia, Olimpia, Alejandra, Odete, Damiancito, Gordito alto, Tavo, Gerardo, Héctor, Roger, Juan José, Abraham, Cami, Chio, Sheila, Mauretas, Lalo, Luis, Arely, Nancy, Miguel, Lucy, Martin, Styll, Lucky, Mancillas, Raquel. Hugo y Adolfo. Gracias por todos los momentos que pasamos juntos, la maestría no hubiera sido la misma sin ustedes, nunca los voy a olvidar.

A mis compañeros de laboratorio: Alicia, Alejandra, Barcu, Wendy, Gaby, Ericka, Lucy, Emmanuel, Marco, Maestra Marielos, Maestra Rosita, Zeybi, Ruviela, Paloma, Mónica, Juan Jesús (q.e.p.d)

A todas aquellas personas que por algún motivo ya no están conmigo, aquellas personas que dejaron huella durante estos 2 años y medio, cada una de ellas tuvo un papel importante durante esta etapa de mi vida.

Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo económico e infraestructura brindado para la realización de este trabajo en las instalaciones del CIIDIR-SINALOA.

Al CIIDIR-SINALOA por ser mi segundo hogar durante tres años y por brindarme la oportunidad de realizar mi maestría, así como también a todo su personal con los que tuve el placer de entablar una bonita amistad.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 CULTIVO DE PAPA	3
2.1.1 Generalidades y origen.....	3
2.1.2 Ubicación taxonómica de la papa.....	4
2.1.3 Propiedades nutricionales.....	4
2.1.4 Superficie y producción	4
2.1.5 Enfermedades que afectan el cultivo de papa	5
2.2 ACTINOMICETOS	5
2.2.1 Género <i>Streptomyces</i>	6
2.2.1.1 Enfermedades causadas por especies fitopatógenas de <i>Streptomyces</i>	7
2.2.1.2 Sarna común de la papa.....	9
2.2.1.3 Síntomas de la sarna común de la papa.....	10
2.2.1.4 Patogenicidad por fitotoxinas.....	11
2.2.1.5 Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> spp. causante de la sarna común de la papa.....	12
2.2.1.6 Estrategias de control de la sarna común de la papa.....	12
2.2.1.7 Detección molecular de <i>Streptomyces</i> spp.	13
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	16
6. MATERIALES Y METODOS.....	17
6.1 Colecta de muestras de tubérculos y suelo de la rizosfera de plantas de papa	17
6.2 Aislamiento de <i>Streptomyces</i> spp.	17
6.2.1 Aislamiento de <i>Streptomyces</i> spp. de la rizosfera de papa	17
6.2.2 Aislamiento de <i>Streptomyces</i> spp. de lesiones de tubérculos de papa.....	18

6.3 Identificación de <i>Streptomyces</i> spp.	18
6.4 Extracciones de DNA	18
6.4.1 Extracción de DNA de aislados de <i>Streptomyces</i> spp.	18
6.4.2 Extracción de DNA de tejido de tubérculo de papa	19
6.5 Electroforesis de DNA.....	20
6.6 Detección de <i>Streptomyces</i> spp. mediante PCR.....	20
6.7 Electroforesis de los productos amplificados	22
6.8 Clonación y secuenciación de <i>Streptomyces</i> spp.....	22
6.8.1 Purificación de los productos de PCR	22
6.8.2 Ligación de productos de PCR.....	23
6.8.3 Transformación de células competentes	24
6.8.4 Extracción de DNA plasmídico (Miniprep)	24
6.8.5 Purificación de DNA plasmídico	25
6.8.6 Restricción del DNA plasmídico	25
6.8.7 Cuantificación de DNA.....	25
6.8.8 Secuenciación y análisis.....	26
6.9 Pruebas <i>in vitro</i> y cinéticas de crecimiento.....	27
6.9.1 Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de bacterias de la rizosfera de papa contra especies de <i>Streptomyces</i>	27
6.9.2 Cinética de bacterias antagonistas a especies de <i>Streptomyces</i> patogénicas.....	28
6.9.3 Conteo de UFC de organismos antagonistas a <i>Streptomyces</i> spp.....	29
7. RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
7.1 Localidades de muestreo.....	31
7.2 Sintomatología observada en follaje y tubérculos de papa	32
7.3 Aislamiento y clasificación de <i>Streptomyces</i> spp.....	34
7.3.1 Aislados de <i>Streptomyces</i> spp. de rizosfera y tubérculos de papa en Sinaloa	34
7.3.2 Morfotipos de <i>Streptomyces</i> spp. aislados de rizosfera y tubérculos de papa	37
7.4 Técnicas moleculares	38

7.4.1 Extracción de DNA de los aislados de <i>Streptomyces</i> spp	38
7.4.2 Detección molecular de <i>Streptomyces</i> spp. en tubérculos de papa en Sinaloa	41
7.4.3 Clonación de los aislados de <i>Streptomyces</i> spp.	45
7.5 Análisis de secuencias	45
7.5.1 Análisis de secuencias de los genes Nec1, TxtA y TxtB.....	45
7.5.2 Análisis de secuencias del gen 16S.....	47
7.6 Pruebas <i>in vitro</i> y cinéticas de crecimiento.....	48
7.6.1 Bioensayos de antagonismo <i>in vitro</i> a <i>Streptomyces</i> patogénicas	48
7.6.2 Cinética de crecimiento de bacterias antagonistas a <i>Streptomyces</i> patogénicas.....	53
7.6.3 Conteo de UFC de antagonistas a <i>Streptomyces</i> patogénicas	54
8. CONCLUSIONES.....	59
9. RECOMENDACIONES	60
10. BIBLIOGRAFÍA.....	61
Anexo 1.....	67
Anexo 2.....	69
Anexo 3.....	74
Anexo 4.....	77

GLOSARIO

Amplificación: Aumento del número de copias de un gen o de una secuencia de DNA.

Antagonismo: Interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida de actividad de uno de ellos.

Bacteria: Microorganismo unicelular con núcleo desprovisto de membrana, con un único cromosoma, capaces de multiplicarse. Las bacterias pueden ser o no patógenas, y estar en el origen de gran cantidad de enfermedades infecciosas.

Biología Molecular: Parte de la biología que trata de los fenómenos biológicos a nivel molecular. En sentido restringido comprende la interpretación de dichos fenómenos sobre la base de la participación de las proteínas y ácidos nucleicos.

Cepa: Conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

Clonación molecular: Inserción de un segmento de DNA ajeno, de una determinada longitud, dentro de un vector que se replica en un huésped específico.

DNA: Ácido desoxirribonucleico de doble cadena formado por en los que el azúcar es desoxirribosa y las bases nitrogenadas son Adenina, Guanina, Citosina y Timina, el DNA codifica la información para la reproducción y el funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de DNA.

Electroforesis: Técnica utilizada para la separación de moléculas a través de un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño molecular y carga eléctrica.

Gen: Fragmento de DNA en el que se contiene el código necesario para síntesis de una determinada proteína.

In vitro: Significa que ocurre fuera del organismo vivo, en un ambiente artificial.

Localidad: División territorial o administrativa genérica para cualquier núcleo de población con identidad propia.

Microorganismo: Organismos microscópicos pertenecientes por regla general a virus, bacterias, algas, hongos o protozoos.

Muestra: Parte o una porción de un producto que permite conocer la calidad del mismo.

Nucleótido: Unidades o eslabones moleculares elementales, que enlazados uno a continuación de otro, constituyen los ácidos nucleicos. Químicamente están formados por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada.

Papa: Planta perteneciente a la familia botánica de las *Solanaceae* de nombre científico *Solanum tuberosum* L.

Patógeno: Microorganismo que tiene la capacidad de producir enfermedad en los seres humanos, animales o plantas.

Primers: Cadena corta de polinucleótido preexistente a la cual pueden agregársele nuevos desoxirribonucleótidos para la acción de la enzima DNA polimerasa.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Técnica del análisis del genoma mediante la amplificación ilimitada de porciones específicas del DNA, aunque sean muy pequeñas.

Secuenciación: Determinación del orden de nucleótidos en una molécula de DNA o RNA, o el orden de aminoácidos en una proteína.

Síntoma: Alteración o reacción interna o externa que sufre una planta como resultado de su enfermedad.

Termociclador: Instrumento que permite ejecutar en forma automatizada la técnica de PCR. Mediante la aplicación de ciclos térmicos secuenciales ocurre la desnaturalización, hibridación y síntesis de DNA.

Toxina: proteína responsable de la especificidad funcional de ciertas bacterias, que es venenosa para determinados organismos.

INDICE DE CUADRO

Cuadro 1. Ubicación taxonómica de la papa	4
Cuadro 2. Aislados de especies nativas de rizosfera de papa en el Norte de Sinaloa	28
Cuadro 3. Periodos de incubación después de la siembra a los que se midió absorbancia para cada antagonista a especies patogénicas de <i>Streptomyces</i>	29
Cuadro 4. Muestras de tubérculo de papa y suelo de la rizosfera colectados en el Norte de Sinaloa.....	31
Cuadro 5. Aislados de especies de <i>Streptomyces</i> obtenidos de rizosfera de papa en el Norte de Sinaloa	35
Cuadro 6. Aislados de especies de <i>Streptomyces</i> obtenidos de tubérculos de papa con síntomas de sarna en el Norte de Sinaloa.....	36
Cuadro 7. Detección de especies de <i>Streptomyces</i> patogénicas mediante PCR aisladas de rizosfera de papa en Sinaloa.....	41
Cuadro 8. Detección de especies de <i>Streptomyces</i> patogénicas mediante PCR aisladas de tubérculos con síntomas de sarna común de la papa en Sinaloa.	44
Cuadro 9. Medias de halos de inhibición de cada tratamiento contra <i>Streptomyces acidiscabies</i>	51
Cuadro 10. Tiempos y diluciones tomadas para el conteo de UFC de para <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i>	54

Cuadro 11. Tiempos y diluciones tomadas para el conteo de UFC de para <i>Streptomyces coelicolor</i>	55
--	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de papa.....	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> spp.	8
Figura 3. Hifas aéreas de <i>Streptomyces scabies</i>	9
Figura 4. Tubérculo de papa con síntomas de sarna común colectado en la Esmeralda, Guasave, Sinaloa.....	11
Figura 5. Mapa de la ubicación de los oligonucleótidos en los genes <i>nec1</i> , ORF <i>tnp</i> y ORF2.....	21
Figura 6. Ubicación de sitios de muestreo en diferentes zonas productoras de papa en la región Norte del estado de Sinaloa	32
Figura 7. Tubérculos de papa con daños por sarna común.....	33
Figura 8. Aislados de <i>Streptomyces</i> spp. en medio NPPC.....	34
Figura 9. Porcentaje de aislados de <i>Streptomyces</i> spp. obtenidos de rizosfera de plantas de papa en el Norte de Sinaloa	35
Figura 10. Porcentaje de aislados de <i>Streptomyces</i> spp. obtenidos de tubérculos de papa con síntomas de sarna común en el Norte de Sinaloa	37
Figura 11. Diferentes morfotipos de <i>Streptomyces</i> spp. aislados de tubérculo y rizosfera de papa en Sinaloa	38
Figura 12. DNA genómico total extraído de aislados de <i>Streptomyces</i> provenientes de suelo de la rizosfera de papa por el método de Chen and Kuo (1993)	38

Figura 13. DNA genómico total extraído de aislados de <i>Streptomyces</i> provenientes de tubérculos de papa por el método de Zhang	39
Figura 14. Detección por PCR con el gen Nec1 de <i>Streptomyces</i> patogénicas aisladas de rizosfera de papa.....	40
Figura 15. Detección por PCR con el gen Nec1 de <i>Streptomyces</i> patogénicas aisladas de tubérculos de papa.	42
Figura 16. Detección por PCR con el gen TxtAtB de <i>Streptomyces</i> patogénicas aisladas de tubérculos de papa.	43
Figura 17. Árbol filogenético de secuencias del gen 16S amplificado con el par de primers Sm6F-Sm5R de <i>Streptomyces</i> spp.....	47
Figura 18. Capacidad antagónica de aislados de rizosfera de papa del Norte de Sinaloa a <i>Streptomyces acidiscabies</i>	49
Figura 19. Efecto de antagonismo <i>in vitro</i> a <i>Streptomyces acidiscabies</i>	51
Figura 20. Cinética de crecimiento de los aislados antagonistas a <i>Streptomyces acidiscabies</i>	53
Figura 21. Cinética de UFC para <i>Bacillus megaterium</i>	55
Figura 22. Cinética de UFC para <i>Bacillus simplex</i>	56
Figura 23. Cinética de UFC para <i>Streptomyces coelicolor</i>	56
Figura 24. Cinética de UFC para <i>Pseudomonas lini</i>	57

RESUMEN

Sinaloa se ha destacado por ser el principal productor de papa en México, este cultivo se ubica principalmente en las áreas de riego de la zona Norte del estado en los municipios de Ahome y Guasave generando una producción de alrededor 263 mil ton anuales., sin embargo el cultivo de papa se ve afectado por una gran número de enfermedades tal es el caso de la sarna común de la papa que es causadas por especies patógenas de *Streptomyces*. En el ciclo agrícola 2008-2009 esta enfermedad causó en el estado grandes pérdidas significativas en la producción, afectando la calidad y el valor en el mercado de este cultivo. No hay reportes científicos a nivel nacional ni estatal que indiquen que el patógeno de la sarna común de la papa se encuentre presente sin embargo visitando los campos de cultivo se pudo observar que los síntomas de la sarna común en los tubérculos de papa de la región presentan síntomas característicos de sarna causada por *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies* y *Streptomyces turgidiscabies*. Se sugiere que esto sucedió debido a la introducción a la zona de tubérculo semilla infectado con especies patogénicas de *Streptomyces*. Por lo tanto, se planteó el presente trabajo de investigación que tiene tuvo como objetivo caracterizar especies de *Streptomyces* asociadas a la sarna común y evaluar antagonistas nativos de rizosfera de papa contra la sarna común en Sinaloa. Muestras de tubérculos sintomáticos y de la rizosfera de papa fueron colectados de 10 localidades representativas de la zona papera de Sinaloa. A los aislados con características morfológicas de *Streptomyces* se les realizó extracción de DNA y PCR con primers que amplifican los genes patogenicidad (txtAB y Nec1) asociados a los de la sarna común. Se logró detectar mediante la técnica de PCR especies de *Streptomyces* asociadas a patogenicidad tanto de lesiones de tubérculo sintomáticos como de rizosfera de papa. El análisis filogenético de las secuencias obtenidas con el gen 16S comparadas con las ya reportadas en el banco de genes indicó que nuestros aislados tienen una homología de 100% con *Streptomyces acidiscabies* y *Streptomyces scabies* reportadas en los países de Canadá, China, Estados Unidos, Japón y Corea. Posteriormente se realizaron las pruebas de antagonismo de 11 aislados bacterianos obtenidos de rizosfera de cultivos de papa de Sinaloa contra *Streptomyces acidiscabies*, cuatro de los once

aislados bacterianos mostraron actividad antagónica en las pruebas *in vitro*, *Bacillus simplex*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces coelicolor* y *Pseudomonas lini*, resultando este último el que presentó el mayor efecto antagónico. Los datos obtenidos durante este trabajo de investigación como la caracterización de *Streptomyces scabies* y *Streptomyces acidiscabies* así como sus antagonistas en pruebas a nivel laboratorio darán la pauta para la realización de pruebas de control biológico contra la sarna de la papa en Sinaloa tanto en invernadero como en campo.

ABSTRACT

Sinaloa has stood as the largest potato producer in Mexico, the crop is located mainly in irrigated areas of the northern region of the state and municipalities of Guasave and Ahome generating an output of around 263 000 tons per year., However the potato crop is affected by a large number of diseases as common scab of potato is caused by pathogenic species of *Streptomyces*. In the 2008-2009 growing cycle caused disease in the state, having a significant production losses, affecting the quality and value in the market for this crop. No scientific papers at national or state indicate that the pathogen of potato common scab is present, but visiting the fields could be observed that the symptoms of common scab in potato tubers in the region have characteristic symptoms of scabies caused by *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies* and *Streptomyces turgidiscabies*. It is suggested that this was due to the introduction to the area of seed tubers infected with pathogenic species of *Streptomyces*. Therefore, this paper arose from research that has aimed to characterize *Streptomyces* species associated with common scab and evaluate native rhizosphere antagonists against potato common scab in Sinaloa. Samples of symptomatic tubers and potato rhizosphere were collected from 10 localities representing the Mumps area of Sinaloa. A isolates with morphological characteristics of *Streptomyces* underwent DNA extraction and PCR with primers that amplify genes pathogenicity (txtAB and Nec1) associated with the common scab. Successfully detected by PCR *Streptomyces* species associated with pathogenicity of tuber injury both symptomatic and potato rhizosphere. Phylogenetic analysis of the sequences obtained with the 16S gene and compared with those reported in the gene bank indicated that our isolates have a 100% homology with *Streptomyces acidiscabies* and *Streptomyces scabies* reported in the countries of Canada, China, USA, Japan and Korea. Later tests were conducted 11 antagonism of bacterial isolates obtained from the rhizosphere of potato crops in Sinaloa against *Streptomyces acidiscabies*, four of the eleven bacterial isolates showed antagonistic activity *in vitro* essay, *Bacillus simplex*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces coelicolor* and *Pseudomonas lini* , resulting in the latter that had the highest antagonistic effect. The data obtained during this research as the characterization of *Streptomyces*

scabies and *Streptomyces acidiscabies* well as their antagonists in laboratory tests will level the tone for testing biological control of potato scab in Sinaloa both greenhouse and field.

1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) ocupa el cuarto lugar en el mundo en importancia como producto alimenticio después del trigo, maíz y arroz, con 326 millones de toneladas anuales producidas. Los principales países productores son China, Rusia, India y Estados Unidos de América (FAOSTAT, 2007). En México se le considera una de las principales hortalizas; así, en el año 2008 se sembraron alrededor de 54 mil hectáreas de las que se obtuvieron aproximadamente 1.5 millones de toneladas. Sinaloa es el principal productor nacional y con una producción anual de 262 mil toneladas (SIAP, 2010).

El cultivo de la papa se ve afectado por diversas enfermedades, algunas de ellas ocasionadas por bacterias como pudrición blanda, marchitez bacteriana, sarna común (Gregory & Andrade, 1996); enfermedades ocasionadas por Oomycetes como el tizón tardío; hongos como la costra negra; Virus como el *Virus enrollamiento de la hoja* (PLRV), *Virus mosaico rugosos* (PVY), *Virus mosaico latente* (PVX) (Salazar, 1996) y enfermedades por fitoplasmas como punta morada y brote de hilo de la papa (Santos-Cervantes, 2009).

La sarna común es una de las enfermedades más importantes de la papa, ocurre en la mayoría de las áreas de producción de esta solanácea en el mundo y genera pérdidas significativas en la producción y calidad afectando su valor en el mercado. Esta enfermedad es causada por una bacteria del género *Streptomyces*, en las que destacan *Streptomyces scabies*, *Streptomyces turgidiscabies* y *Streptomyces acidiscabies* (Hiltunen *et al.*, 2005; Loria *et al.*, 2001).

La mayoría de las estrategias para el control de la enfermedad se basa en el uso de agroquímicos, los cuales no han demostrado un control total sobre esta enfermedad, además de que provocan deterioro ambiental como es el caso de degradación de los suelos agrícolas, sin considerar el incremento en costos de producción.

Una de las estrategias de control de la sarna de la papa consiste en el uso de aislados antagónicos a *Streptomyces*, pues algunas especies de *Streptomyces* han dado buen resultado en control biológico contra especies patógenas. *Streptomyces* no patogénicas se encuentran en las lenticelas de los tubérculos de papa y producen antibióticos que inhiben el crecimiento de especies patógenas de *Streptomyces* (Xiao *et al.*, 2002, Hiltunen *et al.*, 2008).

En la zona agrícola del Norte de Sinaloa la sarna común causada por alguna especie de *Streptomyces* patógena fue la causante de severas pérdidas de producción del cultivo de papa el ciclo 2008-2009. Se considera que esto ocurrió debido a la introducción de tubérculo semilla infectados con la sarna de la papa. En México, al igual que en Sinaloa, no se cuenta con información documentada sobre las pérdidas ocasionadas por la sarna común en el cultivo de papa; por lo que se planteó el presente trabajo de investigación, que permitió identificar al patógeno causante de la sarna de la papa en Sinaloa, así como también a su antagonistas en pruebas *in vitro*. Los resultados de este trabajo darán la pauta para el comienzo de nuevas investigaciones contra el patógeno de la sarna en Sinaloa tanto en pruebas de invernadero como en campo.

2. ANTECEDENTES

2.1 CULTIVO DE PAPA

2.1.1 Generalidades y origen

La papa (*Solanum tuberosum* L.) pertenece a la familia de las *Solanaceas*, es un tubérculo originario en la cordillera Andina de América del Sur, comprendiendo los países de Perú y Bolivia. La planta de papa es una herbácea anual que alcanza una altura de un metro y produce tubérculos con abundante contenido de almidón (Figura 1). La forma normal de multiplicación de la papa es vía tubérculo-semilla. Sin embargo existe la modalidad de reproducción generativa vía uso de la semilla "botánica" o "verdadera". Esta proviene del acto de fecundación sexual, formando el fruto, producto del cruzamiento de "materiales parentales" que originarían una descendencia (Cepeda, 2003). Es el cuarto cultivo sembrado en más de 100 países y es el alimento básico de los países desarrollados (Román y Hurtado, 2002).

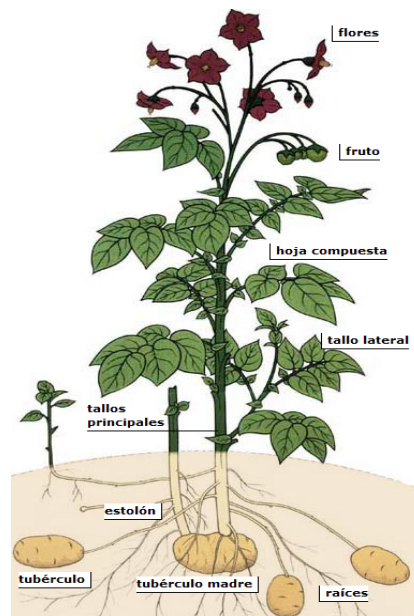


Figura 1. Planta de papa

2.1.2 Ubicación taxonómica de la papa

La papa pertenece a la familia de las *Solanáceas*, del género *Solanum* (Cuadro 1) formado por otras mil especies por lo menos, como el tomate y la berenjena. *S. tuberosum* se divide en dos subespecies apenas diferentes: la *andigena*, adaptada a condiciones de días cortos, cultivada principalmente en los Andes y *tuberosum*, cultivada en todo el mundo (Hawkes, 1990).

Cuadro 1. Ubicación taxonómica de la papa

Reino:	Vegetal
División:	Spermatophyta
Clase:	Dicotiledón
Subclase:	Gamopétala
Orden:	Tubiflora
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>S. tuberosum</i>

2.1.3 Propiedades nutricionales

La papa contiene un elevado porcentaje de agua (77%), es fuente importante de almidón (18%) y de sustancias minerales como el potasio (255 mg), su contenido en proteínas (2.5%); fibra (1.4 gr) y vitaminas es escaso. Destacan las vitaminas B6 y C (19.5 gr) en el momento de la recolección, pero durante el almacenamiento y la cocción de este alimento su contenido se ve significativamente reducido (Luján, 1996).

2.1.4 Superficie y producción

En México la papa se cultiva en alrededor de 54 mil ha de las cuales se obtiene una producción de alrededor de 1.5 millones de ton, siendo los estados de

Sinaloa, Sonora y Chihuahua los estados con mayor producción. Sinaloa que es el principal productor de papa en el país, ha tenido en el último año una producción de 262 mil ton, con un superficie sembrada de 12 mil ha, siendo Ahome, Guasave y El Fuerte los municipios productores del estado (SIAP, 2009).

2.1.5 Enfermedades que afectan el cultivo de papa

Las enfermedades en el cultivo de papa han ocasionado pérdidas importantes en cuanto a calidad y rendimiento de la cosecha. Dentro de los principales Virus que ocasionan perdidas a nivel mundial se incluyen el *Virus enrollamiento de la hoja* (PLRV), el *Virus mosaico rugoso* (PVY) y el *Virus mosaico latente* (PVX) (Salazar, 1996). Dentro de las enfermedades causadas por fitoplasmas se ha consignado a la de punta morada y brote de hilo (Santos-Cervantes, 2009. Entre las enfermedades fungosas se encuentran la pudrición seca y marchitez por *Fusarium spp.* En cuanto a las enfermedades causados por Oomycetes se encuentran el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, la roña causada por *Spongospora subterránea*. Finalmente en las enfermedades ocasionadas por bacterias se han reportado a la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), pudrición blanda (*Erwinia spp.*), pudrición anular (*Clavibacter rmichiganensis*) y sarna común (*Streptomyces scabies*) (Gregory & Andrade, 1996).

2.2 ACTINOMICETOS

Los actinomicetos son un grupo de bacterias filamentosas Gram positivas. Son los microorganismos más abundantes del suelo, forman estructuras de filamentos ramificados llamados micelio (Nolan *et al.*, 1998; Flores-González *et al.*, 2008). La composición de bases del DNA tiene un alto contenido en guanina y citosina (Qu *et al.*, 2008).

La mayoría de los actinomicetos son aerobios y se encuentran habitando en suelos de cultivo, el olor característico a tierra húmeda se debe a su actividad metabólica y a la producción de pigmentos, terpenoides (geosminas) y enzimas extracelulares que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal y

animal. Algunas especies son patógenas para humanos, animales, plantas o son fijadoras de nitrógeno (Flores-González, 2005). Dentro del grupo de las actinobacterias se encuentra el género *Streptomyces* que es el más ampliamente estudiado (Flores-González *et al.*, 2007).

2.2.1 Género *Streptomyces*

El género de *Streptomyces* se caracteriza por producir micelio que penetra y coloniza la materia orgánica del suelo utilizando enzimas hidrolíticas extracelulares para nutrirse de los compuestos orgánicos que resisten la degradación de otros organismos (Loria *et al.*, 1998).

Al igual que muchos hongos, la especie del género *Streptomyces* produce esporas para ayudar a su dispersión. Las cadenas de esporas se producen a través de la fragmentación de hifas aéreas que se forman en el micelio; las formas de las cadenas de esporas es una característica taxonómica importante, ya que pueden ser rectas, ramificadas, en espiral u onduladas. (Shirling *et al.*, 1996). De las más de 400 especies descritas de *Streptomyces* sólo unas cuantas han sido consignadas como patógenas en plantas y animales (Qu *et al.*, 2008); tienen DNA con alta proporción de guanina y Citosina, y al menos algunas especies han demostrado tener un único cromosoma lineal. *Streptomyces spp.* sobreviven como saprofitos en el detrito vegetal y la materia orgánica del suelo (Hiltunen *et al.*, 2008; Coombs *et al.*, 2003).

Streptomyces scabies en el medio de agar tirosina producen el pigmento llamado melanina (Loria *et al.*, 1997) y también forma hifas aéreas de forma helicoidal, mientras que *Streptomyces acidiscabies* muestra cadenas de esporas de forma de curvas dependiendo de la especie. Las colonias de *Streptomyces* son de color amarillento, rojizo o blanquecino dependiendo del medio de cultivo, las colonias son de crecimiento lento, pero a medida que el tiempo pasa van desarrollando un sobre crecimiento aéreo a medida de micelio ramificado. *Streptomyces acidiscabies* se desarrolla en suelos ácidos (pH 4.5) (Lindholm *et al.*, 1997),

mientras que *Streptomyces scabies* en suelos con un pH de 5.2 a 8 (Hiltunen et al., 2008).

El género de *Streptomyces* es conocido por su capacidad de producir metabolitos secundarios biológicamente activos, por ejemplo los antibióticos (Bukhalid et al., 1997; Hopwood, 2006). La mayoría de los antibióticos que son farmacéuticamente importantes son producidos por especies de *Streptomyces*, por ejemplo *Streptomyces griseus* produce la estreptomicina que es utilizada contra la tuberculosis (Manzer et al., 1977). Especies como *Streptomyces hygroscopicus* producen un metabolito secundario llamado bialaphos que ha sido comercialmente utilizado como un importante herbicida (Murakami et al., 1986).

2.2.1.1 Enfermedades causadas por especies fitopatógenas de *Streptomyces*

Diversas especies de *Streptomyces* patógenas causan enfermedades a cultivos agrícolas. *Streptomyces scabies* y *S. turgidiscabies* y algunas otras especies de *Streptomyces* son causantes de la sarna común de la papa (Hiltunen et al., 2008) (Figura 2). *Streptomyces scabies* fue la primera de las especies descrita y la que más se ha estudiado como agente fitopatógeno (Figura 3) (Bukhalid et al., 1998). *Streptomyces acidiscabies* es llamada la sarna acida debido a que puede crecer en pH bajos (Song et al., 2004). *Streptomyces ipomoeae* causa la pudrición de la tierra del camote, que se caracteriza por la necrosis de las raíces fibrosas (Loria et al., 1997). Muchas otras especies de *Streptomyces* causan enfermedades, aunque se sabe poco sobre ellas.

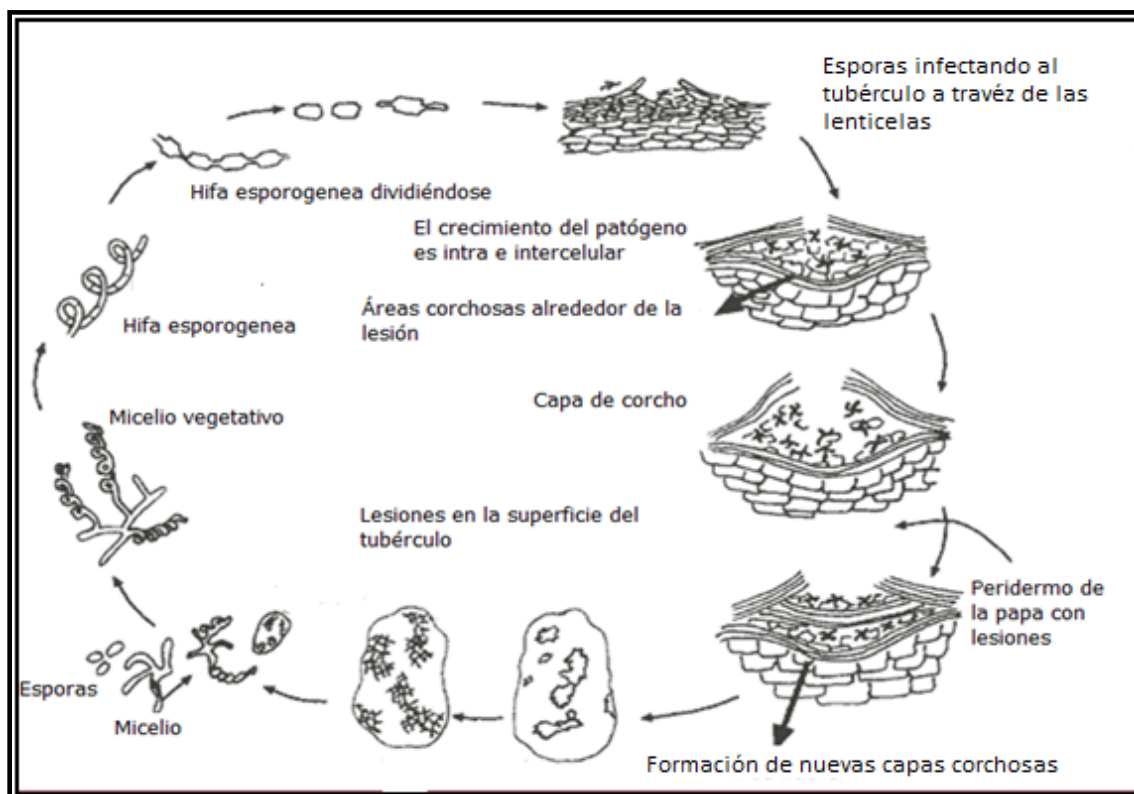


Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces* spp.

Las esporas de *Streptomyces* patogénicas se diseminan a través del aire o tierra infectando a los tubérculos de papa a temprana edad y penetrando por las lenticelas de dichos tubérculos, el patógeno comienza a producir la fitotoxina llamada taxtomina que degrada la celulosa de tubérculo ocasionando las capas corchosas típicas de la enfermedad, el crecimiento del patógeno se da intra e intercelular por lo cual sobrevive en las lesiones en la superficie de los tubérculos. Las hifas del micelio del patógeno se dividirán para la formación de esporas las cuales se diseminan hasta encontrar otro cultivo de papa en cual se puedan desarrollar.

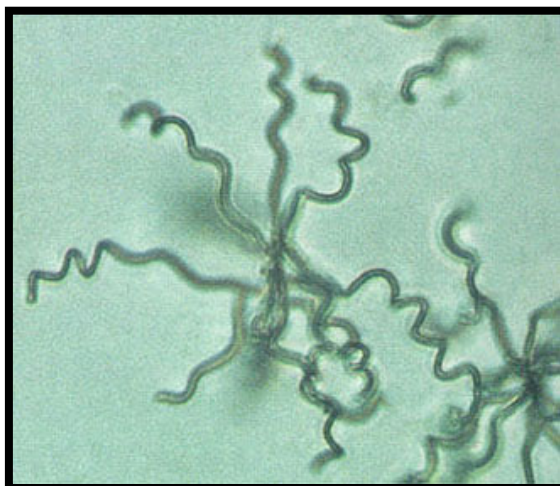


Figura 3. Hifas aéreas de *Streptomyces scabies* (Loria *et al.*, 1997)

2.2.1.2 Sarna común de la papa

Entre las enfermedades causadas por *Streptomyces* la sarna común de la papa es sin duda la de mayor importancia económica en el mundo (Shin *et al.*, 2002), generando pérdidas significativas en la producción, afectando su calidad y por lo tanto su valor en el mercado (Hiltunen *et al.*, 2005). La sarna común de la papa es causada por *Streptomyces scabies*, *Streptomyces turgidiscabies*, entre otras especies de *Streptomyces* (Healy *et al.*, 2000). *Streptomyces scabies* es probablemente el patógeno más relacionado con la sarna común de la papa (Loria, 2001; Song *et al.*, 2004; Hiltunen *et al.*, 2008). Sin embargo estudios recientes han relacionado a *S. turgidiscabies* con síntomas severos de la sarna de la papa en muchas partes del mundo (Hiltunen *et al.*, 2005). Por ejemplo, en Canadá las pérdidas de producción por sarna fueron de aproximadamente 18 millones de dólares en el año 2004 (Wanner, 2007). En Estados Unidos la mayoría de las variedades de papa que se cultivan son susceptibles a la sarna (Loria *et al.*, 1997). La sarna común es una enfermedad que afecta principalmente a la papa aunque otras plantas hospedantes como son la remolacha, trébol rojo, cacahuete, zanahoria, también se ven afectados por esta enfermedad (Song *et al.*, 2004).

El patógeno se disemina a través del suelo o tubérculos de papa y se adapta a suelos con pH neutro, la temperatura óptima para el crecimiento de *Streptomyces* es de 30°C (Loria et al., 1997). Se ha demostrado que, *Streptomyces scabies* es inhibida en suelos con humedad alta, por ello se recomienda riegos frecuentes para el control de la enfermedad (Wanner, 2007).

2.2.1.3 Síntomas de la sarna común de la papa

Los síntomas de la sarna común de la papa se caracterizan por lesiones levantadas en los tubérculos de aspecto corchoso color café (al menos tres especies de *Streptomyces* lo ocasionan, *S. scabies*, *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies*) (Wanner, 2009). La infección de *Streptomyces* se limita solo a la parte subterránea de la planta y la necrosis es a menudo el primer síntoma de esta enfermedad. A pesar de que se considera que la sarna común no afecta la parte aérea de la planta, los síntomas en la raíz pueden ser muy graves ocasionando marchitez o enchaparramiento de la planta (Loria et al., 1997).

Los síntomas usualmente asociados a *Streptomyces* son: erupciones en las lesiones del tubérculo (al menos tres especies de *Streptomyces* lo ocasionan: *S. scabies*, *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies*); picaduras en la superficie del tubérculo (algunos insectos pueden estar involucrados en la creación de lesiones profundas); aspecto corchoso y sarna color café (Figura 4) (Wanner, 2009).

Los diferentes síntomas que muestran los tubérculos de papa están asociados a la tolerancia o susceptibilidad de las variedades, aunque también está relacionado con la agresividad de la cepa patógena, etapa de infección y condiciones ambientales (Cullen et al., 2007). Los síntomas de sarna común pueden llegar a cubrir hasta el 100 % de la superficie de los tubérculos afectados (Loria et al., 1997).



Figura 4. Tubérculo de papa con síntomas de sarna común colectado en la Esmeralda, Guasave, Sinaloa.

2.2.1.4 Patogenicidad por fitotoxinas

Los síntomas de la sarna común son debido a las altas concentraciones de producción de fitotoxinas llamadas taxtomina. La taxtomina (4-nitroindol-3-yl-containing 2,5-dioxopiperazine) es una fitotoxina predominante que es producida por *S. scabies* y *S. acidiscabies* en el tejido del tubérculo de la papa (Leiner *et al.*, 1996), es un dipéptido cíclico que se ha sugerido como inhibidor de la síntesis de celulosa (Healy *et al.*, 2000), así como también conduce a importantes cambios en la pared celular, la producción de pectinas y hemicelulosa. Las taxtominas son únicas entre las fitotoxinas producidas por microorganismos, afectan el desarrollo primario de la pared celular y solamente se conocen por ser patógenas en *Streptomyces* (Loria *et al.*, 1997). La presencia o ausencia del gen txtAB está 100% relacionado con su patogenicidad (Wanner, 2006).

La infección ocurre principalmente a través de las lenticelas de los tubérculos, éstos son más propensos durante el periodo de crecimiento y comienza cuando el diámetro del tubérculo alcanza el doble del estolón y continúa por aproximadamente durante 6 a 8 semanas (Loria *et al.*, 1997).

2.2.1.5 Ciclo de vida de *Streptomyces* spp. causante de la sarna común de la papa

Streptomyces sobrevive en el suelo saprofitamente (Bukhalid *et al.*, 1998), afecta a los tubérculos a temprana edad a través de las lenticelas (aperturas naturales para el intercambio gaseoso en la epidermis) (Hiltunen *et al.*, 2008). La infección se inicia en la superficie del tubérculo ocasionándole manchas color marrón o rojizo, a medida que la enfermedad va aumentando y el tubérculo crece las lesiones se agrandan (3 a 4 mm), se necrosan y presentan un aspecto corchoso (Loria *et al.*, 1997). El patógeno sobrevive en las lesiones de los tubérculos que son almacenados, pero durante este tiempo de almacenamiento la enfermedad no se incrementa (Cullen, 2007). El inóculo que se encuentra en la superficie del tubérculo semilla produce la enfermedad, aunque en baja incidencia en los tubérculos de la nueva progenie. Algunos tubérculos semillas no presentan síntomas del patógeno aunque no indica que el patógeno no esté presente (Loria *et al.*, 1997).

2.2.1.6 Estrategias de control de la sarna común de la papa

El monocultivo incrementa la incidencia de la enfermedad, en cambio la rotación de cultivos con algunos cereales reduce la enfermedad de la sarna en el suelo, mas no lo erradica por completo. Se ha implementado también el uso de variedades resistentes a la sarna de la papa (Hiltunen *et al.*, 2005). Se recomienda el uso de tubérculos-semilla sanos que procedan de campos de papa sanos. El grado de humedad en el suelo (a capacidad de campo) durante el periodo de la formación de tubérculos (2 a 6 semanas) controla la enfermedad, en cambio la sequía incrementa la incidencia y la severidad de la sarna (Wanner, 2007). La sarna común de la papa puede ser controlada o suprimida en los suelos con pH inferiores a 5.5, debido a que este patógenos se desarrolla en pH de entre 5.5 a 8. Sin embargo, esta práctica reduce la producción del cultivo debido a debido a la disponibilidad de nutrientes minerales, ya que las plantas de papa prefieren pH de entre 5.8 y 6.5., además de que algunas especies como *S. turgidiscabies* toleran más bajo pH que *S. scabies* y puede desarrollarse a un pH

de 4.5 y *S. acidiscabies* puede crecer hasta en un pH de 4.0, este patógeno es el responsable de la enfermedad llamada sarna acida y está estrechamente relacionado con el patógeno de la sarna común (Hiltunen *et al.*, 2008).

La aplicación de estas medidas control en forma aislada no han generado resultados satisfactorios en el control de la enfermedad, por lo que su uso en un sistema de manejo integrado donde se incluyan estas y el control biológico ofrece mejores posibilidades del manejo de la enfermedad.

2.2.1.7 Detección molecular de *Streptomyces* spp.

La identificación de especies patógenas que afectan a la papa es de suma importancia para establecer estrategias adecuadas para su manejo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta valiosa para el diagnóstico de enfermedades de plantas. La técnica de PCR proporciona una alta sensibilidad y especificidad en la detección de fitopatógenos, y es una técnica relativamente simple en comparación con algunos de los métodos tradicionales disponibles para la caracterización de *Streptomyces* (Flores-González *et al.*, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

El estado de Sinaloa se ha destacado por ser el principal productor de papa en México, además de ser un proveedor importante para la industria de frituras. El cultivo de papa se ubica en las áreas de riego de la zona Norte del estado en los municipios de Ahome y Guasave. Las principales variedades que se cultivan son Alpha, Atlantic, Fianna y Diamante (SAGARPA-ASERCA, 2011).

En el ciclo agrícola de la papa 2008-2009 en Sinaloa, este cultivo se vió afectado en cuanto a su producción debido a que los tubérculos presentaron síntomas que los productores asociaron a la sarna común. No existen estudios previos que nos indiquen que la sarna común haya estado presente en México y en Sinaloa anteriormente, por lo que se especula que el patógeno pudo haberse introducido a la zona mediante tubérculo-semilla infectado.

El uso de agroquímicos para el control de patógenos ha sido la opción que muchos agricultores han utilizado; sin embargo, se ha demostrado que su uso no es una alternativa eficaz además que ocasionan graves daños a la salud, dañan al medio ambiente y representan un alto costo en los sistemas de producción.

Por ello resulta importante realizar estudios sobre identificación y caracterización del agente causal de la sarna común de la papa en Sinaloa debido a que son varias las especies causantes de la enfermedad y distintas sus condiciones de desarrollo. Los resultados del presente trabajo contribuirán a la creación de estrategias de manejo acordes a las condiciones de los agroecosistemas de la región.

4. HIPOTESIS

- *Streptomyces scabies* y *Streptomyces turgidiscabies* se encuentran asociadas a tubérculos de papa con síntomas de sarna común en Sinaloa.
- Antagonistas nativos de la rizosfera de papa en Sinaloa muestran efecto inhibitorio *in vitro* contra *Streptomyces* spp. asociadas a la sarna común.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecularmente *Streptomyces* spp. asociadas a la sarna común de la papa y evaluar *in vitro* antagonistas nativos de la rizosfera de papa en Sinaloa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar molecularmente a las especies de *Streptomyces* asociadas a la sarna común de la papa en Sinaloa.
- 2) Evaluar *in vitro* antagonistas nativos de la rizosfera del cultivo de papa para el control de la sarna común en el mismo hospedante en Sinaloa.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Colecta de muestras de tubérculos y suelo de la rizosfera de plantas de papa

Se colectó de 10 a 20 tubérculos de papa de 10 puntos de muestreo distribuidos en la zona productora de papa en el Norte de Sinaloa (Ahome, Guasave y El Fuerte). Para el muestreo de suelo de la rizosfera de papa se realizó el trazo de un cuadrante y de cada lote se obtuvo una muestra compuesta de 5 sub-muestras tomadas en las esquinas del cuadrante y en el centro del mismo. Las muestras de suelo se secaron por 24 horas exponiéndolas al aire y posteriormente se pasaron por un tamiz de 1 mm para eliminar material grueso del suelo; enseguida se homogenizaron y se almacenaron a 4°C para estudios subsiguientes.

6.2 Aislamiento de *Streptomyces* spp.

6.2.1 Aislamiento de *Streptomyces* spp. de la rizosfera de papa

Se tomó una porción de 5 g de la muestra compuesta de suelo para realizar una dilución serial y purificar los microorganismos presentes en el suelo. Los 5 g de suelo se disolvieron en 45 ml de agua destilada estéril, en un matraz estéril. Una vez que se homogenizó, se tomaron 100 µl de esta dilución (1×10^{-2}) y se agregó a un tubo de cultivo estéril de 15 ml con 9.9 ml de agua destilada estéril; hasta lograr una dilución de 10^{-7} . Se tomaron 100 µl de cada una de las diluciones y se sembraron por triplicado en cajas con medio de cultivo NPPC, selectivo para *Streptomyces*. Las siembras se incubaron a una temperatura de 28 °C. Las colonias se desarrollaron en las placas durante 14 días se transfirieron con ayuda de un asa y se resembraron en placas con medio Czapek con el fin de obtener aislados puros de 3 a 4 días a 28°C. Los aislados puros de las bacterias se transfirieron a medio líquido CRM y se incubaron durante 16 horas a 37°C, una vez crecido el aislado se tomaron 700 µl de éste y se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml el cual contenía 300 µl de glicerol, los tubos se etiquetaron y se almacenaron en un ultracongelador a -70°C.

6.2.2 Aislamiento de *Streptomyces* spp. de lesiones de tubérculos de papa

Para el aislamiento de *Streptomyces* a partir de lesiones de tubérculos de papa se tomaron pequeños trozos de tejido sintomático. Las muestras se sumergieron en alcohol al 96% por un minuto; se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril por un minuto; y posteriormente se colocaron con 200 µl agua destilada estéril durante 5 minutos. De la suspensión anterior se tomó una azada para sembrar por estriado en cajas petri con agar NPPC y se incubaron a 28°C, durante 15 días. Las colonias típicas de *Streptomyces* se transfirieron de nuevo a cajas petri con medio NPPC para su purificación y se preservaron en glicerol al 30% a -70°C (Pasarell *et al.*, 1992).

6.3 Identificación de *Streptomyces* spp.

Antes de realizar la identificación molecular se analizó el crecimiento de las colonias en agar NPPC y se realizó un escrutinio para descartar a los aislados que no presentaron las características morfológicas típicas de *Streptomyces* spp. Las colonias con características del género *Streptomyces* (colonias de color amarillento, rojizo o blanquecino de acuerdo al medio de cultivo usado y la especie actinomiceto presente) se utilizaron en el desarrollo de este trabajo (Hiltunen, *et al.*, 2008).

6.4 Extracciones de DNA

6.4.1 Extracción de DNA de aislados de *Streptomyces* spp.

La extracción de DNA de aislados se realizó siguiendo la metodología de Chen and Kou en el 1993. La bacteria se inoculó en medio LB y se incubó a 37 °C de 16 a 18 horas con agitación a 160 rpm. Posteriormente se transfirió a un tubo Eppendorf 1.5 µl del inóculo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 minutos. Se decantó el sobrenadante, se agregaron 1.5 µl más de inóculo al tubo Eppendorf y se volvió a realizar el mismo procedimiento las veces que fue necesario y quedándonos con las pastilla solamente. La pastilla se resuspendió en 200 µl de

buffer de lisis (40mM Tris-HCl, ácido acético pH 8.0, 1 mM EDTA) y se agitó. Posteriormente se le adicionó 20 µl de RNasa y se incubó a 37 °C durante 30 minutos para remover proteínas y restos celulares. Después se adicionaron 200 µl de NaCl 5M, se mezcló y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un tubo Eppendorf y se adicionó un volumen igual de cloroformo-álcohol isoamílico 24:1 a -20 °C. La mezcla se agitó en un vortex hasta obtener una solución lechosa y se centrifugó a 13,000 rpm por 8 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo y el DNA se precipitó con un volumen igual de isopropanol al 100% a -20 °C y se centrifugó a 13,000 rpm por 8 min, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70% a -20 °C y se centrifugó a 13,000 rpm por 4 minutos. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla que contenía el ácido nucleico. Finalmente, se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada estéril y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.4.2 Extracción de DNA de tejido de tubérculo de papa

Para extraer DNA total de tubérculos de papa con síntomas de la enfermedad se utilizó el método de extracción de CTAB al 3% (Zhang *et al.*, 1998). Se maceraron aproximadamente 0.3 gr. de tejido de tubérculo con síntomas de sarna común en tubos Eppendorf, con 200 µl de buffer CTAB al 3% (bromuro de cetil-trimetilamonio) el cual contenía 1.4 M de NaCl, 20 mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8.0 y 0.2% de mercaptotanol, previamente disuelto a 60 °C en baño de agua. Una vez disuelto el buffer CTAB al 3% se adicionó el mercaptotanol, antes de realizar la extracción. Al tejido macerado se le adicionó 600 µl de CTAB y se incubó a 60 °C por 30 min, agitándose por inversión cada 5 min. Una vez concluida la incubación se agregó 600 µl de cloroformo-isoamílico (24:1) y se agitó por inversión varias veces. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Se transfirió la fase superior acuosa a otro tubo. Se adicionó 7 µl de RNasa (1µg/µl) y se incubó por 30 minutos a 37°C. Se adicionó 600 µl de isopropanol frío al 100% (-20°C). Después de precipitar el DNA con isopropanol se centrifugó por 8 min a 13,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó por 4 min a 13 000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar

la pastilla que contenía los ácidos nucleicos. Finalmente, se resuspendió en 30 µl de agua biodestillada estéril y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.5 Electroforesis de DNA

Por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa se verificó la calidad del DNA obtenido. Se utilizó un gel de agarosa al 0.8 % en TAE 1X con bromuro de etidio (10 mg/µl). Al gel se cargaron 2 µl del DNA mezclado con 6 µl de agua destilada estéril y 2 µl del buffer de carga (colorante naranja G). Posteriormente se corrió en la cámara de electroforesis con el Buffer TAE 1X a 80 V por 25 - 30 min. Finalmente se visualizó el DNA en un transiluminador de luz ultravioleta y los resultados fueron registrados en un fotodocumentador de imágenes (GelDoc, Biorad).

6.6 Detección de *Streptomyces* spp. mediante PCR

Para la detección de *Streptomyces* spp. se utilizó los “primers” Sm6F (5´ - GGTGGCGAAGGCGGA -3´) y Sm5R (5´ -GAACTGAGACCGGCTTTTTGA-3´), (Monciardini *et al.*, 2002) que amplifican un fragmento de 620pb del gen 16S. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 ml con un volumen total de reacción de 25 µl conteniendo 1 X de buffer, 2 Mm de MgCl₂, 0.2 de nucleótidos trifosfatados (dNTP´s) y 1 unidad de taq DNA polimerasa (Invitrogen Cat. 18038-018). La mezcla se incubó en un termociclador automático (Cycler™, BIORAD, E.U.A.) bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 95° C por 5 min; 35 ciclos de 45 seg a 94° C, 45 seg a 65° C y 1 min a 72° C; y finalmente un ciclo a 72° C por 10 min.

Para la detección de especies patogénicas de *Streptomyces* se utilizó los “primers” Nf (5´ -ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGA -3´) y Nr (5´ - GCAGGTCGTCACGAAGGATCG-3´) (Bukhalid *et al.*, 1998) que amplifican un fragmento de 720 pb del gen de patogenicidad Nec1 (Figura 5). La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 ml con un volumen total de reacción de 25 µl conteniendo 1 X de buffer, 2 Mm de MgCl₂, 0.2 de nucleótidos trifosfatados

(dNTP's) y 1 unidad de taq DNA polimerasa (Invitrogen Cat. 18038-018). La mezcla se incubó en un termociclador automático (Cycler™, BIORAD, E.U.A.) bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C y 2 min a 72 °C; y finalmente un ciclo a 72 °C por 5 min.

Adicionalmente se utilizó los primers TxtAtB1 (5'-CCACCAGGACCTGCTCTTC-3') y TxtAtB2 (5'-TCGAGTGGACCTCACAGATG-3') (Wanner, 2006) que amplifican un fragmento de 385 pb del gen de patogenicidad TxtAB. La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 ml con un volumen total de reacción de 25 µl conteniendo 2 a 25 ng de DNA total, 1 X de buffer, 2 Mm de MgCl₂, 0.2 de nucleótidos trifosfatados (dNTP's) y 1 unidad de taq DNA polimerasa (Invitrogen Cat. 18038-018). La mezcla se incubó en un termociclador automático (Cycler™, BIORAD, E.U.A.) bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 95 °C por 5 min; de 40 a 42 ciclos de 20 seg de desnaturalización; etapa de alineamiento a 30 seg por 48 °C y extensión a 72 °C por 2 min. Finalmente un ciclo a 72 °C por 5min.

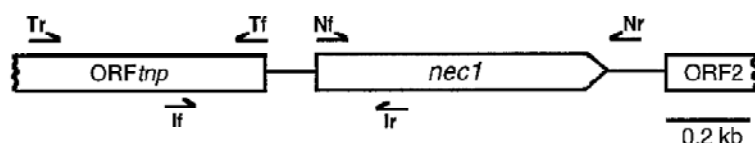


Figura 5. Mapa de la ubicación de los oligonucleótidos en los genes *nec1*, *ORFtnp* y *ORF2*

Se utilizó primers específicos para *S. scabies*, ScabI (5' - CAACACTCTCGGGCATCCGA -3') y ScabII (5' -TTCGACAGCTCCCTCCTTAC -3') que amplifican un fragmento de 1278 pb en la región 16S rDNA; para *S. turgidiscabies*: TurgI (5' -CCTCGCATGGGGGTGGGTTA -3') y TurgII (5' -CGACAGCTCCCTCCCCGTAA -3') que amplifican un fragmento de 1273 pb en la región 16S rDNA y para *S. aureofaciens*: AurI (5'-TCCGCATGGGGGTGGGTG-3') y AurII (5'-TGTGAGTCCCCGACATTACT-3'), que amplifican un fragmento de 943 pb en la región 16S rDNA (Lehtonen *et al.*, 2004). La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 ml con un volumen total de reacción de 25 µl conteniendo 100 ng de DNA total, 1 X de buffer, 2 Mm de MgCl₂, 0.2 de nucleótidos

trifosfatados (dNTP's) y 1 unidad de taq DNA polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Brazil). La mezcla se incubó en un termociclador automático (iCycler-BioRad) bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 95° C por 5 min; posteriormente 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 80 seg y 72 °C por 6 minutos. La temperatura de alineamiento para el caso de *S. scabies*, *S. turgidiscabies* y *S. aureofaciens* fue de 59, 61 y 59°C, respectivamente.

6.7 Electroforesis de los productos amplificados

Para la visualización de los productos de PCR se preparó geles de agarosa al 1%. Primeramente la agarosa se disolvió en 50 ml de TAE 0.5 X (40mM Tris-HCl, ácido acético pH 8.0, 1 mM EDTA) mediante calor en un horno de microondas por un minuto aproximadamente; cuando su temperatura fue de 45°C se le agregó 1µl de bromuro de etidio (10 mg/µl); se vertió en la base de la cámara de electroforesis, una vez que la agarosa solidificó se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió el gel con buffer TAE 0.5. En cada pozo se cargó 2µl de buffer de carga y 8µl de muestra. Se empleó el marcador de peso molecular de 1kb DNA Ladder Pluss (Invitrogen, EUA, Cat. No. 15628-019). El proceso de electroforesis se realizó con un voltaje de 85 V por un tiempo aproximado de 45 min. Finalmente se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta y se colocó en un fotodocumentador de imágenes (Gel Doc, Biorad, E.U.A., Serie 76S/07929).

6.8 Clonación y secuenciación de *Streptomyces* spp.

6.8.1 Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor del Kit Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega). Se corrió un gel de agarosa con las muestras utilizando protocolos descritos anteriormente en este trabajo. Primeramente se cortaron las bandas del gel cuidando que el tiempo de irradiación fuera el mínimo y se registró el peso del producto cortado. Al tubo Eppendorf con la banda de interés se le agregó 10 µl de membrane binding Solution por cada 100 mg de gel de agarosa (v:v), se agitó en

un vortex, la mezcla se incubó de 50-60 °C por 10 minutos o hasta que la agarosa se disolvió por completo, se agitó de nuevo en vortex cada 2 minutos aproximadamente con la finalidad de aumentar el radio de contacto. Se centrifugó por un periodo corto de tiempo para bajar el líquido de las paredes y en la tapa del tubo. La mezcla del gel disuelto se transfirió a la columna ensamblada y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. Después se centrifugó la columna a 14,000 rpm por 1 minuto y se eliminó el líquido que pasó al tubo colector. Posteriormente se lavaron las columnas y se le adicionaron 700 µl de solución de lavado y se centrifugó de nuevo a 14,000 rpm por 1 minuto; se eliminó lo retenido en el tubo colector, el lavado se repitió ahora con 500 µl de solución de lavado y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó cuidadosamente lo retenido en el tubo colector y se centrifugó nuevamente con la columna ensamblada por 1 minuto a 14,000 rpm. Se transfirió la columna a un tubo nuevo y se le adicionaron 30 µl de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna cuidando de no picar la membrana con la punta de la pipeta. Se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y después se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. Finalmente se decantó la microcolumna y se almacenó el DNA de a -20°C. Para corroborar la recuperación del DNA, se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% con 2 µl de DNA purificado, 6 µl de agua bidestilada estéril y 2 µl de buffer de carga (colorante G) para la visualizar la banda de DNA.

6.8.2 Ligación de productos de PCR

Los fragmentos de DNA amplificados por PCR y purificados se ligaron en el vector de clonación pGEM-T Easy Vector System (Promega, Cat. No. 157348, EUA). Este vector posee en los extremos una base de timinas y el fragmento amplificado por PCR, posee extremos con adeninas y por complementariedad y con la acción de la enzima ligasa, el fragmento de PCR se une al vector formándose una molécula de DNA circular. El procedimiento se realizó de la siguiente manera: Se mezclaron 4 µl de DNA amplificado por PCR y purificado, 0.5 µl de vector (25 ng/ml), 5.0 µL de buffer de clonación (2X), 1 µl de T4 DNA ligasa (3 U/µl) y 2.0 µl de agua biodestilada estéril. Posteriormente se dejó incubar

la reacción a 4 °C durante toda la noche. El producto de la ligación se utilizó para el proceso de transformación de *E. coli*.

6.8.3 Transformación de células competentes

La transformación se realizó mediante el procedimiento descrito por el proveedor del kit pGEM-T Easy II Vector System (Promega Madison, WI, USA). Para el proceso de transformación se utilizaron cajas petri (dos por cada ligación) con LB sólido, ampicilina (100 mg/ml), IPTG (200ng/ml) (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida) y X-Gal (20 ng/ml) (5-bromo-4cloro-3-indol- β -D-galactopiranosida). Las células competentes de *E. coli* (JIM 109, Cat. No. L2001, Promega) se descongelaron sobre hielo agitándose cuidadosamente por inversión. En un tubo Eppendorf se colocaron entre 2 y 5 μ l de la reacción de ligación (dependiendo de la intensidad de la banda purificada). Posteriormente, se adicionaron 50 μ l de células competentes. Se mezcló la reacción golpeando ligeramente los tubos con los dedos. Rápidamente se colocaron los tubos en hielo por 20 min, e inmediatamente se les dio un choque térmico por aproximadamente 45-50 seg en baño maría a 42° C (sin agitación). Finalmente se regresaron los tubos al hielo por dos min, se agregaron 900 μ l de medio SOC (1% de triptona, 0.5 % de extracto de levadura, 8.5 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 0.01 mM de MgCl₂, 0.02 mM de glucosa) a los tubos que contenían las células transformadas con las reacciones de ligación y por último se incubaron a 37 °C con agitación a 160 rpm por 1.5 horas.

6.8.4 Extracción de DNA plasmídico (Miniprep)

Las células transformadas (colonias de color blanco) se incubaron por 16 horas en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina a 37 °C con agitación a 160 rpm. Posteriormente se tomaron 1.5 μ l del cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 10, 000 rpm por 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 100 μ l de la solución 1 (50 mM Glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris HCl pH 8.0 y 1 mg/ μ l de RNasa). Se resuspendió invirtiendo el tubo 5 veces, se le agregaron 200 μ l de solución 2(75 μ l de agua, 20 μ l de 1N NaOH y 5 μ l de 20% SDS), se

homogenizó por inversión, se agregaron 150 µL de solución 3 (24.6 g. de acetato de sodio y pH de 8.0), se mezcló por inversión y se centrifugó a 10,000 rpm por 8 minutos y se decantó el sobrenadante. Se lavó la pastilla agregando al tubo 1 ml de alcohol etílico al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm por 3 min. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente eliminando el alcohol. Finalmente se resuspendió la pastilla con 30 µl de agua ultra pura (Birboin y Doly, 1979).

6.8.5 Purificación de DNA plasmídico

Para la extracción del DNA plasmídico se cultivaron las células transformadas (colonias de color blanco) por 16 horas en LB líquido con ampicilina a 37 °C y se agitaron a 160 rpm. La extracción del DNA plasmídico se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del kit Rapid Plasmid Miniprep Purificación Systems (Marlingen Bioscience 50 cat. No 11453-016 Germany/USA)

6.8.6 Restricción del DNA plasmídico

Para comprobar la presencia del fragmento ligado en el vector de clonación, se realizó una reacción de restricción con la enzima *EcoR1* (4.8 µL de agua ultrapura, 1 µL de Buffer 10X, 0.2 µL de la enzima *EcoR1* (40 U/µL) y 4 µL DNA plasmídico). La reacción se incubó por 2 horas a 37°C y se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Como referencia se utilizó como marcador de peso molecular 1 kb plus (invitrogen, E.U.A.).

6.8.7 Cuantificación de DNA

La cuantificación de DNA total se realizó con el Kit comercial Quant-it dsDNA HS (Invitrogen Life Technologies, Brazil). En un tubo Falcón se preparó la solución de trabajo diluyendo el fluoróforo (picogreen) en el buffer (1:200). Para los estándares, en tubos Eppendorf de 600 µl se colocaron 190 µl de la solución de trabajo y 10 µl de cada estándar, agitandose por dos a tres segundos. Para las

muestras de DNA a evaluar se adicionaron 199 μL de la solución de trabajo y 1 μL de DNA total (dilución 1:5). Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 2 min. Posteriormente se procedió a la calibración del fluorómetro (Qubit, Invitrogen, Life Technologies, Brazil) con los dos estándares y se tomó la lectura para cada muestra. Los valores dados por el fluorómetro son en ng/ml. Para calcular la concentración de las muestras se utilizó la siguiente ecuación:

$$[DNA] = QF \left(\frac{200}{X} \right)$$

Donde

QF = Valor dado por el fluorómetro

X = Número de μL de DNA adicionados a cada tubo Eppendorf durante el ensayo

6.8.8 Secuenciación y análisis

La secuenciación de los productos directos de PCR se realizó utilizando el kit Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, empleando un secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA) en el laboratorio de Química de DNA del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.

Las secuencias se compararon con secuencias reportadas en el Banco de genes (GenBank) del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI-National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nih.gov/>), empleando el programa BLAST-N de dicho sitio para conocer el porcentaje de identidad genética existente con secuencias ya reportadas y depositadas en el banco.

Para la comparación de las secuencias de los genes se utilizó el programa MegAlign del software DNASTAR Lasergene (versión 7.0 Madison, Wisconsin, USA).

6.9 Pruebas *in vitro* y cinéticas de crecimiento

6.9.1 Efecto inhibitorio *in vitro* de bacterias de la rizosfera de papa contra especies de *Streptomyces*

Para la realización de ensayos *in vitro* se retaron organismos nativos del Norte de Sinaloa con potencial antagonista contra especies de *Streptomyces* asociadas a la sarna común de la papa (cuadro 2). Los bioensayos se realizaron utilizando la técnica descrita por Hiltunen *et al.*, 2008. La cepa de *Streptomyces acidiscabies* se sembró en toda la placa de medio AB, con la ayuda de un orador se tomó un disco de agar de esta misma caja y en el orificio del agar se inoculó al posible antagonista contra el patógeno de la sarna común que previamente habían sido crecidos en medio LB liquido a 30°C durante 16h a excepción de *Streptomyces coelicolor* que fue crecida a la misma temperatura pero en medio de cultivo CRM durante 2 días. Se realizaron cuatro repeticiones de cada caja y se incubaron por 5 días a 28°C. Se recurrió al diseño experimental completamente al azar, este tipo de diseño permitió determinar la diferencia en la efectividad de los posibles antagonistas contra *Streptomyces scabies*. Para determinar la efectividad biológica de los antagonistas contra la especie de *Streptomyces* se midió el halo de inhibición.

Cuadro 2. Aislados de especies nativas de rizosfera de papa en el Norte de Sinaloa

AISLADO	ORIGEN
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Palos Blancos, Guasave. Sinaloa
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	El Fuerte. Sinaloa
<i>Bacillus megaterium</i>	La Pilarica, Ahome. Sinaloa
<i>Bacillus pumilus</i>	Palos Blancos, Guasave. Sinaloa
<i>Bacillus subtilis</i>	Porofino, Ahome. Sinaloa
<i>Bacillus simplex</i>	Campo 35, Ahome. Sinaloa
<i>Bacillus thuringiensis</i>	La Pilarica, Ahome. Sinaloa
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	La Pilarica, Ahome. Sinaloa
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Palos Blancos, Guasave. Sinaloa
<i>Pseudomonas lini</i>	La Esmeralda, Guasave. Sinaloa
<i>Streptomyces coelicolor</i>	La Esmeralda, Guasave. Sinaloa

6.9.2 Cinética de bacterias antagonistas a especies de *Streptomyces* patogénicas

Se tomó una azada de bacterias antagonistas y se sembró en 5 ml de medio LB o CRM dependiendo de la bacteria y se incubó a 30°C y rotación constante a 200 rpm durante 16 h. Posteriormente se tomaron 500µl del cultivo de bacterias antagonistas a *Streptomyces acidiscabies* y se sembraron en 50 ml de medio LB o CRM líquido a 30°C a 200 rpm. Se tomó 1 ml de los antagonistas a diferentes tiempos (Cuadro 3). Finalmente se midió la absorbancia (DO) a 595 nm durante las 128 horas que duró el experimento.

Cuadro 3. Periodos de incubación después de la siembra a los que se midió absorbancia para cada antagonista a especies patogénicas de *Streptomyces*

HORAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA	ANTAGONISTA
0	Los 11 antagonistas
3	Los 11 antagonistas
6	Los 11 antagonistas
9	Los 11 antagonistas
12	Los 11 antagonistas
15	Los 11 antagonistas
18	Los 11 antagonistas
23	Los 11 antagonistas
27	Los 11 antagonistas
31	Los 11 antagonistas
35	Los 11 antagonistas
39	Los 11 antagonistas
48	Los 11 antagonistas
57	<i>S. coelicolor</i>
80	<i>S. coelicolor</i>
96	<i>S. coelicolor</i>
104	<i>S. coelicolor</i>
120	<i>S. coelicolor</i>
128	<i>S. coelicolor</i>

6.9.3 Conteo de UFC de organismos antagonistas a *Streptomyces* spp.

Después de los respectivos periodos de incubación se tomó 1 ml de cada matraz con los antagonistas y se depositaron en un tubo Eppendorf, posteriormente se realizó la cuantificación de UFC. Del tubo anterior se tomaron 100 µl y depositaron en un tubo Eppendorf nuevo mas 900 µl de agua destilada. Se agitó muy bien para que se mezclara el inóculo junto con el agua y lograr la dilución 1×10^{-1} ; y así sucesivamente hasta lograr diluciones de 1×10^{-3} a 1×10^{-7} dependiendo del organismo. Después de haber preparado las diluciones se mezcló nuevamente cada tubo y se tomaron 100 µl de la dilución, se realizó la siembra en las placas,

las cuales se incubaron a 28°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se contaron las colonias por cada caja.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Localidades de muestreo

Se colectaron de 10 a 20 tubérculos de papa y 3 kg aproximadamente de suelo de la rizosfera de plantas de papa en aéreas productoras de dicho tubérculo en Sinaloa (Cuadro 4). Cabe recalcar que estos sitios fueron seleccionados debido a reportes previos de sarna común de la papa por los agricultores de esas regiones (Figura 6).

Cuadro 4. Muestras de tubérculo de papa y suelo de la rizosfera colectados en el Norte de Sinaloa

Estado	Municipio	Origen	Coordenadas	Número de tubérculos colectados
Sinaloa	Ahome	Zona Industrial	N 25°47'54.0" W108°54'15.6"	15
		Pilarica	N 25°48'22.2" W108°56'21.2"	10
		Santa Rosa	N 25°53'03.9" W108°51'16.9"	10
		Claralú	N 25°48'12.9" W108°56'0.54"	12
		Porofino	N 25°51'22.2" W108°52'34"	15
	Guasave	Palos Blancos	N 25°31'01.9" W108°18'45.5"	17
		Ruiz Cortines	N 25°43'27.5" W108°43'56.8"	20
		Las Colonias	N 25°53'45.3" W108°53'04.8"	14
		La Esmeralda	N 25°30'17.0" W108°22'25.1"	16
	El Fuerte	Pingüinos	N 25°50'27.8" W108°55'08.9"	12

Todas las muestras se colectaron en el Norte de Sinaloa y se obtuvieron durante el ciclo agrícola 2009-2010.

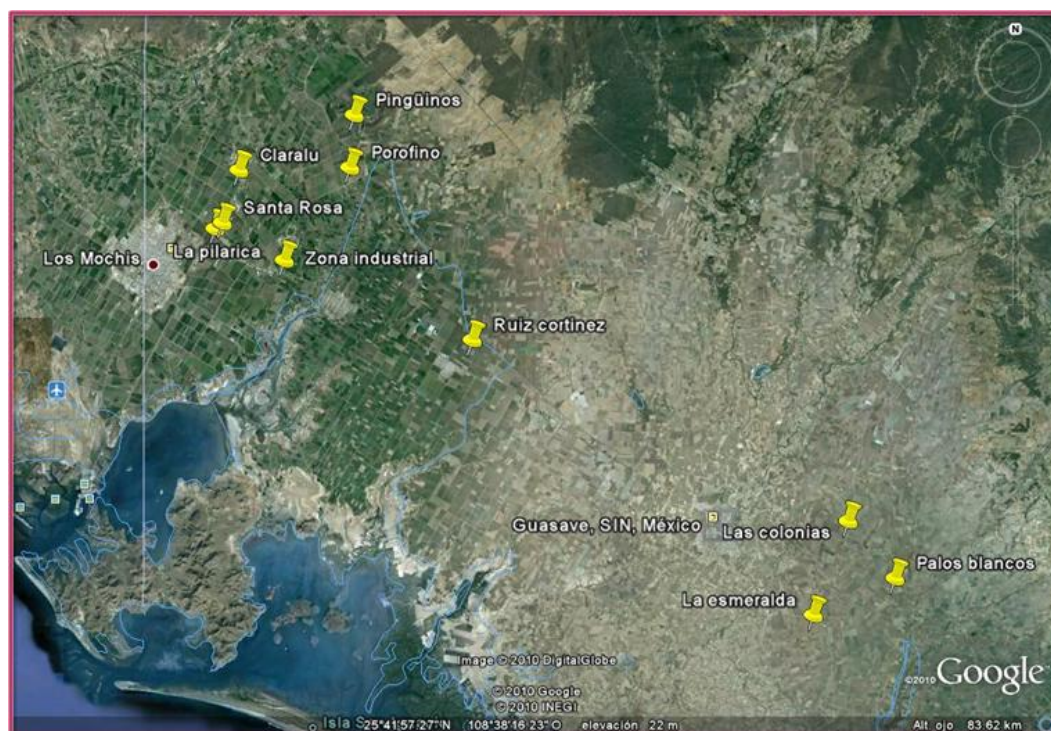


Figura 6. Ubicación de sitios de muestreo en diferentes zonas productoras de papa en la región Norte del estado de Sinaloa

7.2 Sintomatología observada en follaje y tubérculos de papa

Los tubérculos muestreados en los municipios de Ahome, Guasave y El Fuerte mostraron los síntomas típicos de la sarna común de la papa (Figura 7). La severidad de la enfermedad fue evidente pues los tubérculos presentaban en su superficie distintos daños por sarna.

Los síntomas observados en los tubérculos de papa provenientes de las 10 localidades paperas fueron manchas color café claro de aspecto poroso, corchoso y erupciones en la epidermis así como algunas partes necróticas, estos síntomas en los tubérculos analizados concuerdan con los reportados por (Hiltunen, 2005), estos presentaban síntomas parecidos a los encontrados en este trabajo.



Figura 7. Tubérculos de papa con daños por sarna común

Los síntomas en follaje de plantas de papa no han sido bien documentados, usualmente se reconoce que este patógeno no ocasiona daños el área foliar de las plantas de papa y se limita solamente a síntomas en los tubérculos (Flores-González, 2008). En cambio Wanner (2009) reporta que puede haber daños en tallos subterráneos y en estolones de tejidos conductores a causa de la enfermedad de la sarna que pueden ser tan severos que interrumpen estos conductos, ocasionando síntomas foliares similares a los asociados a enfermedades virales. Todas de las plantas de papa colectadas para este trabajo se encontraban con algunos síntomas que podrían asociarse a virus o deficiencias de algunos nutrientes; sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que estos síntomas en el follaje sean ocasionados por el patógeno de la sarna común. Los daños ocasionados por esta enfermedad son variados y dependen del tiempo que prevalezcan las condiciones que favorezcan su desarrollo.

7.3 Aislamiento y clasificación de *Streptomyces* spp.

7.3.1 Aislados de *Streptomyces* spp. de rizosfera y tubérculos de papa en Sinaloa

En medio NPPC (Nistatina, Polimixina, Penicilina y Ciclohexamida) se aislaron Actinomicetos tanto de diluciones seriales de rizosfera como de tubérculos de papa con síntomas de sarna común, observándose una amplia diversidad fenotípica de las colonias, pues variaron de circulares hasta amorfas presentando diferentes coloraciones (Figura 8). Las características corresponden a especies de *Streptomyces* consignadas en la literatura especializada (Conn, *et al.*, 1998).

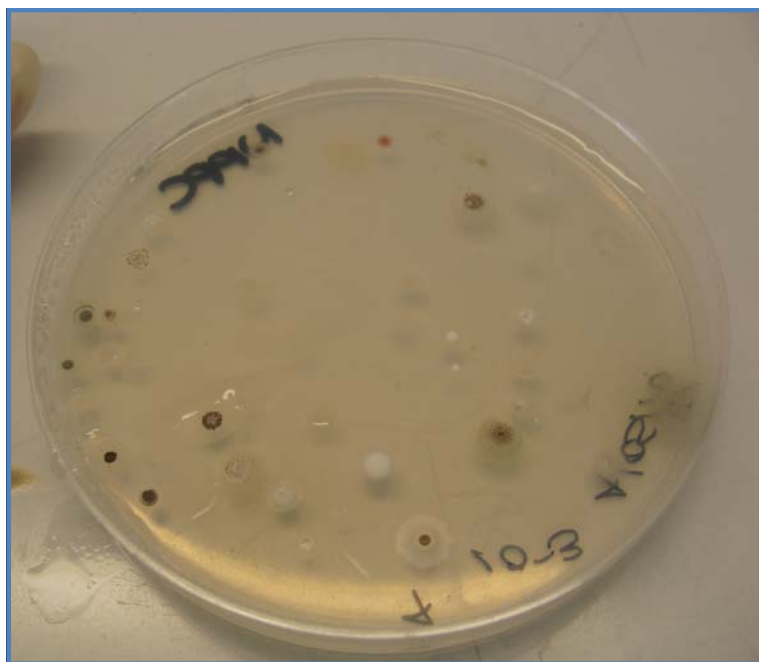


Figura 8. Aislados de *Streptomyces* spp. en medio NPPC

Para el caso de rizosfera de plantas de papa se obtuvieron un total 1130 aislados de los cuales 364 correspondieron a las cuatro localidades del municipio de Guasave (Palos Blancos, Ruiz Cortines, Las Colonias y La Esmeralda), 655 aislados en las cinco localidades del municipio de Ahome (Zona industrial, Pilarica, Claralú, Porofino y Santa Rosa) y en una localidad del municipio de El Fuerte (Pingüinos) 111 aislados de *Streptomyces* spp. (Cuadro 5). Cabe recalcar

que el mayor número de aislados (14%) se obtuvo en el predio Santa Rosa, Ahome Sinaloa (Figura 9).

Cuadro 5. Aislados de especies de *Streptomyces* obtenidos de rizosfera de papa en el Norte de Sinaloa

Localidad	No de aislados
Palos Blancos	65
Pingüinos	111
Ruiz Cortines	94
Las Colonias	76
Zona Industrial	108
Porofino	147
Santa Rosa	155
Claralú	125
Pilarica	120
La Esmeralda	129

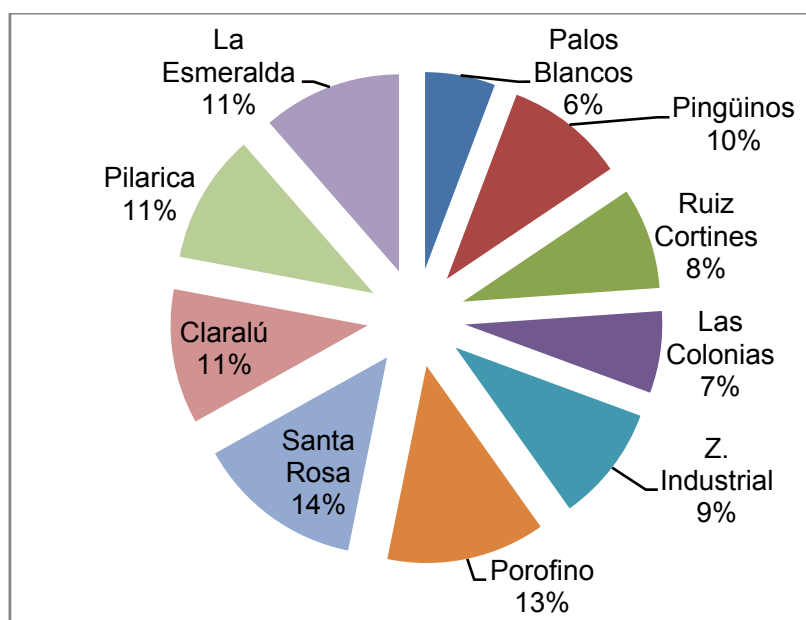


Figura 9. Porcentaje de aislados de *Streptomyces* spp. obtenidos de rizosfera de plantas de papa en el Norte de Sinaloa

También se obtuvieron 41 aislados de *Streptomyces* spp. de tubérculos de papa de las diferentes localidades productoras de papa en la región norte del estado de Sinaloa (Cuadro 6). En cuatro localidades del municipio de Guasave (Palos Blancos, Ruiz Cortines, Las Colonias y La Esmeralda) se obtuvieron 23 aislados de *Streptomyces* spp; en cinco localidades del municipio de Ahome (Zona industrial, Pilarica, Santa Rosa, Claralú y Porofino) se obtuvieron 16 aislados y en una localidad del municipio de El Fuerte (Pingüinos) solo 2 aislados.

Cuadro 6. Aislados de especies de *Streptomyces* obtenidos de tubérculos de papa con síntomas de sarna en el Norte de Sinaloa

Localidad	No de aislados
Palos Blancos	3
Pingüinos	2
Ruiz Cortines	13
Las Colonias	5
Zona Industrial	3
Porofino	4
Santa Rosa	2
Claralú	3
Pilarica	4
La Esmeralda	2

En la localidad de Ruiz Cortines del municipio de Guasave se logró aislar un total de 32% de aislados, resultando ser esta la localidad donde se aisló el mayor número de *Streptomyces*. Mientras que en la localidad de La Esmeralda el número de aislados fue menor con un 7% del total de los aislados de tubérculos con síntomas de sarna común (Figura 10).

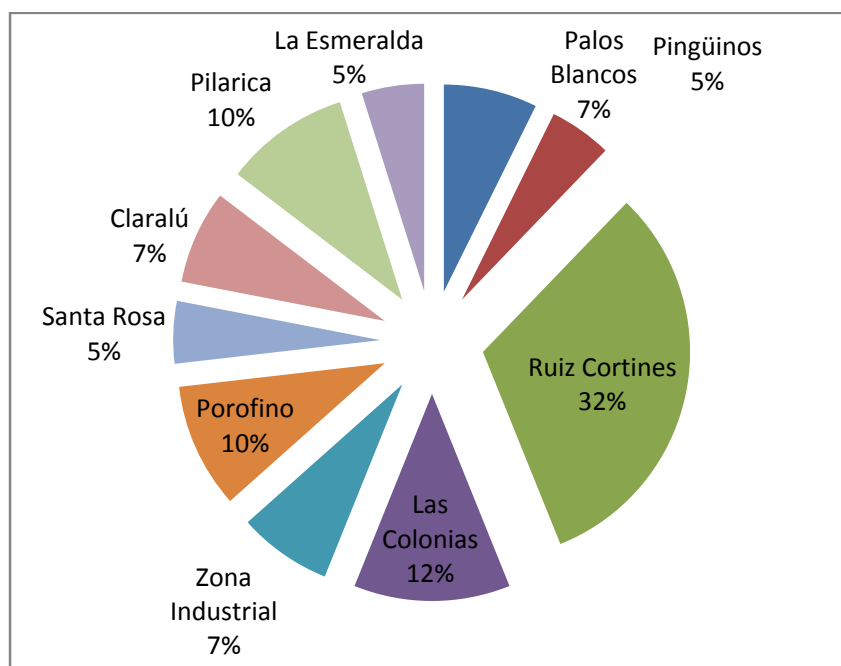


Figura 10. Porcentaje de aislados de *Streptomyces* spp. obtenidos de tubérculos de papa con síntomas de sarna común en el Norte de Sinaloa

7.3.2 Morfotipos de *Streptomyces* spp. aislados de rizosfera y tubérculos de papa

Los 1171 aislados de *Streptomyces* de las 10 localidades del Norte de Sinaloa se clasificaron de acuerdo a su morfología (color, forma, tamaño), observándose 22 morfotipos distintos (Figura 11).

Figura 11. Diferentes morfotipos de *Streptomyces* spp. aislados de tubérculo y rizosfera de papa en Sinaloa

7.4 Técnicas moleculares

7.4.1 Extracción de DNA de los aislados de *Streptomyces* spp.

Se obtuvo buena concentración de DNA de *Streptomyces* spp. obtenidos de rizosfera de plantas de papa (Figura 12).

Figura 12. DNA genómico total extraído de aislados de *Streptomyces* provenientes de suelo de la rizosfera de papa por el método de Chen and Kuo (1993)

En cambio la extracción de DNA directamente del síntoma de sarna de los tubérculos fue de muy mala calidad y en algunos casos nada de concentración de DNA. Esto se debió a que las muestras fueron tomadas de las zonas corchosas de la epidermis de los tubérculos y en esta zona es muy difícil obtener DNA debido a que la zona corchosa está formada por epidermis seca (células muertas)

debido al efecto de la fitotoxina producida por especies patógenas de *Streptomyces*. Además que el patógeno de la sarna se desarrolla en la parte debajo de la epidermis de los tubérculos. Posteriormente se realizó una nueva extracción de DNA solamente que esta vez las muestras fueron tomadas exclusivamente de la parte donde se encontraba el patógeno, descartando la parte superficial del tubérculo sintomático, obteniéndose así una buena concentración y calidad del DNA (Figura 13), en un tiempo de aproximadamente dos horas y media.

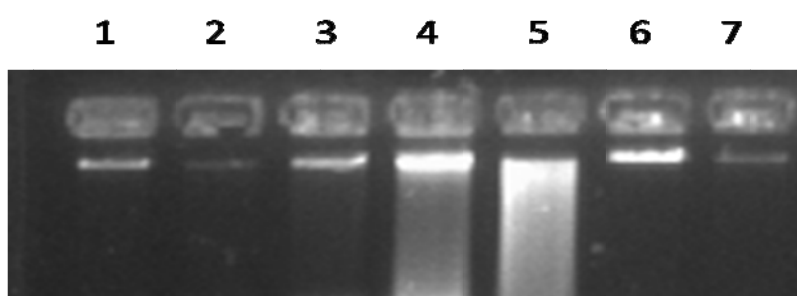


Figura 13. DNA genómico total extraído de aislados de *Streptomyces* provenientes de tubérculos de papa por el método de Zhang (1998)

Para la obtención de un DNA de *Streptomyces* spp. aislados de tubérculos de papa se procedió a sembrar las lesiones de sarna común directamente en el medio de cultivo NPPC y de ahí se obtuvieron aislados únicos de *Streptomyces* con mejor calidad y concentración de DNA que las extracciones obtenidas a partir de tejido de tubérculo.

7.6 Detección molecular de *Streptomyces* spp. en rizosfera de papa en Sinaloa

Mediante la técnica de PCR se detectaron cepas patógenas de *Streptomyces* presentes en la rizosfera de papa en las localidades muestreadas del Norte de Sinaloa, amplificándose el fragmento esperado de 720 pb del gen Nec1 de *Streptomyces* patogénicas (Figura 14).

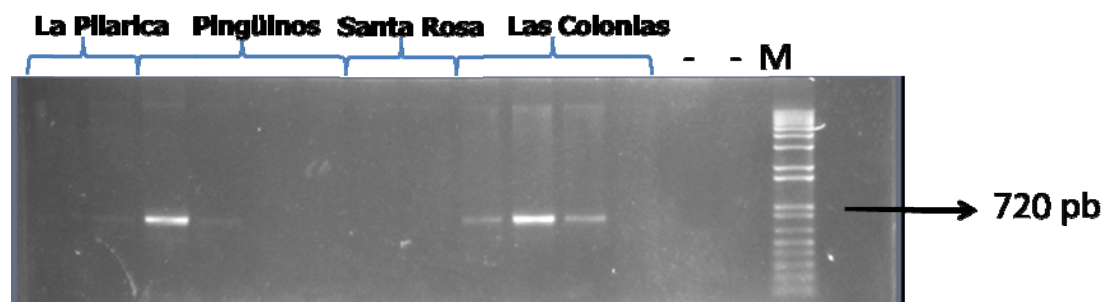


Figura 14. Detección por PCR con el gen *Nec1* de *Streptomyces* patogénicas aisladas de rizosfera de papa. La amplificación se realizó en el gen *Nec1* de *Streptomyces* patogénicas con el par de primers Nf y Nr que amplifican un fragmento de 720 pb. Carriles 1-2, La Pilarica; 3-6, Pingüinos; 7-8, Santa Rosa; 9-12, Las Colonias; (-) testigo negativo; M, Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen Life Technologies, Brazil).

En las localidades de Porofino, Palos Blancos, Pingüinos y Claralú se lograron detectar 2 aislados por localidad correspondieron a especies patogénicas de *Streptomyces* con los primers de patogenicidad de *Streptomyces* (Nf y Nr). Para el caso de Las Colonias y la Zona industrial 6 fueron los aislados detectados con los primers de patogenicidad. Solamente se obtuvo un aislado positivo en la localidad de Santa Rosa. En La Pilarica y La Esmeralda se obtuvieron 3 y 5 aislados positivos. Finalmente en Ruiz Cortines se obtuvieron 4 detecciones y una de ellas resultó ser positiva para *Streptomyces scabies* mediante primers específicos para esta especie.

Los morfotipos de los aislados positivos para todas las comunidades fueron 1, 2, 3, 4 y 18. El morfotipo 2 presenta dos halos de color café y finalmente un halo de color blanco, en cambio el morfotipo 18 presenta un crecimiento aglomerado color negro, la morfología del morfotipo 4 presenta varios halos color blanco, para el caso del morfotipo 3 fue el que resultó positivo con primers específicos para *Streptomyces scabies* mediante PCR, su morfología es parecida al de una telaraña color negro esto concuerda con lo descrito por Coombs en el 2003 que logró aislar e identificar morfológicamente especies de *Streptomyces scabies*. Finalmente el morfotipo 1 tiene una morfología en forma de telaraña color blanco. Todo lo anterior nos dice que las cuatro especies patógenas distintas entre ellas ya que presentan morfologías totalmente distintas. El morfotipo 2 está presente en

todas las localidades donde fue detectado el patógeno (Cuadro 7) y pertenece morfológicamente a *Streptomyces acidiscabies* (Wanner, 2006).

Cuadro 7. Detección de especies de *Streptomyces* patógenicas mediante PCR aisladas de rizosfera de papa en Sinaloa.

Localidad	Municipio	Total aislados	Número de aislados detectados por PCR				Morfortipos Positivos
			primers Nf-Nr	primers Scab	Primers Turg	Primers Aur	
Palos Blancos	Guasave	65	2	0	0	0	2 y 18
Pingüinos	El Fuerte	111	2	0	0	0	2 y 4
Ruiz Cortines	Guasave	94	4	1	0	0	3, 2
Las Colonias	Guasave	76	6	0	0	0	1, 2
Zona Industrial	Ahome	108	6	0	0	0	2
Porofino	Ahome	147	2	0	0	0	2
Santa rosa	Ahome	155	1	0	0	0	2
Claralú	Ahome	125	2	0	0	0	1 y 2
Pilarica	Ahome	120	3	0	0	0	2
La Esmeralda	Guasave	129	5	1	0	0	2

7.4.2 Detección molecular de *Streptomyces* spp. en tubérculos de papa en Sinaloa

Se detectaron cepas patógenas de *Streptomyces* presentes en tubérculos de papa en la mayoría de las localidades muestreadas del Norte de Sinaloa, amplificando el fragmento esperado de 720 pb del gen Nec1 de *Streptomyces* patógenicas (Figura 15).

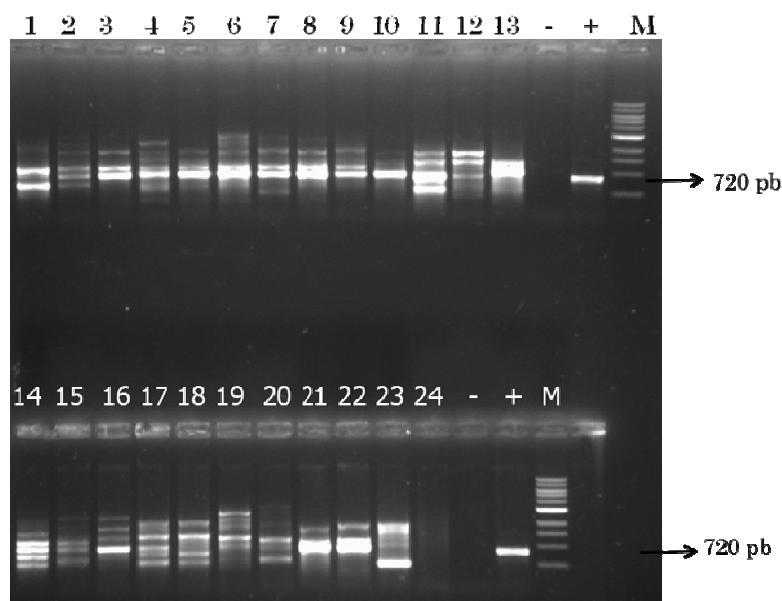


Figura 15. Detección por PCR con el gen Nec1 de *Streptomyces* patogénicas aisladas de tubérculos de papa. La amplificación se realizó en el gen Nec1 de *Streptomyces* patogénicas con el par de primers Nf y Nr que amplifican un fragmento de 720 pb. Carriles 1-2, Ruiz Cortinez; carriles 3-6, Zona industrial, carriles 7-9, igual para todos Pingüinos, 10; Las Colonias, 11; Palos Blancos, 12; Las Colonias, 13-14; Pingüinos, 15; Las Colonias, 16; Santa Rosa, 17-18; Palos Blancos; 19; Ruiz Cortines, 20; Porofino, 21-22; Zona industrial, 23-24; La Esmeralda, testigo negativo (-), testigo positivo (+), M, Marcador de peso molecular de 1Kb plus (Invitrogen Life Technologies, Brazil)

Las bandas inespecíficas que se logran identificar en el PCR se deben a que la extracción de DNA fue realizada directamente de las lesiones con sarna común de los tubérculos, no se realizó de un único aislado. Por lo cual se decidió realizar una nueva extracción de DNA de aislados puros y un PCR cambiando los primers que amplifican el gen Nec1 por los primers TXTATB1 y TXTATB2 que amplifican los genes TxtA y TxtB de un fragmento de 385 pb. Se logró identificar dos aislados positivos denominados CT33 y CT35 (Figura 16), correspondientes a la localidad de La Esmeralda, Guasave, Sinaloa.

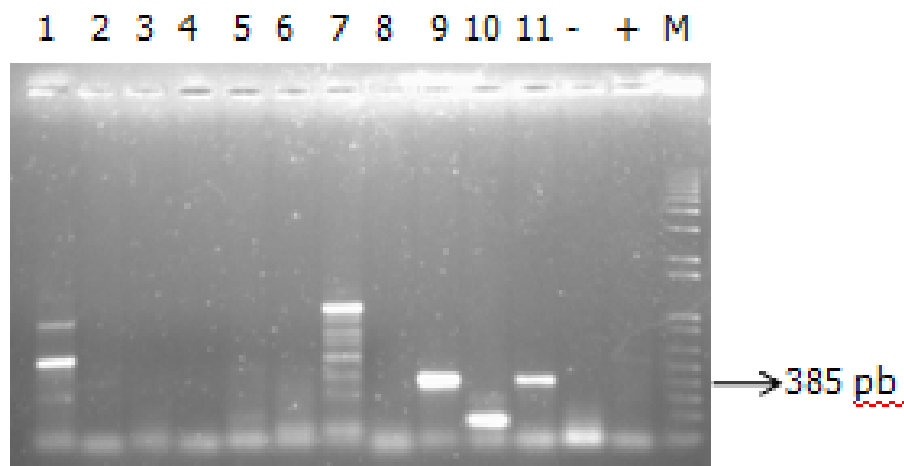


Figura 16. Detección por PCR con el gen TxtAtB de *Streptomyces* patogénicas aisladas de tubérculos de papa. La amplificación se realizó en el gen TXTATB de *Streptomyces* patogénicas con el par de primers TXTATB1 y TXTATB2 que amplifican un fragmento de 385 pb. Carril 1; CT25, 2; CT26, 3; CT27, 4; CT28, 5; CT29, 6; CT30, 7; CT31, 8; CT32, 9; CT33, 10; CT34; 11; CT35, testigo negativo (-), testigo positivo (+), M, Marcador de peso molecular de 1Kb plus (Invitrogen Life Technologies, Brazil)

En los tubérculos de papa colectados en Ruiz Cortines, Las Colonias, Palos Blancos y La Esmeralda (Municipio de Guasave) se detectaron de 1 a 3 aislados positivos con los primers que amplifican los genes de patogenicidad asociados a especies patógenas de *Streptomyces*; en Santa Rosa y la Zona Industrial (Municipio de Ahome) solamente se detectó un aislado positivo para cada localidad. No se logró ninguna detección con estos primers en las localidades de Pingüinos, Porofino, Claralú y La Pilarica (Cuadro 8).

Cuadro 8. Detección de especies de *Streptomyces* patogénicas mediante PCR aisladas de tubérculos con síntomas de sarna común de la papa en Sinaloa

Localidad	Municipio	# aislados	Primers Nf-Nr	Primers TxtAtB	Morfotipos positivos
Palos Blancos	Guasave	3	1	0	1
Pingüinos	El Fuerte	2	0	0	-
Ruiz Cortines	Guasave	13	3	0	2
Las Colonias	Guasave	5	1	0	3
Zona Industrial	Ahome	3	1	0	2
Porofino	Ahome	4	0	0	-
Santa Rosa	Ahome	2	1	0	1
Claralú	Ahome	3	0	0	-
Pilarica	Ahome	4	0	0	-
La Esmeralda	Guasave	2	1	2	2

La presencia de los genes para la biosíntesis de la taxtomina (TxtA y TxtB) se está convirtiendo en un indicador ampliamente utilizado para determinar la patogenicidad en especies de *Streptomyces* (Qu *et al.*, 2008). La taxtomina solamente es conocida en especies patógenas de *Streptomyces* y la presencia de los genes TxtA y TxtB está 100% relacionados con la producción de taxtomina y la enfermedad de la sarna común de la papa (Wanner, 2006).

Especies patógenas de *Streptomyces* no se habían detectado con anterioridad mediante técnicas moleculares en campos de cultivo de papa en Sinaloa, sin embargo con este trabajo podemos corroborar que el patógeno de la sarna común ya está presente y está ocasionando pérdidas en cuanto a producción y valor en el mercado de la papa en Sinaloa debido a que las variedades de papa en la región son susceptibles al patógeno de la sarna además que el tipo de suelo y el

clima que se tienen en los campos de cultivos de papa en la región son factores que favorecen la incidencia de la enfermedad.

7.4.3 Clonación de los aislados de *Streptomyces* spp.

Después del aislamiento de las especies patógenas de *Streptomyces* en tubérculo y suelo de la rizosfera de papa, se procedió a clonar los productos amplificados por PCR de los genes Nec1, TxtA y TxtB, con la finalidad de confirmar que las bandas amplificadas correspondían a los fragmentos esperados.

7.5 Análisis de secuencias

7.5.1 Análisis de secuencias de los genes Nec1, TxtA y TxtB

Los productos amplificados por PCR de la región del gen Nec1 de 720 pb con los primers Nf y Nr, fueron secuenciados. Dichas secuencias fueron comparadas con otras ya reportadas previamente en el banco de datos mediante el programa Blast Search The National Center For Biotechnology Information (NCBI) (Weeler *et al.*, 2000). Los resultados de las secuencias indican que los aislados presentaron un 99% de homología con *Streptomyces scabies* (número de acceso FN554891) reportada en Estados Unidos de América también nos muestra una homología del 99% con *Streptomyces turgidiscabies* (número de acceso AY707080) reportada en Estados Unidos de América y finalmente una homología del 99% con *Streptomyces acidiscabies* (número de acceso AF073317) reportada también en Estados Unidos de América. Por otro lado también se logró obtener la secuencia de *Streptomyces coelicolor*, la secuencia obtenida fue comparada con otras previamente reportadas en el banco de datos (mediante el programa Blast Search del National Center for Biotechnology Information (NCBI), [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) y se observó una homología del 100% con un aislados de Estados Unidos de América (número de acceso AL939120.1). *Streptomyces coelicolor* es una especie de *Streptomyces* que se caracteriza por producir metabolitos secundarios y hasta el momento no hay reportes que indiquen que sea patógena en plantas (Bentley, *et al.* 2002). Especies patógenas de

Streptomyces contienen en su genoma islas de patogenicidad, elementos genómicos que contienen genes para su síntesis taxonómica y otros genes de virulencias que pueden ser transmitidos a otras especies de *Streptomyces* no patogénicas debido su capacidad de transferencia horizontal de genes (Wanner 2009). En estudios recientes se han reportado nuevas especies fitopatógenas de *Streptomyces* que antes no lo eran. *Streptomyces coelicolor* reportada en este trabajo pudo haber adquirido el gen de patogenicidad Nec1 debido a la THG aunque no significa que pueda producir la síntesis para la necrosis de la enfermedad de la sarna común de la papa. También puede ser que los primers Nf y Nr que amplifican el gen Nec1 no sean tan específicos. Esto puede comprobarse con un estudio más amplio del aislado de *Streptomyces coelicolor* mediante de pruebas morfológicas, fitopatológicas como es el caso de los postulados de Koch.

Los productos amplificados por PCR de la región del gen TxtAB de 600 pb con los primers Sm6F y Sm5R fueron secuenciados. Dichas secuencias fueron comparadas con otras ya reportadas previamente en el banco de datos mediante el programa Blast Search The National Center For Biotechnology Information (NCBI) Los resultados de las secuencias indican que los aislados presentaron un 100% de homología con *Streptomyces scabies* (número de acceso FN554891) reportada en Estados Unidos de América y una homología del 100% con *Streptomyces acidiscabies* (número de acceso AF255732) reportada también en Florida, Estados Unidos de América.

Recientemente la información de la secuencia ha proporcionado una base adecuada para la identificación de las especies, con este análisis nos podemos dar cuenta que los genes Nec1, TxtA y TxtB no son aptos para el análisis entre especies de *Streptomyces*, sin embargo la utilización del gen 16S en bacterias es el más utilizado para la clasificación de especies, este gen es altamente conservado y ha proporcionado una variación adecuada para la clasificación de género y frecuentemente clasificación de especies.

7.5.2 Análisis de secuencias del gen 16S

Con base al análisis de secuencias 16S del gen se construyó un árbol filogenético de las 9 secuencias de *Streptomyces* spp. caracterizadas en este trabajo (Figura 17). En este proceso se consideraron secuencias de especies de *Streptomyces* patogénicas bajadas del banco de genes procedentes de los países de China, México, Corea, Canadá, Estados Unidos y Japón.

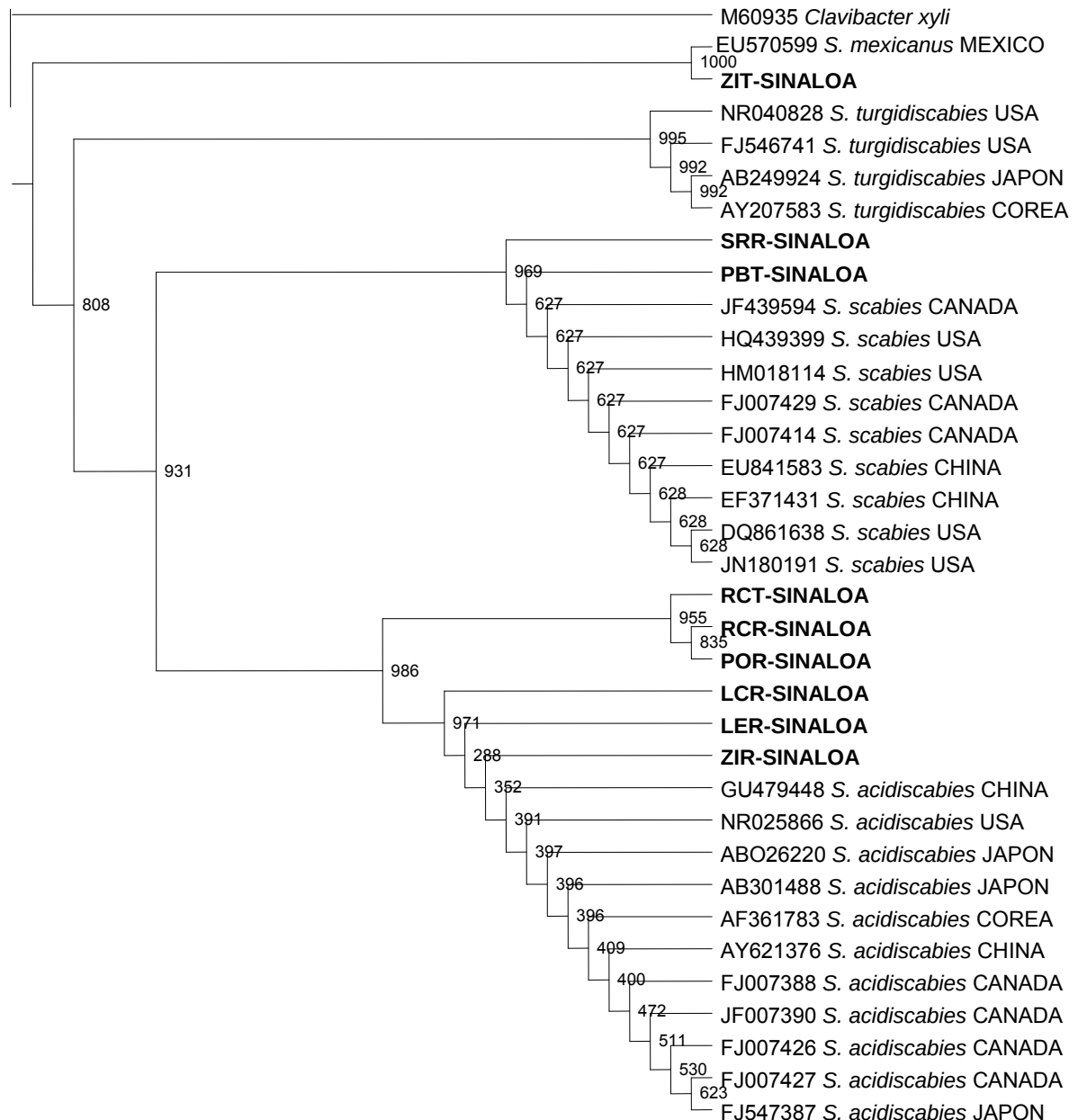


Figura 17. Árbol filogenético de secuencias del gen 16S amplificado con el par de primers Sm6F-Sm5R de *Streptomyces* spp. obtenidas en este trabajo y las reportadas en el banco de genes (NCBI).

En el árbol se puede observar claramente como se separan las especies patógenas de *Streptomyces* y una especie no patogénica, Los aislados de *Streptomyces spp.* ZIR, LER y LCR se agrupan en la misma rama ratificando la alta homología existente entre ellas; estos aislados tienen una homología del 100% con *Streptomyces acidiscabies* de Canadá, Estados Unidos de América, China y Japón. Aislados RCT y RCR se agrupan en una rama distinta de las demás secuencias, sin embargo encuentran cercanamente relacionados a las secuencias de *Streptomyces acidiscabies* con un 99% de homología. SRR y PBT se agrupan en una misma rama teniendo una homología del 100% con *Streptomyces scabies* de Canadá y Estados Unidos. Finalmente ZIT se agrupa en una rama con *Streptomyces mexicanus* proveniente de México con una homología del 100%.

En análisis filogenético indica que la especie de *Streptomyces acidiscabies* asociadas a la sarna común aisladas de Ruiz Cortines, Las Colonias y La Esmeralda, Guasave y Zona Industrial en Ahome, Sinaloa pudo provenir de campos de cultivos de papa de Canadá y Estados Unidos debido a que la mayoría de las variedades cultivadas en la región proceden de tubérculo-semilla de esos países al igual que *Streptomyces scabies* aislada de Palos Blanco, Guasave y Santa Rosa Ahome, además que los países de Canadá y Estados Unidos a nivel mundial son los más afectados en cuanto a producción y calidad del cultivo de papa por la enfermedad de la sarna común.

7.6 Pruebas *in vitro* y cinéticas de crecimiento

7.6.1 Bioensayos de antagonismo *in vitro* a *Streptomyces* patogénicas

Los 11 posibles antagonistas a *Streptomyces acidiscabies* fueron utilizados para realizar los bioensayos *in vitro* encontrándose que cuatro aislados tenían capacidad antagónica a *Streptomyces acidiscabies*. Los aislados que mostraron porcentaje de inhibición más altos fueron la 285 (*Pseudomonas lini*), 560 (*Bacillus simplex*), 313 (*Bacillus megaterium*) y 201 (*Streptomyces coelicolor*) Figura 18.

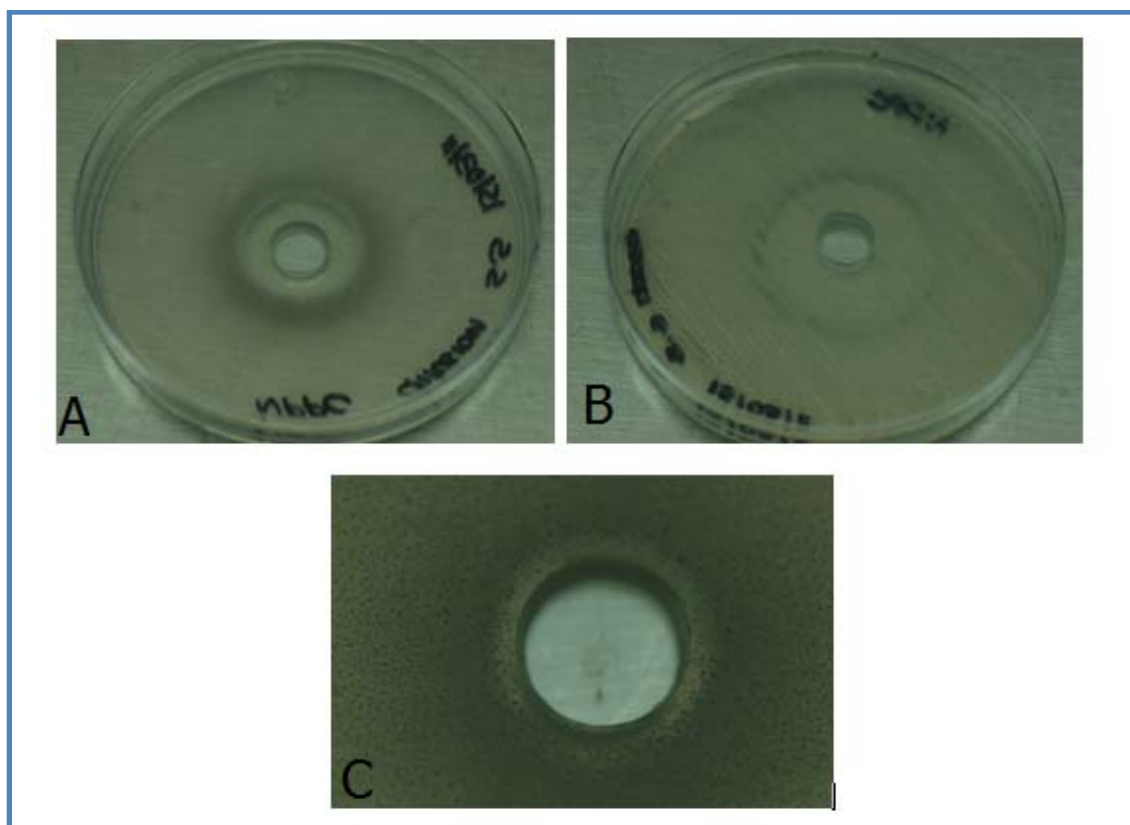


Figura 18. Capacidad antagónica de aislados de rizosfera de papa del Norte de Sinaloa a *Streptomyces acidiscabies*. Resultados observados después de cuatro días de la inoculación. Bioensayos realizados a 28° C. A) Aislado 285; B) Aislado 201 y C) Aislado 560.

Cuando los filtrados de los antagonistas fueron sembrados en presencia de *Streptomyces acidiscabies* se pudo observar la inhibición del crecimiento del micelio cerca de la zona del disco y la inhibición de la esporulación fue cerca de la zona de inhibición del micelio.

Zonas de inhibición:

1. Inhibición baja: aislado 313 (*Bacillus megaterium*) y 560 (*Bacillus simplex*).
2. Inhibición media: aislado 201 (*Streptomyces coelicolor*).
3. Inhibición alta: aislado 285 (*Pseudomonas lini*).

Los resultados de este trabajo mostraron que cuatro microorganismos, *Bacillus simplex* (585), *Bacillus megaterium* (313), *Streptomyces coelicolor* (201) y *Pseudomonas lini* (285), aislados de rizosfera de plantas de papa del Norte de Sinaloa tienen efecto inhibitorio en el crecimiento de *Streptomyces* patogénicas en

pruebas *in vitro*. Hay muchos reportes previos (St-Ontage, *et al.*, 2010 y Zhang, *et al.*, 2010) sobre el control biológico de especies patógenas de *Streptomyces in vitro* pero ninguno tan efectivo como en este trabajo. El ensayo demostró que los dos aislados *Streptomyces coelicolor* y *Pseudomonas lini* fueron igualmente efectivas en la inhibición del crecimiento de *Streptomyces acidiscabies* en todas las condiciones probadas. Por el contrario los dos aislados de *Bacillus* mostraron un efecto inhibitorio mucho menor.

El análisis estadístico del diseño completamente al azar con sus cuatro repeticiones (Figura 19) nos indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Los tratamientos que no presentaron ningún efecto antagónico a *Streptomyces acidiscabies* fueron: *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Paenibacillus illinoisensis*, *Paenibacillus polymyxa* con halos de inhibición de cero cm, posteriormente *Bacillus simplex* junto con *Bacillus megaterium* presentaron medias de halos de inhibición de van de 0.2 a 0.4 cm. *Streptomyces coelicolor* presentó un efecto antagónico de 1.17 cm, finalmente *Pseudomonas lini* fue el que presentó mayor efecto antagónico entre los tratamientos probados en este trabajo con una media del halo de inhibición de 1.42 cm (Cuadro 9). La desviación estándar de los tratamientos varió de 0 a 0.125.

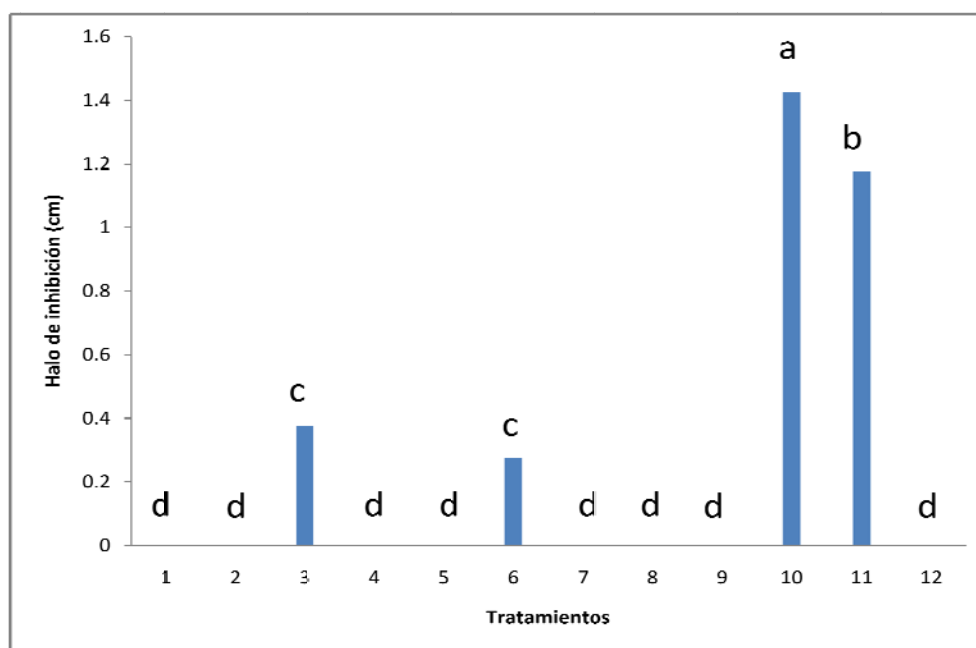


Figura 19. Efecto de antagonismo *in vitro* a *Streptomyces acidiscabies*

Cuadro 9. Medias de halos de inhibición de cada tratamiento contra *Streptomyces acidiscabies*

Tratamientos	Halo de inhibición (cm)	Microorganismos antagonistas
1	0	<i>Acinetobacter baumannii</i>
2	0	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
3	0.375	<i>Bacillus megaterium</i>
4	0	<i>Bacillus pumilus</i>
5	0	<i>Bacillus subtilis</i>
6	0.275	<i>Bacillus simplex</i>
7	0	<i>Bacillus thuringiensis</i>
8	0	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>
9	0	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
10	1.425	<i>Pseudomonas lini</i>

11	1.175	<i>Streptomyces coelicolor</i>
12	0	Control

Estos datos concuerdan con lo reportado por Han (2005) en donde utilizan *Bacillus* spp. pues estas cepas tuvieron efecto inhibitorio contra la sarna común con halos de inhibición de 22 mm, Han demostró que estas especies producían Iturina A y Microlactina, las cuales muestran efecto contra *Fusarium oxysporum*. Este trabajo sugiere que esta especie de *Bacillus* es un buen candidato para el control de la sarna común de la papa. St-Ontage (2010) en un estudio demostró que *Pseudomonas* spp. inhiben significativamente el crecimiento de *Streptomyces scabies* debido a su capacidad para alterar la expresión de genes de la biosíntesis de taxtominas (Nec1, tomA, txtA y txtC) y encontrándose halos de inhibición en las pruebas *in vitro* de aproximadamente 1 cm., la producción de un compuesto llamado PCA (ácido fenazina 1 carboxílico) producido por *Pseudomonas* spp. está involucrado en la inhibición del crecimiento de la sarna y en la represión de la patogenicidad y virulencia asociadas a la expresión génica. Para el caso *Streptomyces coelicolor* produce un antibiótico llamado undecilprodigisina aunque no se han realizado estudios donde se reporte que tiene efecto inhibitorio contra *Streptomyces scabies* u otro patógenos causante de la sarna común de la papa (Luti, 2011). Se han utilizados especies de *Streptomyces* contra otros patógenos en plantas como es el caso de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, que en el trabajo de Zhang (2010) *Streptomyces* spp. presentó un claro efecto de antibiosis a *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Hiltunen (2008) realizó experimentos *in vitro* contra una especie de *Streptomyces* patogénica utilizando como antagonista una especie de *Streptomyces* no patógena la cual suprimió el desarrollo de la sarna común de la papa ocasionada por la especie patógena de *Streptomyces* bajo condiciones experimentales de invernadero, estos datos fueron consistentes con los claros efectos inhibitorios que estas cepas mostraron en el crecimiento de la *Streptomyces* patógena.

7.6.2 Cinética de crecimiento de bacterias antagonistas a *Streptomyces* patogénicas

Para conocer las fases de crecimiento se realizó la cinética de crecimiento de los cuatro mejores aislados contra *Streptomyces acidiscabies*. Como se puede observar en la figura 20 el aislado 285 alcanzó su fase estacionaria a las 15 horas al igual que el aislado 560, mientras que el aislado 313 la alcanzó a las 27 horas y finalmente el aislado 201 alcanzó su fase estacionaria a las 46 horas.

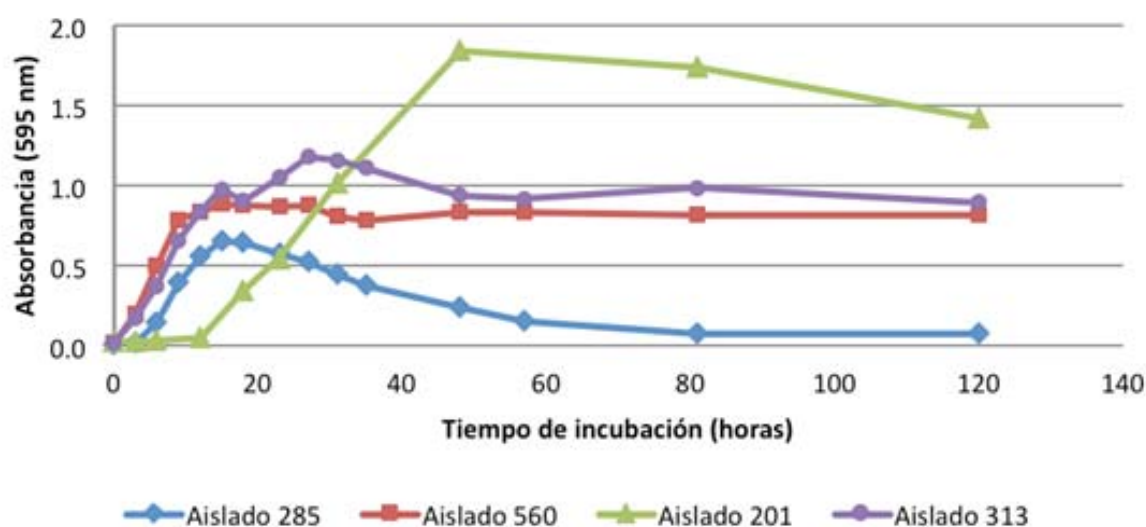


Figura 20. Cinética de crecimiento de los aislados antagonistas a *Streptomyces acidiscabies*. 285 (*Pseudomonas lini*), 560 (*Bacillus simplex*), 313 (*Bacillus megaterium*) y 201 (*Streptomyces coelicolor*)

La cinética de crecimiento bacteriano constituye una de las operaciones más utilizadas por la biotecnología por ello es importante conocer los diferentes mecanismos de crecimiento, así como también la forma de cuantificación de los mismos y sus formas de aplicación para poder crear estrategias de control biológico. Los aislados que tuvieron efecto antagonista a *Streptomyces acidiscabies* tienen distintos tiempos de crecimiento, se pudo observar que los dos *Bacillus* y *Pseudomonas lini* tienen un crecimiento mucho más rápido que *Streptomyces coelicolor*.

7.6.3 Conteo de UFC de antagonistas a *Streptomyces* patogénicas

Para conocer la densidad de inóculo óptima del antagonista se realizó la determinación de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) óptimas del antagonista a *Streptomyces acidiscabies* se realizó la siembra y el conteo en placa de las UFC de los diferentes antagonistas a diferentes horas y diluciones (Cuadro 10 y 11).

Cuadro 10. Tiempos y diluciones tomadas para el conteo de UFC de para *Bacillus* y *Pseudomonas*

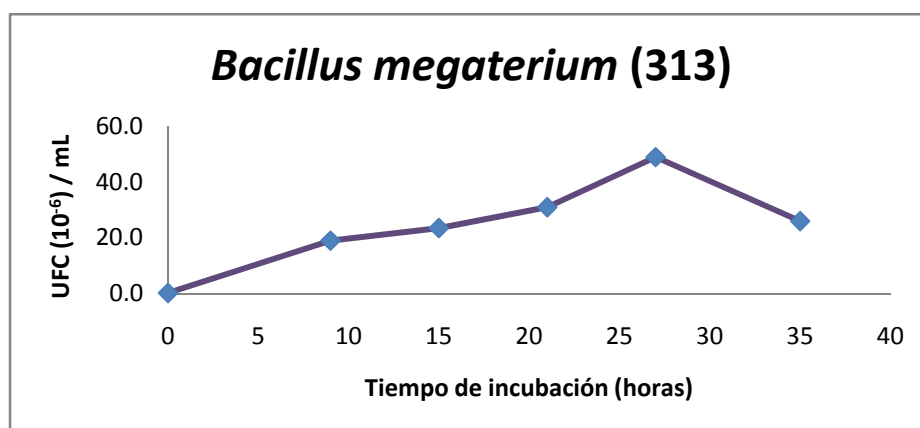
Tiempo (horas)	Dilución y (número de cajas por dilución entre paréntesis)		
	Aislado 285	Aislado 560	Aislado 313
0	-1 (2); -2 (3); -3 (3)	-1 (2); -2 (3); -3 (3)	-1 (2); -2 (3); -3 (3)
6		-3 (3); -4 (3)	
9	-2 (2); -3 (3); -4 (3)	-4 (3); -5 (3); -6 (3)	-3 (2); -4 (3); -5 (3); -6 (1)
15	-3 (3); -4 (3); -5 (3); -6 (1)	-4 (2); -5 (3); -6 (3); -7 (1)	-4 (2); -5 (3); -6 (3); -7 (1)
21	-4 (3); -5 (3); -6 (3)		-4 (2); -5 (3); -6 (3); -7 (1)
27	-3 (2); -4 (3); -5 (3)	-4 (3); -5 (3); -6 (3)	-4 (2); -5 (3); -6 (3); -7 (1)
35			-5 (3); -6 (3)

Los números negativos afuera de los paréntesis corresponden al número de dilución que fue tomada para el conteo de UFC, los números dentro de los paréntesis indican el número de repeticiones y en los espacios en blanco no se tomó ninguna muestra.

Cuadro 11. Tiempos y diluciones tomadas para el conteo de UFC de para *Streptomyces coelicolor*

Tiempo (horas)	Diluciones del aislado 201
0	-1 (2); -2 (3); -3 (3)
12	-1 (2); -2 (3); -3 (3)
24	-3 (3); -4 (3); -5 (3)
36	-4 (2); -5 (3); -6 (3); -7 (1)
48	-5 (3); -6 (3); -7 (1)
60	-5 (3); -6 (3); -7 (1)
72	-5 (3); -6 (3); -7 (1)
84	-5 (3); -6 (3); -7 (1)

Como se puede observar en la cinética de UFC para *Bacillus megaterium* contra *Streptomyces acidiscabies* (Figura 21) la concentración máxima se alcanza en un tiempo de aproximadamente 27 h y es de 49×10^6 UFC/ml.

**Figura 21.** Cinética de UFC para *Bacillus megaterium*

Para el caso de *Bacillus simplex* la concentración máxima se alcanza en un periodo de incubación de 27 h con una población de 157×10^6 UFC/ml (Figura 22).

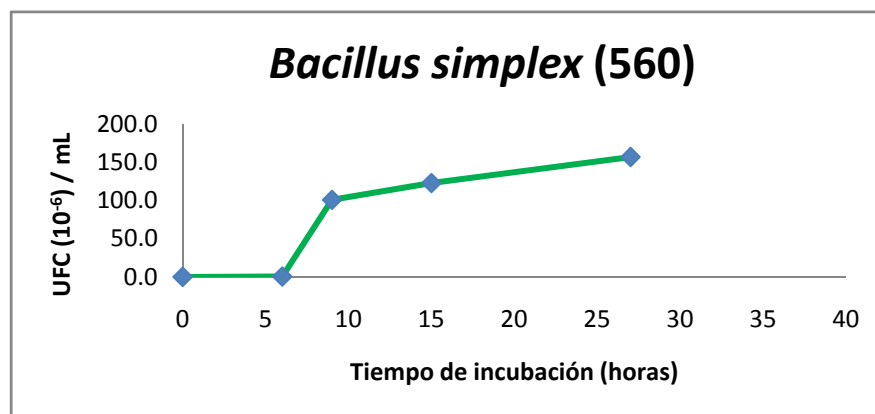


Figura 22. Cinética de UFC para *Bacillus simplex*

Comparando tanto las cinéticas de crecimiento como las cinéticas de UFC para las dos especies de *Bacillus* nos podemos dar cuenta que alcanzan su fase estacionaria aproximadamente al mismo tiempo, aunque las concentración de UFC en el caso de *Bacillus simplex* es mucho mayor que la de *Bacillus megaterium*.

Como se puede observar en la cinética de UFC para *Streptomyces coelicolor* (Figura 23) la concentración máxima de unidades formadoras de colonia la alcanza en un tiempo de aproximadamente 48 h y es de 48×10^6 UFC/ml.

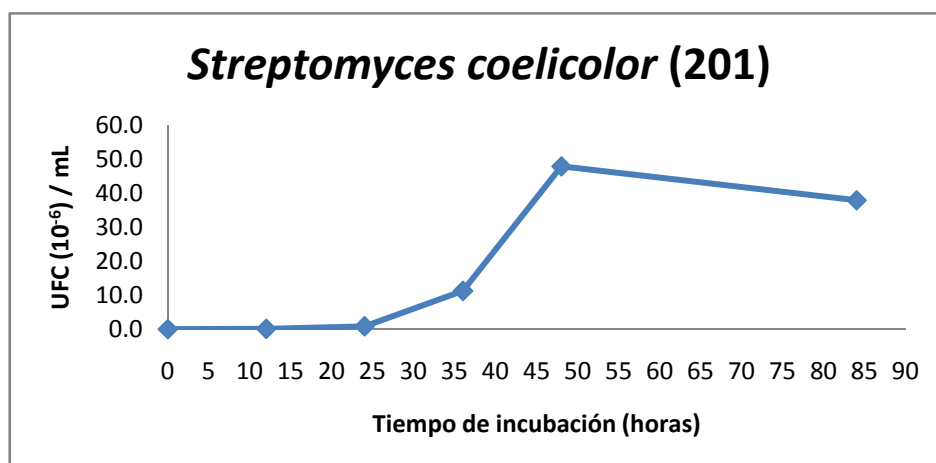


Figura 23. Cinética de UFC para *Streptomyces coelicolor*

Finalmente en la cinética de UFC para *Pseudomonas lini* (Figura 24) la concentración máxima de unidades formadoras de colonia la alcanza en un tiempo de aproximadamente 15 horas y es de 11×10^6 UFC/ml.

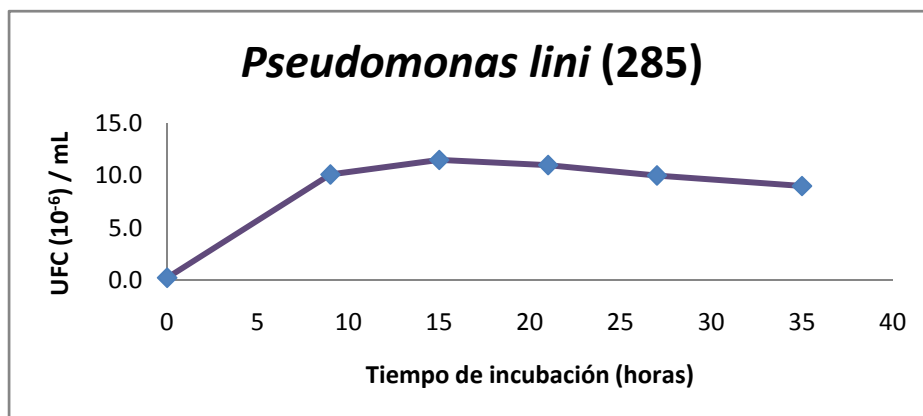


Figura 24. Cinética de UFC para *Pseudomonas lini*

Al finalizar la etapa exponencial de su desarrollo y alcanzar su fase estacionaria, los microorganismos dejan de producir sus metabolitos primarios que son los que le ayudan a adaptarse al medio de cultivo y reproducirse, durante la fase estacionaria ya no se incrementa el número de microorganismos y es en esta etapa donde comienzan a producir sus metabolitos secundarios. Los resultados de este trabajo obtenidos de las cinéticas de UFC son de gran importancia debido a que nos indican a que tiempo se alcanza la mayor concentración del aislado bacteriano y la producción óptima de metabolitos secundarios que muy probablemente estén relacionados con su efecto antagonista a *Streptomyces acidiscabies* debido a que estos aislados producen antibióticos que inhiben el crecimiento y desarrollo del patógeno de la sarna común de la papa encontrada en Sinaloa, además que estos resultados serán la base de otros trabajos donde se realicen pruebas de antagonismo a nivel invernadero o campo para controlar a *Streptomyces acidiscabies* asociada a patogenicidad localizada en el Norte de Sinaloa.

Se cumplió la primera hipótesis de este trabajo de investigación de que *Streptomyces scabies* y *Streptomyces turgidiscabies* se encuentran asociadas a tubérculos de papa con síntomas de sarna común en Sinaloa ya que se logró

identificar y caracterizar a *Streptomyces scabies* pero no se encontró a *Streptomyces turgidiscabies*, sin embargo se logró identificar y caracterizar a *Streptomyces acidiscabies* que es otra especie patógena causante de la sarna común de la papa y está relacionada con los síntomas en los tubérculos de papa colectados en este estudio. La segunda de las hipótesis de este trabajo también fue cumplida debido a que se logró identificar mediante pruebas *in vitro* aislados con capacidad de antagónica a *Streptomyces acidiscabies*.

8. CONCLUSIONES

- Se aislaron 1171 cepas de *Streptomyces* spp. de rizosfera y tubérculo de papa en el ciclo agrícola 2009-2010 en el Norte de Sinaloa.
- Se encontraron 22 morfotipos distintos de *Streptomyces* spp. en rizosfera y tubérculos de papa en el ciclo agrícola 2009-2010 en el Norte de Sinaloa.
- Se identificó y caracterizó *Streptomyces scabies* de rizosfera y tubérculos de papa procedentes de las localidades de Santa Rosa, Ahome y Palos Blancos, Guasave, Sinaloa.
- Se identificó y caracterizó *Streptomyces acidiscabies* de rizosfera y tubérculos de papa procedentes de las localidades de Ruiz Cortines, Las Colonias, La Esmeralda, en Guasave y Zona Industrial, Porofino en Ahome, Sinaloa.
- Se identificaron cuatro aislados antagonistas a *Streptomyces acidiscabies* en las pruebas *in vitro*, *Bacillus simplex* (585), *Bacillus megaterium* (313), *Streptomyces coelicolor* (201) y *Pseudomonas lini* (285), resultando este último el que presentó el mayor efecto antagónico con un halo de inhibición de 1.42 cm.
- Es el primer reporte de detección y caracterización de especies patógenas de *Streptomyces* mediante técnicas moleculares en cultivos de papa en Sinaloa.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar análisis de distribución de especies de *Streptomyces* causantes de la sarna común de la papa en Sinaloa.
- Trabajar con una caracterización del banco de *Streptomyces* spp. debido a que hay una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas para este género tales como el control biológico.
- Realizar pruebas de hemólisis al banco de *Streptomyces* para la identificación de aquellos aislados con potencial para producir daños al ser humano y poder eliminarlos antes utilizarlos para los bioensayos en invernadero y campo.
- Realizar postulados de Koch debido a que esta serie de experimentos se ajustan a los criterios necesarios para poder establecer la relación causal entre un organismo específico y una enfermedad específica.
- Realizar las pruebas control biológico tanto en invernadero como en campo contra *Streptomyces* causantes de la sarna común utilizando como potentes antagonistas *Bacillus simplex*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces coelicolor* y *Pseudomonas lini*. Esto con el fin de tener un conocimiento más amplio sobre el control biológico de estos antagonistas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- **Birboin, H. C. and Doly, J. (1979).** Nucleic Acid Research 7:1513-1523.
- **Bentley, S. D., K. F. Chater, A. Bateman and S Brown. S. (2003).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). US National Library of Medicine National Institutes of Health. 9;417(6885):141-7.
- **Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. R. (1987).** Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia Coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 7:4801-4805.
- **Bukhalid, R. A., S. Y Chung and Loria, R. (1998).** *Nec1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp, and linked to a transposase pseudogene. Mol. Plant-Microbe Interact.11:960-967.
- **Bukhalid, R. A., R. Loria. (1997).** Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative factor. Journal of Bacteriology. Vol. 179, No. 24. 7776-7783.
- **Cepeda, M. (2003).** La papa el fruto de la tierra. Editorial trillas, S.A de C.V. México, D.F. p.13.
- **Chen, W. P. and Kuo, T. T. (1993).** A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic Acids Research 21:22-60.
- **Conn, K. L., Leci, E., Kritzman, G., and Lazarovits, G. (1998).** A Quantitative method for determining soil populations of *Streptomyces* and differentiating potential potato scab- inducing strains. Plants disease. 82:631-638.
- **Coombs, J. T., M. Christopher, M. Franco. (2003).** Isolation and identification of Actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 69, No. 9. 5603-5608.
- **Cordero-Ramírez (2008).** Microorganismos de la rizosfera de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) como antagonistas de *Fusarium oxysporum* f. sp. Radicis-lycopersici. Tesis de maestría. Centro

Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa.

- **Crane, B. R. (2008).** The enzymology of nitric oxide in bacterial pathogenesis and resistance. *Biochemical Society Transactions*. 36: 1149–1154.
- **Cullen, D.W., A. K. Less (2007).** Detection of the *nec1* virulence gene and its correlation with pathogenicity in *Streptomyces* species on potato tubers and in soil using conventional and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 102:1082–1094.
- **FAOSTAT, 2007.** www.faostat.fao.org
- **Flores-González, R., I. Velasco, F. Montes. (2008).** Detection y characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. *Plant pathology* 57:162-169.
- **Flores-González (2005).** Generación de un sistema genético para la transformación de *Streptomyces violaceus niger* YCED-9. Tesis de maestría. Centro de investigación en biotecnología aplicada. IPN-Tlaxcala.
- **Greathead, D. J. and J. K. Waage. (1983).** Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. The World Bank, Washington, D.C., World Bank Technical Paper Number 11. 44 p.
- **Han, J. S., J. H. Cheng, T. M. Yoon, J. Song, A. Rajkarnikar, W.G. Kim, I. D. Yoo, Y. Y. Yang. (2005).** Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. *J Appl Microbiol* 99:213-221.
- **Hawkes, J.G. (1990).** The potato: evolution, biodiversity and genetic resources.. London.: Belhaven Press,. pp. 259.
- **Healy, F.G., M. Wach, S. B. Krasnoff, D. M. Gibson., R. Loria. (2000).** The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production y pathogenicity. *Molecular Microbiology*. 38(4) 794-804.
- **Herrera-Rodríguez (2007).** Introducción, establecimiento y dispersión del virus PLRV y PVY en el cultivo de papa en el estado de Sinaloa. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa.

- **Hiltunen, L. H., A. Weckman, A. Ylhainen, H. Rita., E. Richter, J. P. T. Valkonen. (2005).** Responses of potato cultivars to the common scab pathogens, *Streptomyces scabies* and *S. turgidiscabies*. *Annals of Applied Biology*. 146:395–403.
- **Hiltunen, L. H., T. Ojanpera, H. Kortemaa, E. Richter, M. J. Lehtonen, J. P. T. Valkonen. (2008).** Interactions and biocontrol of pathogenic *Streptomyces* strain co-occurring in potato scab lesions. *Journal of Applied Microbiology*. 199-212.
- **Hopwood, D. A. (2006).** Soil to genomics: The *Streptomyces* chromosome. *Annual review of genetics* 40:1-23.
- **Joshi, M., X. Rong, S. Moll, J. Kers, C. Franco and R. Loria. (2006).** *Streptomyces turgidiscabies* secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. *The American Phytopathological Society*. 20:599-608.
- **Keinath, A. P., and Loria, R. (1991).** Effects of inoculum density and cultivars resistance on common scab of potato and population- dynamics of *Streptomyces scabies*. *Am. J. Potato* 68:515-524.
- **Lambert, D. H., Powelson, M. L., W. R. Stevenson. (2005).** Nutritional interactions influencing diseases of potato. *Am. J. Potato Res.* 82:309- 319.
- **Lehtonen, M. J., H. Rantala, J. F. Kreuze, H. Bang, L. Kuisma, P. Koski, E. Virtanen, K. Vihlman, J. P .T. Valkonen. (2004).** Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant pathology*. 53:280-287.
- **Leiner, R. H., B. A. Fry, D. E. Carling, R. Loria. (1996).** Probable involvement of taxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. *The American phytopathological society*. Vol.86 No. 7 09-713.
- **Lindholm, P., Kortemaa, H., Kokkola, M., Haahtela, K., Salkinoja-Salonen, M. and Valkonen, J.P.T. (1997).** *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. *Plant Disease* 81, 1317–1322.
- **Loria, R., A. Raghida, A. Bukhalid, B. A. Fry. (1997).** Plant Patogenicity in the Genus *Streptomyces*. *Plant Disease* Vol. 81 No. 8. 836-846.

- **Loria, R. (2001)** Common scab. In Compendium of Potato Diseases, 2nd edition. The American Phytopathological Society Press. 14-15 pp.
- **Lujan, L. (1996).** Historia de la papa. Órgano Informativo de la Federación Colombiana de Productores de papa (FEDEPAPA). No. 16. Diciembre de 1996. Colombia. 26 pp.
- **Luti, K. J. K., F. Mavituna. (2011).** *Streptomyces coelicolor* increases the production of undecylprodigiosin when interacted with *bacillus subtilis*. Biotechnol Lett. 33:113-118.
- **Manzer, F. E., McIntyre, G. A., and Merriam, D. C. (1977).** A new potato scab problem in Maine. Univ. Maine Tech. Bull. 85 p.
- **Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C., Donadio, S. (2002).** New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. FEMS Microbiology Ecology. 42 (2002) 419-429.
- **Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satoh, A., Nagaoka, K., and Thompson, C. J. (1986).** The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. Mol. Gen. Genet. 205:42-50.
- **Nolan R. D y Crosst T. (1998).** Isolation and screening of Actinomycetes. In Actinomycetes in biotechnology. Agriculture and Agri-Food Canada, Fredericton, Academic Press, Ltd., London, United Kingdom. 1-32.
- **Pasarell, L. & McGinnis, M. R. 1992.** Viability of fungal cultures maintained at -70°C. Journal of Clinical Microbiology 30:1000-1004.
- **Powers, E. M. (1995).** Efficacy of the Ryu Nonstaining KOH Technique for Rapidly Determining Gram Reactions of Food-Borne and Waterborne Bacteria and Yeasts. Applied and Environmental Microbiology 61:3756–3758.
- **Qu, X., Wanner, L. A., and Christ, B. J. (2008).** Using the TxtAB operon to quantify pathogenic *Streptomyces* in potato tubers and soil. Phytopathology 98:405-412.
- **Román, M y Hurtado, G. (2002).** Guía técnica del cultivo de papa. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. Ciudad Arce. El salvador. 36 pp.

- **SAGARPA-ASERCA (2009).** La papa en México, un cultivo con potencialidad. Revista claridades agropecuarias. México DF. 40pp.
- **Salazar, L.F. (1996).** Potato viruses and their control. Lima, Perú. 214.
- **Santos-Cervantes. (2009).** Tesis de Doctorado. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa.
- **Shi, T., Reeves, R. H., Gilichinsky, D. A. & Friedmann, E. I. (1997).** Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. Microbial Ecology 33:169-179.
- **Shin, P., J. Kim, Y. Hahm. (2002).** Rapid identification of potato scab causing *Streptomyces* spp. Using pathogenicity specific primers. Plant pathology. 18(6) 338-341.
- **Shirling, E. B., and Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16:313-340.
- **SIAP 2009.** www.siap.sagarpa.gob.mx
- **St-Ontage R., C. Goyer and M. Filion. (2010).** *Pseudomonas* spp. can Inhibit *Streptomyces* scabies Growth and Repress the Expression of Genes Involved in Pathogenesis. J. Bacteriol Parasitol 1:101. doi:10.4172/2155-9597.1000101
- **Waksman, S. A., Andra. T. Henrici. (1943).** The nomenclature and classification of the Actinomycetes. J. Bacteriol., 46, 337-341.
- **Wang, A., and Lozarovits, G. (2005).** Role of seed tubers in the spread of plant pathogenic *Streptomyces* and initiating potato common scab disease. Am. J. Potato Res. 82:221-230.
- **Wanner, L. A. (2006).** Survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. The American Phytopathological Society Vol. 96, No. 12, 1363-1371.
- **Wanner, L. A. (2007).** A new strain of *Streptomyces* causing common scab in potato. Plant Disease. 91:352–359.
- **Wanner, L. A. (2009).** A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. Am. J. Pot. Res 86:247-264.
- **Zhang, Y. P., J. K. Uyemoto, B. C. Kirkpatrick. (1998).** A small-scale procedure for extracting nucleotic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. J. Virol. Methods 71:45-50.

- **Zhang, W., W. Yang, Q. Meng., Y. Li D. Liu. (2010).** Screening and identification of antagonistic *Streptomyces* spp. against *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* from tomato rhizosphere. Front. Agric. China. 4(2):159-164.

Anexo 1

Secuencias de los genes TxtAB obtenidas a partir de tubérculos de papa con síntomas de sarna común colectados en el Norte de Sinaloa.

>RCT - SINALOA

TCGAGTGGACCTCACAGATGATGGGATCGGACGGGCTGGCCCTGGGAGTCACTGCAGTGG
GAGGTCCTGGACGCGGAGATCGGGATCCTTCAACAACAGGGACAGCACGACTTCGTA CTG
CTGGGCGAGCCGGACGACCGTGTCGTCGCGCAGCAGCCCGCTCTGGTACTGGATGTGGCT
GCGCAGCGTCCCGCCGTCCGCGGCGGAGGCCAGATGCTCCACGGTCCACAGCACCGGATA
GCGGGCGGATTGCTCGCCGGCCGTGGGCCGGGACTGATGGTGAGGCCCGGCAGGTCGGC
CGGCGGAGCTGCGACCGTGCGCAGGACGAGTGACACCTGGGGCGGTGGCACGTGCGCCAG
GCGCTCGAAGAGCAGG

>ZIT - SINALOA

TCGAGTGGACCTCACAGATGATGGGATCGGACGGGCTGGCCCTGGGAGTCACTGCAGTGG
GAGGTCCTGGACGCGGAGATCGGGATCCTTCAACAACAGGGACAGCACGACTTCGTA CTG
CTGGGCGAGCCGGACGACCGTGTCGTCGCGCAGCAGCCCGCTCTGGTACTGGATGTGGCT
GCGCAGCGTCCCGCCGTCCGCGGCGGAGGCCAGATGCTCCACGGTCCACAGCACCGGATA
GCGGGCGGATTGCTCGCCGGCCGTGGGCCGGGACTGATGGTGAGGCCCGGCAGGTCGGC
CGGCGGAGCTGCGACCGTGCGCAGGACGAGTGACACCTGGGGCGGTGGCACGTGCGCCAG
GCGCTCGAAGAGCAGG

Anexo 2

Secuencias del gen Nec1 obtenidas a partir de rizosfera y tubérculos de papa con síntomas de sarna común colectados en el Norte de Sinaloa.

>LCR-SINALOA

ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGACGTAACGGGGCCTACCAAGTGCTTGGGCCGGTATGCT
 TCTTCCTGAAAGCGCCTTTTAAAAACACCTCGCCTGCAGAGAGGACGTGTAGTGAATCTGA
 AAATTCGCACTCTTGAGATCTCATGCGAACCTCTGGAGTGACGCCAAAGACTCAATCAA
 GTTCGCCAAAGCGTCGCGTTCTTACGAGCCCTGCGACTATTCTCGCCGCGTCGGGCGTTG
 TGGTCGCAAATCCTTCCGCTGCGTTTCGCCAATTCACCTTCACTGCTGTGGGGTATTGCG
 ACACGAATTACCAAGTGTGCGGGAGGTAGTGGCTCGAGTAGCAGATGGTCAGTGAATTTTCG
 ATGACGGGCCGACGGTATCGACAATTGACCTCCATGAACTGTACCGCGACCAGAGCGACA
 CCATGTCTCTCTTCGCAATTCTCGGGAGTGTGATGTGCGCGGCCAATCACCCGAATGAAA
 CAGTCACGATTCATCAGCAATTTTATCGAGACAATGGCGGGCAGGTGCCGCTCGGAGAGT
 ACGAAACACGGTTACGGGCGAGCAGCTCCAATAATGCCAGCGCTTCAATTTTCGATCAAG
 GCATACCCAATTTGCCGTGGAATGACCAGGTGTCGTGCGTTGCTATATGGATAACGAGAA
 AGTAGCTGACTGGCCTTAAAGAAGCTCGATCCTTCGTGACGACCTGC

>LER-SINALOA

ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGACGTAACGGGGGCCAACCAGTGCTTGGGCCGGTATGCT
 TTCTTCCTGAAAGCGCCTTTTAAAAACACCTCGCCTGCAGAGAGGACGTGTAGTGAATCTG
 AAAATTCGCACTCTTGAGATCTCATGCGAACCTCCGGAGTGACGCCAAAGACTCAATCA
 AGTTCGCCAAAGCGTCGCGTTCTTACGAGCCTTGCGACCATTTCTCGCCGCGTCGGGCGTT
 GTGGTCGCAAATCCTTCCGCTGCGTTTCGCCAATTCACCTTCACTGCTGTGGGGTATTGCG
 GACACGAATTACCAAGTGTGCGGGAGGTAGTGGCTCGAGTAGCAGATGGTCAGTGAATTTTC
 GATGACGGGCCGACGGTATCGACAATTGACCTCCATGAACTGTACCGCGACCAGAGCGAC
 ACCATGTCTCTCTTCGCAATTCTCGGGAGTGTGATGTGCGCGGCCAATCACCCGAATGAA
 ACAGTCACGATTCATCAGCAATTTTATCGAGACAATGGCGGGCAGGTGCCGCTCGGAGAG
 TACGAAACACGGTTACGGGCGAGCAGCTCCAATAATGCCAGCGCTTCAATTTTCGATCAA
 GGCATACCCAATTTGCCGTGGAATGACCAGGTGTCGTGCGTTGCTATATGGATAACGAGA
 AAGTAGCTGACTGGCCTTAAAGAAGCTCGATCCTTCGTGACGACCTGC

>PBR-SINALOA

ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGACGTAACGGGGGCCAACCAGTGCTTGGGCCGGTATGCT
 TTCTTCCTGAAAGCGCCTTTTAAAAACACCTCGCCTGCAGAGAGGACGTGTAGTGAATCTG
 AAAATTCGCACTCTTGAGATCTCATGCGAACCTCCGGAGTGACGCCAAAGACTCAATCA
 AGTTCGCCAAAGCGTCGCGTTCTTACGAGCCTTGCGACCATTTCTCGCCGCGTCGGGCGTT
 GTGGTCGCAAATCCTTCCGCTGCGTTTCGCCAATTCACCTTCACTGCTGTGGGGTATTGCG
 GACACGAATTACCAAGTGTGCGGGAGGTAGTGGCTCGAGTAGCAGATGGTCAGTGAATTTTC
 GATGACGGGCCGACGGTATCGACAATTGACCTCCATGAACTGTACCGCGACCAGAGCGAC
 ACCATGTCTCTCTTCGCAATTCTCGGGAGTGTGATGTGCGCGGCCAATCACCCGAATGAA
 ACAGTCACGATTCATCAGCAATTTTATCGAGACAATGGCGGGCAGGTGCCGCTCGGAGAG
 TACGAAACACGGTTACGGGCGAGCAGCTCCAATAATGCCAGCGCTTCAATTTTCGATCAA
 GGCATACCCAATTTGCCGTGGAATGACCAGGTGTCGTGCGTTGCTATATGGATAACGAGA
 AAGTAGCTGACTGGCCTTAAAGAAGCTCGATCCTTCGTGACGACCTGC

>PIR-SINALOA

CAAGTTCGCCAAAGCGTCGCGTTCTTACGAGCCCTGCGACTATTCTCGCCGCGTCGGGCG
 TTGTGGTCGCAAATCCTTCCGCTGCGTTTCGCCAATTCACCTTCACTGCTGTGGGGTATT
 GCGACACGAATTACCAAGTGTGCGGGAGGTAGTGGCTCGAGTAGCAGATGGTCAGTGAATT
 TCGATGACGGGCCGACGGTATCGACAATTGACCTCCATGAACTGTACCGCGACCAGAGCG
 ACACCATGTCTCTCTTCGCAATTCTCGGGAGTGTGATGTGCGCGGCCAATCACCCGAATG
 AAACAGTCACGATTCATCAGCAATTTTATCGAGACAATGGCGGGCAGGTGCCGCTCGGAG
 AGTACGAAACACGGTTACGGGCGAGCAGCTCCAATAATGCCAGCGCTTCAATTTTCGATC
 AAGGCATACCCAATTTGCCGTGGAATGACCAGGTGTCGTGCGTTGCTATATGGATAACGA
 GAAAGTAGCTGACTGGCCTTAAAGAAGCTCGATCCTTCGTGACGACCTGC

>POR-SINALOA

ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGACGTAACGGGGGCCAACCAGTGCTTGGGCCGGTATGCT
 TTCTTCCTGAAAGCGCCTTTTAAAAACACCTCGCCTGCAGAGAGGACGTGTAGTGAATCTG
 AAAATTCGCACTCTTGAGATCTCATGCGAACCTCCGGAGTGACGCCAAAGACTCAATCA

AGTTCGCCAAAGCGTCGCGTTCTTACGAGCCTTGCGACCATTTCTCGCCGCGTCGGGCGTT
GTGGTCGCAAATCCTTCCGCTGCGTTTCGCCAATTCCACCTTCACTGCTGTGGGGTATTGC
GACACGAATTACCAAGTGTGCGGGAGGTAGTGGCTCGAGTAGCAGATGGTCAGTGAATTTTC
GATGACGGGCGGACGGTATCGACAATTGACCTCCATGAACTGTACCGCGACCAGAGCGAC
ACCATGTCCTCCTTTTCGCAATTCTCGGGAGTGTGATGTCGCGCGCCAATCACCCGAATGAA
ACAGTCACGATTATCAGCAATTTTATCGAGACAATGGCGGGCAGGTGCCGCTCGGAGAG
TACGAAACACGGTTTCAGGGCGAGCAGCTCCAATAATGCCAGCGCTTCAATTTTCGATCAA
GGCATACCCAATTTGCCGTGGAATGACCAGGTGTCGTCGGTTGCTATATGGATAACGAGA
AAGTAGCTGACTGGCCTTAAAGAAGCTCGATCCTTCGTGACGACCTGC

>RCR-SINALOA

ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGACGTAACGGGGGCTACCAGTGCTTGGGCCGGTATGC
TTCTTCCTGAAAGCGCCTTTTAAAAACACCTCGCCTGCAGAGAGGACGTGTAGTGAATCTG
AAAATTCGCACTCTTGAGATCTCATGCGAACCTCTGGAGTGACGCCAAAGACTCAATCA
AGTTCGCCAAAGCGTCGCGTTCTTACGAGCCCTGCGACTATTCTCGCCGCGTCGGGCGTT
GTGGTCGCAAATCCTTCCGCTGCGTTTCGCCAATTCCACCTTCACTGCTGTGGGGTATTGC
GACACGAATTACCAAGTGTGCGGGAGGTAGTGGCTCGAGTAGCAGATGGTCAGTGAATTTTC
GATGACGGGCGGACGGTATCGACAATTGACCTCCATGAACTGTACCGCGACCAGAGCGAC
ACCATGTCCTCCTTTTCGCAATTCTCGGGAGTGTGATGTCGCGCGCCAATCACCCGAATGAA
ACAGTCACGATTATCAGCAATTTTATCGAGACAATGGCGGGCAGGTGCCGCTCGGAGAG
TACGAAACACGGTTTCAGGGCGAGCAGCTCCAATAATGCCAGCGCTTCAATTTTCGATCAA
GGCATACCCAATTTGCCGTGGAATGACCAGGTGTCGTCGGTTGCTATATGGATAACGAGA
AAGTAGCTGACTGGCCTTAAAGAAGCTCGATCCTTCGTGACGACCTGC

>ZIR-SINALOA

ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGACGTAACGGGGGCAACCAGTGCTTGGGCCGGTATGC
TTCTTCCTGAAAGCGCCTTTTAAAAACACCTCGCCTGCAGAGAGGACGTGTAGTGAATCTG
AAAATTCGCACTCTTGAGATCTCATGCGAACCTCCGGAGTGACGCCAAAGACTCAATCA
AGTTCGCCAAAGCGTCGCGTTCTTACGAGCCTTGCGACCATTTCTCGCCGCGTCGGGCGTT
GTGGTCGCAAATCCTTCCGCTGCGTTTCGCCAATTCCACCTTCACTGCTGTGGGGTATTGC
GACACGAATTACCAAGTGTGCGGGAGGTAGTGGCTCGAGTAGCAGATGGTCAGTGAATTTTC
GATGACGGGCGGACGGTATCGACAATTGACCTCCATGAACTGTACCGCGACCAGAGCGAC
ACCATGTCCTCCTTTTCGCAATTCTCGGGAGTGTGATGTCGCGCGCCAATCACCCGAATGAA
ACAGTCACGATTATCAGCAATTTTATCGAGACAATGGCGGGCAGGTGCCGCTCGGAGAG
TACGAAACACGGTTTCAGGGCGAGCAGCTCCAATAATGCCAGCGCTTCAATTTTCGATCAA
GGCATACCCAATTTGCCGTGGAATGACCAGGTGTCGTCGGTTGCTATATGGATAACGAGA
AAGTAGCTGACTGGCCTTAAAGAAGCTCGATCCTTCGTGACGACCTGC

>c1 *Streptomyces coelicolor*

CGAGCCGACGGTCGGGGCGGGCGGTGTGGGCGTCGGGCAACCAGCTGTGCAGCGGCCACAT
CGGGGTCTTGACCGCGAGCCCGATCCCGATCGCCAATACGGCGATGACCTGCACGGATGT
GGTCAGCGACCGGCCGTTGTCAAGTGGCGAGTGCCACCATGTGCAATGTGCCCGCCGTGAT
TCCGATCAGGAGCAGGCCGAGCAGCATGACGACGGAGCCGAGGAGGTGTAGAGGATGAA
CTTCCAGGCCGCCCGGCCGCTCCCTCGCCGCCCGAGCGGGCGATGAGGAAGTACATCGG
GATGAGGACCATCTCGAAGGCGAGGAAGAACAGGATCAGGTCGAGGACGGCGAAGGTCGC
GAGGGTGCCGGACTCGAGGACGAGCAGCAGTGCAGCAACGCCTTCGGGCTCGGGCCCGA
CGGCATCTTTGAAGTACGAGTAGAGCGCGAGAGGAAAGTCAGCAGCGCGGTGAGGACAG
CAGGGGGAGGGAGATGCCGTGATGCCGAGGTGGATGCGCACGTGAGTGCGGGGATCCA
GCTGATGTGCGGTGCTGGCCTGCATCTTCGACGGATGGTCGTGGTCAAGCCGAGCAGAG
GACGATCGCGGCGATGAGGACGGCGCCGGTGACGGTGACGCCGTGCCGACGAGCGGCCTG
GTCCGGGGCTTCCGTTTCGCGCTCATA

> c2 *Streptomyces coelicolor*

ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGAGCGACCGGGAGGAGGATGCGGACGAACCCGTACGTA
CCCATCTTTGAGCAGGACGCCGGCCAGCAGGACCGAGCCGACGGTCGGGGCGGGCGGTGTGG
GCGTCGGGCAACCAGCTGTGACGCGGCCACATCGGGGTCTTGACCGCGAGCCCGATCCCG
ATCGCCAATACGGCGATGACCTGCACGGATGTGGTCAGCGACCGGCCGTTGTCAAGTGGCG

AGTGCCACCATGTGCAATGTGCCCCGCCGTGATTCCGATCAGGAGCAGGCCGAGCAGCATG
ACGACGGAGCCGAGGAGGGTGTAGAGGATGAACTTCCAGGCCGCCCGGCCCGTCCCTCG
CCGCCCCAGCGGGCGATGAGGAAGTACATCGGGATGAGGACCATCTCGAAGGCGAGGAAG
AACAGGATCAGGTGAGGACGGCGAAGGTGCGGAGGGTGCCGGACTCGAGGACGAGCAGC
AGTGCGACGATCGCCTTCGGGCTCGGGCCCCGACGGCATCTTGAAGTACGAGTAGAGCGCG
CAGAGGAAAGTCAGCAGCGCGGTGAGGACCAGCAGGGGGAGGGAGATGCCGTGATGCCG
AGGTGGATGCGCACGTGAGTGCGGGGATCCAGCTGATGTCGGTGCTGGCCTGCATCTTC
GACGGATGGTCGTGGTGAAGCCGAGCACGAGGACGATCGCGGCGATGAGGACGGCGCCG
GTGACGGTGACGCCGTGCCGACGAGCGGCTGGTCCGGGGCTTCCGTTTCGCGCTCATA

> C3 *Streptomyces coelicolor*

AATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGAGCGACCGGGAGGAGGATGCGGACGAACCCGTACGT
ACCCATCTTGAGCAGGACGCCGGCCAGCAGGACCGAGCCGACGGTCGGGGCGGCGGTGTG
GGCGTCGGGCAACCAGCTGTGACGCGGCCACATCGGGGTCTTGACCGCGAGCCCGATCCC
GATCGCCAATACGGCGATGACCTGCACGGATGTGGTCAGCGACCGGCCGTTGTGAGTGGC
GAGTGCCACCATGTGCAATGTGCCCCGCCGTGATTCCGATCAGGAGCAGGCCGAGCAGCAT
GACGACGGAGCCGAGGAGGGTGTAGAGGATGAACTTCCAGGCCGCCCGGCCCGTCCCTC
GCCGCCCCAGCGGGCGATGAGGAAGTACATCGGGATGAGGACCATCTCGAAGGCGAGGA
GAACAGGATCAGGTGAGGACGGCGAAGGTGCGGAGGGTGCCGGACTCGAGGACGAGCAG
CAGTGCGACGAACGCCTTCGGGCTCGGGCCCCGACGGCATCTTGAAGTACGAGTAGAGCGC
GCAGAGGAAAGTCAGCAGCGCGGTGAGGACCAGCAGGGGAGGGAGATGCCGTGATGCCG
AGGTGGATGCGCACGTGAGTGCGGGGATCCAGCTGATGTCGGTGCTGGCCTGCATCTTC
GACGGATGGTCGTGGTGAAGCCGAGCACGAGGACGATCGCGGCGATGAGACGGCGCCCG
GTGACGGTGACGCCGTGCCGACGAGCGGCTGGTCCGGGGCTTCCGTTTCGCGCTCATA

> C5 *Streptomyces coelicolor*

ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGAGCGACCGGGAGGAGGATGCGGACGAACCCGTACGTA
CCCATCTTGAGCAGGACGCCGGCCAGCAGGACCGAGCCGACGGTCGGGGCGGCGGTGTG
GCGTCGGGCAACCAGCTGTGACGCGGCCACATCGGGGTCTTGACTGCGAGCCCGATCCC
ATCGCCAATACGGCGATGGCCTGCACGGATGTGGTCAGCGACCGGCCGTTGTGAGTGGC
AGTGCCACCATGTGCAATGTGCCCCGCCGTGATTCCGATCAGGAGCAGGCCGAGCAGCATG
ACGACGGAGCCGAGGAGGGTGTAGAGGATGAACTTCCAGGCCGCCCGGCCCGTCCCTCG
CCGCCCCAGCGGGCGATGAGGAAGTACATCGGGATGAGGACCATCTCGAAGGCGAGGAAG
AACAGGATCAGGTGAGGACGGCGAAGGTGCGGAGGGTGCCGGACTCGAGGACGAGCAGC
AGTGCGACGAACGCCTTCGGGCTCGGGCCCCGACGGCATCTTGAAGTACGAGTAGAGCGCG
CAGAGGAAAGTCAGCAGCGCGGTGAGGACCAGCAGGGGAGGGAGATGCCGTGATGCCGA
GGTGGATGCACACGTGAGTGCGGGGATCCAGCTGATGTCGGTGCTGGCCTGCATCTTC
ACGGATGGTCGTGGTCGAA

> C6 *Streptomyces coelicolor*

AATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGAGCGACCGGGAGGAGGATGCGGACGAACCCGTACGT
ACCCATCTTGAGCAGGACGCCGGCCAGCAGGACCGAGCCGACGGTCGGGGCGGCGGTGTG
GGCGTCGGGCAACCAGCTGTGACGCGGCCACATCGGGGTCTTGACCGCGAGCCCGATCCC
GATCGCCAATACGGCGATGACCTGCACGGATGTGGTCAGCGACCGGCCGTTGTGAGTGGC
GAGTGCCACCATGTGCAATGTGCCCCGCCGTGATTCCGATCAGGAGCAGGCCGAGCAGCAT
GACGACGGAGCCGAGGAGGGTGTAGAGGATGAACTTCCAGGCCGCCCGGCCCGTCCCTC
GCCGCCCCAGCGGGCGATGAGGAAGTACATCGGGATGAGGACCATCTCGAAGGCGAGGA
GAACAGGATCAGGTGAGGACGGCGAAGGTGCGGAGGGTGCCGGACTCGAGGACGAGCAG
CAGTGCGACGAACGCCTTCGGGCTCGGGCCCCGACGGCATCTTGAAGTACGAGTAGAGCGC
GCAGAGGAAAGTCAGCAGCGCGGTGAGGACCAGCAGGGGAGGGAGATGCCGTGATGCCG
AGGTGGATGCGCACGTGAGTGCGGGGATCCAGCTGATGTCGGTGCTGGCCTGCATCTTC
GACGGATGGTCGTGGTGAAGCCGAGCACGAGGACGATCGCGGCGATGAGGACGGCGCCG
GTGACGGTGACGCCGTGCCGACGAGCGGCTGGTCCGGGGCTTCCGTTTCGCGCTCATA

> C7 *Streptomyces coelicolor*

ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGAGCGACCGGGAGGAGGATGCGGACGAACCCGTACGTA
CCCATCTTGAGCAGGACGCCGGCCAGCAGGACCGAGCCGACGGTCGGGGCGGCGGTGTG

GCCTCGGGCAACCAGCTGTGCAGCGGCCACATCGGGGTCTTGACCGCGAGCCCGATCCCG
ATCGCCAATACGGCGATGACCTGCACGGATGTGGTCAGCGACCGGCCGTTGTCAGTGGCG
AGTGCCACCATGTGCAATGTGCCCCGCCGTGATTCCGATCAGGAGCAGGCCGAGCAGCATG
ACGACGGAGCCGAGGAGGGTGTAGAGGATGAACTTCCAGGCCGCCCCGGCCCGTCCCTCG
CCGCCCCAGCGGGCGATGAGGAAGTACATCGGGATGAGGACCATCTCGAAGGCGAGGAAG
AACAGGATCAGGTGAGGACGGCGAAGGTCGCGAGGGTGCCGGAATCGAGGACGAGCAGC
AGTGCGACGAACGCCTTCGGGCTCGGGCCCGACGGCATCTTGAAGTACGAGTAGAGCGCG
CAGAGGAAAGTCAGCAGCGCGGTGAGGACCAGCAGGGGAGGGAGATGCCGTGATGCCGA
GGTGGATGCGCACGTGAGTGCGGGGATCCAGCTGATGTCGGTGCTGGCCTGCATCTTCG
ACGGATGGTCGTGGTGAAGCCGAGCACGAGGACGATCGCGGCGATGAGGACGGCGCCGG
TGACGGTGACCCGTGCCGACGAGCGGCTTGGTCCGGGGCTTCCGTTGCGGCTCATA

> C8 *Streptomyces coelicolor*

ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGAGCGACCGGGAGGAGGATGCGGACGAACCCGTACGTA
CCCATCCTGAGCAGGACGCCGCCAGCAGGACCGAGCCGACGGTCGGGGCGGCGGTGTGG
GCGTCGGGCAACCAGCTGTGCAGCGGCCACATCGGGGTCTTGACCGCGAGCCCGATCCCG
ATCGCCAATACGGCGATGACCTGCACGGATGTGGTCAGCGACCGGCCGTTGTCAGTGGCG
AGTGCCACCATGTGCAATGTGCCCCGCCGTGATTCCGATCAGGAGCAGGCCGAGCAGCATG
ACGACGGAGCCGAGGAGGGTGTAGAGGATGAACTTCCAGGCCGCCCCGGCCCGTCCCTCG
CCGCCCCAGCGGGCGATGAGGAAGTACATCGGGATGAGGACCATCTCGAAGGCGAGGAAG
AACAGGATCAGGTGAGGACGGCGAAGGTCGCGAGGGTGCCGGAATCGAGGACGAGCAGC
AGTGCGACGAACGCCTTCGGGCTCGGGCCCGACGGCATCTTGAAGTACGAGTAGAGCGCG
CAGAGGAAAGTCAGCAGCGCGGTGAGGACCAGCAGGGGAGGGAGATGCCGTGATGCCGA
AGGTGGATGCGCACGTGAGTGCGGGGATCCAGCTGATGTCGGTGCTGGCCTGCATCTTC
GACGGATGGTCGTGGTGAAGCCGAGCACGAGG

Anexo 3

Secuencias del gen 16S obtenidas a partir de rizosfera y tubérculos de papa con síntomas de sarna común colectados en el Norte de Sinaloa.

>LCR-SINALOA

GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTC
 CACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
 GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTC
 GACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGGCCAGAGATGGTC
 GCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG
 TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCGTGCCCTTCGGG
 GTGACGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
 AGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCAGGTACAAAGAGC
 TCGCAAACCGTGAGGTGG

>LER-SINALOA

GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTC
 CACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
 GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTC
 GACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGGCCAGAGATGGTC
 GCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG
 TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCGTGCCCTTCGGG
 GTGACGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
 AGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCAGGTACAAAGAGC
 TCGCAAACCGTGAGGTGG

>PBR-SINALOA

CTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGC
 TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGC
 GGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCG
 GAAACATCCAGAGAYGGGTTCGCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
 CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGT
 TGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAG
 GAAGGTGGGGACGACGTCAAGT

>PIR-SINALOA

GAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
 GGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGT
 TCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCAC
 CAAGCAGCGGAGCATATGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGAC
 ATACACCGGAAACGGCCAGAGATGGTCCGCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATG
 GCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTG
 TCCTGTGTTGCCAGCGTGCTCTTCGGGGTGACGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCA
 ACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCAAGGGCT

>POR-SINALOA

AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
 GTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTG
 CCCCCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCAC
 AAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA
 TACATCGGAAACATCCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGG
 CTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGT
 CCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAAC
 TCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACG
 TGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAA

>RCR-SINALOA

GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA

GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTC
CACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTTAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTATTTTC
GACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATACACCGGAAACGGCCAGAGATGGTC
GCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGATGT
TGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCGTGCCCTTCGGGG
TGACGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAA
GTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCAGGTACAAAGAGCT
GCGAAACCGTGAGGTGG

>RCT - SINALOA

GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTC
CACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGCGAGTACGGCCGCAAG
GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTC
GACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGGCCAGAGATGGTC
GCCCCCTTGTGGTTCGGTGTTCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCGTGCCCTTCGGG
GTGACGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
AGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCAGGTACAAAGAGC
TGCGAAACCGTGAGGTGG

>SRR - SINALOA

CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACG
CATTAAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAA
GGCTTGACATACACCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGT
GGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGC
CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGG
GCTGCACACGTGCTACAATGGCAGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGCGGAGCGAAT
CTCAAAAAGCCGG

>ZIR - SINALOA

GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTA
GGTGTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGG
GGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGA
GCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAA
ACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAG
CTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTCTGTGTTGC
CAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA
GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAAT
GGCAGGTACAATGAGC

>ZIT - SINALOA

GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTC
CACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTC
GACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGGCCAGAGATGGTC
GCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCGTGCCCTTCGGG
GTGACGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
AGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCAGGTACAAAGAGC
TGCGAAACCGTGAGGTGG

Anexo 4

Participaciones en congresos Nacionales los cuales fueron posibles a través de este trabajo de investigación.



9, 10 y 11 de Septiembre 2010 **Tapalpa**, Jalisco, México

México, D. F., 27 de Julio de 2010.

ING. ANALILIA RETE CORRAL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CIIDIR, UNIDAD SINALOA
GUASAVE, SINALOA.

En relación con la convocatoria para la presentación de trabajos técnico-científicos en el marco del XIII Congreso Nacional de Papa a celebrarse del 9 al 11 de Septiembre de 2010 en Tapalpa, Jalisco, tenemos a bien comunicarle que el Comité Técnico-Científico del Congreso después de revisar el resumen de su trabajo titulado:

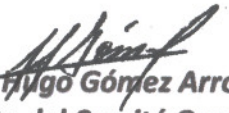
“Identificación y caracterización de *Streptomyces spp.* en el cultivo de papa en Sinaloa”

Le notifica que, por su contenido y la importancia del tema, **su trabajo ha sido aceptado** para ser presentado en Cartel durante el XIII Congreso Nacional de Papa en la **mampara Núm. 6** que para este fin se colocara en el Hotel Casa de Maty.

Por lo que mucho le agradeceremos tomar nota de las indicaciones señaladas en la convocatoria sobre la forma y tiempos de presentación, así como de los requisitos que debe de cubrir para poder presentar su trabajo. (se anexa convocatoria).

Sin otro particular y agradeciéndole mucho su confianza, quedo de usted.

Atentamente


Ing. Hugo Gómez Arroyo
Presidente del Comité Organizador

Identificación y caracterización de *Streptomyces* spp. en el cultivo de papa en Sinaloa

Identification and characterization of *Streptomyces* spp. in potato crops in Sinaloa

Rete-Corral Analilia¹, Espinoza-Mancillas Mariela Guadalupe¹, Santos-Cervantes María Elena¹, Méndez-Lozano Jesús¹, Félix-Gastelum Rubén² y Leyva-López Norma Elena¹. ¹Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR, Unidad Sinaloa, Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Guasave, Sinaloa, México CP 81101. ²Universidad de Occidente, Unidad Los Mochis, Dpto. de Ciencias Biológicas, Blvd. Macario Gaxiola y Carr. Internacional s/n Los Mochis, Sinaloa, México CP 81223.

Palabras clave: sarnacomún, *Streptomyces* spp.

Introducción

En la zona agrícola del Norte de Sinaloa se cree que la sarna común causada por alguna especie de *Streptomyces* patógena fue la causante de severas pérdidas de producción del cultivo de papa durante el ciclo 2008-2009. Se considera que esto ocurrió debido a la introducción a la zona de tubérculo semilla infectado con la sarna de la papa. Debido a que no existe información documentada en Sinaloa ni en todo el país sobre las pérdidas en el cultivo de papa asociadas a la enfermedad de la sarna común, se planteó el presente trabajo de investigación que tiene como objetivo identificar y caracterizar especies patogénicas de *Streptomyces* asociadas a la sarna común en el cultivo de papa en Sinaloa.

Materiales y Métodos

Tubérculos y suelo de la rizosfera de papa del Norte de Sinaloa fueron colectados en cinco localidades representativas de la zona papera del estado: A) Palos blancos, B) El Fuerte, C) Ruiz cortinez, D) Las colonias E) Zona industrial. Para el caso de tubérculos con lesiones típicas de la sarna común se realizaron extracciones de DNA mediante el método del CTAB (2). A las muestras de suelo de la rizosfera de papa se les realizaron diluciones seriales y se sembraron en medio NPPC para posteriormente realizar la extracción de DNA (3). Para la detección molecular por PCR se utilizaron primers específicos para *Streptomyces* Nf y Nr (1). Para la identificación molecular de los aislados se realizó la secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados por PCR

Resultados y Discusiones

Se obtuvo cuatro morfotipos distintos de *Streptomyces* spp. (1. bacteria filamentosa color blanco, 2. bacteria filamentosa color gris oscuro, 3. bacteria filamentosa color

gris claro, 4. bacteria filamentosa color verde azulado) de los cinco puntos de muestreo distribuidos homogéneamente en todo el estado de Sinaloa (cuadro 1). Se realizaron los PCR para cada morfotipo, amplificándonos el fragmento deseado de 720 pb. Los productos de PCR fueron mandados a secuenciar y el análisis de las secuencias se encuentra en proceso.

Conclusiones

Especies patógenas de *Streptomyces* se encuentran presentes en la rizosfera de los cultivos de papay son las causantes de la sarna común en el cultivo de papa en Sinaloa.

Cuadro 1. Distribución de especies de *Streptomyces* en el estado de Sinaloa.

Origen	Morfotipo 1	Morfotipo 2	Morfotipo 3	Morfotipo 4
A	3	1	1	-
B	8	4	2	3
C	3	11	4	3
D	4	3	3	1
E	5	1	1	-

Literatura citada

1. Bukhalid *et al.*, 1997. Journal of Bacteriology. Vol. 179, No. 24. 7776-7783.
2. Weng-ping *et al.*, 2003. Nucleic Acids Research. Vol. 21, No. 9, 2260-3.
3. Zang *et al.*, 1998. J. Virol. Methods 71:45-50.

XIII Congreso Nacional de papa



El Comité Organizador otorga el presente

Reconocimiento

ING. ANALILIA REYES CORRAL

a:

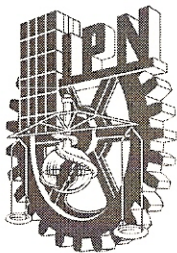
Por su participación en el XIII Congreso Nacional de Papa, celebrado en Tapalpa Jal., del 9 al 11 de septiembre de 2010, con la presentación de un cartel Técnico-Científico.

Ing. Hugo Gómez Arroyo

Presidente de la CONPAPA y Representante no Gubernamental del Comité Nacional Sistema Producto Papa

Lic. Gerardo García Menaut

Presidente de la Unión de Productores de Papa de Jalisco



Guasave, Sinaloa, México a 26 de Agosto del 2010

Estimados Rete-Corral Analilia¹, Espinoza-Mancillas Mariela Guadalupe¹, Santos-Cervantes María Elena¹, Méndez-Lozano Jesús¹, Félix-Gastelum Rubén² y *Leyva-López Norma Elena¹

Por medio de la presente se les comunica que el resumen titulado: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *STREPTOMYCES* SPP. EN EL CULTIVO DE PAPA EN SINALOA, cumple con los lineamientos que se solicitan para ser presentado en el formato de (CARTEL) en la sesión correspondiente a su área temática en el próximo VII Encuentro Nacional de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional y Reunión de profesores de la Red de Biotecnología, el cual se llevará a cabo del 11 al 13 de Octubre del 2010 en la Ciudad de Mazatlán, Sinaloa, México.

Les agradecemos su interés por participar en el encuentro y los esperamos en Mazatlán.

ATENTAMENTE

“La Técnica al Servicio de la Patria”

Dr. Ignacio E. Maldonado Mendoza
Coordinador General del VII Encuentro
Nacional de Biotecnología del IPN

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *STREPTOMYCES* SPP. EN EL CULTIVO DE PAPA EN SINALOA

Rete-Corral Analilia¹, Espinoza-Mancillas Mariela Guadalupe¹, Santos-Cervantes María Elena¹, Méndez-Lozano Jesús¹, Félix-Gastélum Rubén² y *Leyva-López Norma Elena¹. neleyval@ipn.mx.

CIIDIR, Unidad Sinaloa, Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Guasave, Sinaloa, México CP 81101. ²Universidad de Occidente, Unidad Los Mochis, Dpto. de Ciencias Biológicas, Blvd. Macario Gaxiola y Carr. Internacional s/n Los Mochis, Sinaloa, México CP 81223

Palabras clave: sarna común, PCR, *Streptomyces* spp.

Introducción En la zona agrícola del Norte de Sinaloa se cree que la sarna común causada por alguna especie de *Streptomyces* patógena fue la causante de severas pérdidas de producción del cultivo de papa durante el ciclo 2008-2009., Se considera que esto ocurrió debido a la introducción a la zona de tubérculo semilla infectado con la sarna de la papa. Debido a que no existe información documentada en Sinaloa ni en todo el país sobre las pérdidas en el cultivo de papa asociadas a la enfermedad de la sarna común, se planteó el presente trabajo de investigación que tiene como objetivo identificar y caracterizar especies patogénicas de *Streptomyces* asociadas a la sarna común en el cultivo de papa en Sinaloa.

Metodología. Tubérculos y suelo de la rizosfera de papa del Norte de Sinaloa fueron colectados en cinco localidades representativas de la zona papera del estado: A) Palos blancos, B) El Fuerte, C) Ruiz cortinez, D) Las colonias E) Zona industrial. Para el caso de tubérculos con lesiones típicas de la sarna común se realizaron extracciones de DNA mediante el método del CTAB (3). A las muestras de suelo de la rizosfera de papa se les realizaron diluciones seriales y se sembraron en medio NPPC (2) para posteriormente realizar la extracción de DNA (4). Para la detección molecular por PCR se utilizaron primers específicos para *Streptomyces* Nf y Nr (1). Para la identificación molecular de los aislados se realizó la secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados por PCR

Resultados y discusión Se obtuvo cuatro morfotipos distintos de *Streptomyces* spp. (1. bacteria filamentosa color blanco, 2. bacteria filamentosa color gris oscuro, 3. bacteria filamentosa color gris claro, 4. bacteria filamentosa color verde azulado) de los cinco puntos de muestreo distribuidos homogéneamente en todo el estado de Sinaloa (cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución de especies de *Streptomyces* en el estado de Sinaloa.

Origen	Morfotipo 1	Morfotipo 2	Morfotipo 3	Morfotipo 4
A	3	1	1	-
B	8	4	2	3
C	3	11	4	3
D	4	3	3	1
E	5	1	1	-

Se realizaron los PCR para cada morfotipo, amplificándonos el fragmento deseado de 720 pb (figura 1). Los productos de PCR fueron mandados a secuenciar y el análisis de las secuencias se encuentra en proceso.

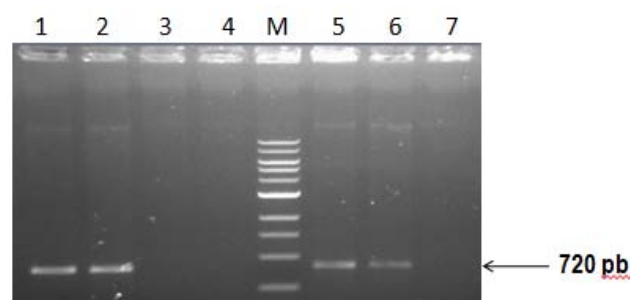


Figura 1. PCR. Carril 1, Morfotipo 1; Carril 2, Morfotipo 2; Carril 3, 4 y 7, Controles negativos; M, 1kb; Carril 5, Morfotipo 3; Carril 6, Morfotipo 4.

Conclusiones y perspectivas. Especies patógenas de *Streptomyces* se encuentran presentes en la rizosfera de los cultivos de papa y son las causantes de la sarna común en el cultivo de papa en Sinaloa. Fue de sumamente importancia la realización de estos estudios sobre identificación y caracterización del agente causal de la sarna común de la papa en Sinaloa, debido a que son varias las especies causantes de la enfermedad y distintas sus condiciones de desarrollo. Es importante colaborar con la creación de nuevas estrategias de manejo para esta enfermedad acordes a las condiciones de los agroecosistemas de la región.

Agradecimientos. CONACYT, Fundación Produce Sinaloa, CIIDIR-SINALOA, PIFI.

Referencias.

1. Bukhalid, R. A., Chung, S. Y., and Loria, R. (1998). *nec1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp, and linked to a transposase pseudogene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:960-967.
2. Hiltunen, L. H., T. Ojanpera., H. Kortemaa., E. Richter., M. J. Lehtonen., J. P. T. Valkonen. (2008). Interactions and biocontrol of pathogenic *Streptomyces* strain co-occurring in potato scab lesions. *Journal of Applied Microbiology.* 199-212.
3. Wen-ping, C., K. Tsong-teh. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research.* Vol. 21, No. 9, 2260.
4. Zhang, Y. P., J. K. Uyemoto., B. C. Kirkpatrick. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleotetic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *J. Virol. Methods* 71:45-50.

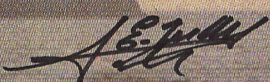
7° Encuentro Nacional de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional

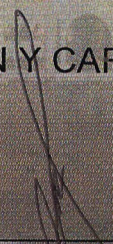
Otorga la presente

CONSTANCIA

A: Rete-Corral Analilia, Espinoza-Mancillas Mariela Guadalupe, Santos-Cervantes María Elen, Méndez-Lozano Jesú,
Félix-Gastelum Rubén² y Leyva-López Norma Elena

Por su participación con la presentación: "IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE STREPTOMYCES
SPP. EN EL CULTIVO DE PAPA EN SINALOA"


Dr. Ignacio E. Maldonado Mendoza
Coordinador General


Dr. Guillermo Pérez Ishiwara
Coordinador General de la Red de Biotecnología

11 al 13 de Octubre del 2010 en Mazatlán, Sinaloa.

"La Técnica al Servicio de la Patria"

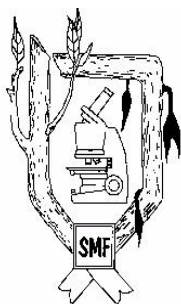


MÉXICO 2010

GOBIERNO
FEDERAL

SEP





SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGIA, A.C.

Junio 16, 2011

Estimados Analilia Rete-Corral, Mariela Guadalupe Espinoza-Mancillas, María Elena Santos-Cervantes, Alicia Chávez-Medina, Jesús Méndez-Lozano, Norma Elena Leyva-López, Rubén Félix-Gastélum:

Por medio del presente les comunico que el resumen versión corta titulado: “Identificación Molecular de *Streptomyces* Patogénicas y Evaluación de Antagonistas Nativos Contra la Sarna Común de la Papa en Sinaloa”. Cumple con los lineamientos para ser presentado en el próximo XIII congreso/XXXVIII Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, el cual se llevara a cabo del 24 al 28 de Julio del 2011, Tlaxcala, Tlaxcala.

Les agradezco su interés por participar en el congreso antes mencionado.

Atentamente

MC. Arturo Díaz Franco, Editor de Memorias

Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.
<http://sociedadmexicanadefitopatologia.org>

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *STREPTOMYCES* PATOGENICAS Y EVALUACIÓN DE ANTAGONISTAS NATIVOS CONTRA LA SARNA COMÚN DE LA PAPA EN SINALOA

(Molecular identification of pathogenic *Streptomyces* and evaluation of antagonistic against potato common scab in Sinaloa).

Analia Rete-Corral, Mariela Guadalupe Espinoza-Mancillas, María Elena Santos-Cervantes, Alicia Chávez-Medina, Jesús Méndez-Lozano, Norma Elena Leyva-López, CIIDIR, Unidad Sinaloa; Rubén Félix-Gastélum, Universidad de Occidente. Correspondencia: neleyval@ipn.mx.

En la zona agrícola del Norte de Sinaloa se cree que la sarna común causada por alguna especie de *Streptomyces* patógena fue la causante de severas pérdidas de producción del cultivo de papa durante el ciclo 2008-2009. Se sugiere que esto sucedió debido a la introducción a la zona de tubérculo semilla infectado con especies patógenicas de *Streptomyces*. Por lo tanto, se planteó el presente trabajo de investigación que tiene como objetivo identificar especies patógenicas de *Streptomyces* y evaluar antagonistas nativos contra la sarna común de la papa en Sinaloa. Muestras de tubérculos sintomáticos y de la rizosfera de papa fueron colectados en 10 localidades representativas de la zona papera de Sinaloa. A los aislados con características morfológicas de *Streptomyces* se les realizó extracción de DNA y PCR con primers específicos Nf y Nr. Se detectó por PCR en lesiones de tubérculo y en rizosfera *Streptomyces* patógenicas. Se identificó molecularmente la especie patógena *Streptomyces scabies* y al antagonista *Streptomyces coelicolor* aislados de rizosfera de papa en Sinaloa. Para las pruebas de antagonismo se probaron 11 aislados bacterianos obtenidos de la rizosfera de cultivos de papa de Sinaloa. Cuatro de los aislados bacterianos mostraron actividad antagónica contra *Streptomyces scabies* en las pruebas *in vitro*, *Bacillus simplex*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces coelicolor* y *Pseudomonas lini*, resultando este último el que presentó el mayor efecto antagónico.



SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA, A.C.



La Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. y el Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala

extienden la Presente

Constancia

Analilia Rete-Corral

a

Por su participación con la ponencia:

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Streptomyces* PATOGENICAS Y EVALUACIÓN DE ANTAGONISTAS NATIVOS CONTRA LA SARNA COMÚN DE LA PAPA EN SINALOA (Molecular identification of pathogenic *Streptomyces* and evaluation of antagonistic against potato common scab in Sinaloa). Analilia Rete-Corral, Mariela Guadalupe Espinoza-Mancillas, María Elena Santos-Cervantes, Alicia Chávez-Medina, Jesús Méndez-Lozano, Norma Elena Leyva-López, Rubén Félix-Gastélum,

XIII CONGRESO INTERNACIONAL y XXXVIII CONGRESO NACIONAL DE FITOPATOLOGÍA

*Celebrados del 24 al 28 de Julio de 2011
en la ciudad de Tlaxcala, Tlaxcala, México*

Dr. Noé Montes García

PRESIDENTE DE LA S.M.F.

Dr. Víctor Santiago Santiago

PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR LOCAL



Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

FUNDADA EN 1957

AV. CIPRESES S/N COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC,
C.P. 14400 MÉXICO, D.F. (CASA TLALPAN)
APARTADO POSTAL 70-600
TEL. Y FAX: 5622-5742
TEL. 5622-5603
<http://smb.org.mx>
Correo electrónico: smbq@fc.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2009 - 2011

PRESIDENTE
DR. JORGE VAZQUEZ RAMOS

VICE-PRESIDENTE
DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

SECRETARIO TESORERO
DRA. CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

SUB-SECRETARIO TESORERO
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarín Arreguín Lozano
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval
Dr. Joaquín Cravioto (†)
Dr. Carlos del Río Estrada (†)
Dr. Silvestre Frenk Freund
Dr. Mario García Hernández
Dr. Jesús Guzmán García
Dr. Jesús Kumate Rodríguez
Dr. José Laguna García
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)
Dr. Raúl Ondarza Vidaurreta
Dr. Efraín G. Pardo Codina
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

México, D. F., a 6 de Septiembre de 2011.

**Analilia Rete Corral
CIIDIR-SINALOA
IPN**

Estimada Congressista:

Se le informa que su trabajo:

Molecular identification of *Streptomyces* and evaluation of antagonistic against potato common scab in Northern of Sinaloa

por:

Mariela Guadalupe Espinoza-Mancillas, María Elena Santos-
Cervantes, Alicia Chávez-Medina, Jesús Méndez-Lozano, Norma
Elena Leyva-López, Rubén Félix-Gastélum and Analilia Rete Corral

Ha sido aceptado para su presentación durante el XIV Congreso de
Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, que se realizará en
Campeche, Camp., del 29 de noviembre al 2 de diciembre de 2011.

Atentamente
Por El Comité Organizador

Dra. Aída Martínez Hernández
Colegio de Postgraduados – Campus Campeche

Molecular identification of *Streptomyces* and evaluation of antagonistic against potato common scab in Northern of Sinaloa.

*Analilia Rete-Corral, *Mariela Guadalupe Espinoza-Mancillas, *María Elena Santos-Cervantes, *Alicia Chávez-Medina, *Jesús Méndez-Lozano, *Norma Elena Leyva-López, and †Rubén Félix-Gastélum.

*Departamento de Biotecnología Agrícola, CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa

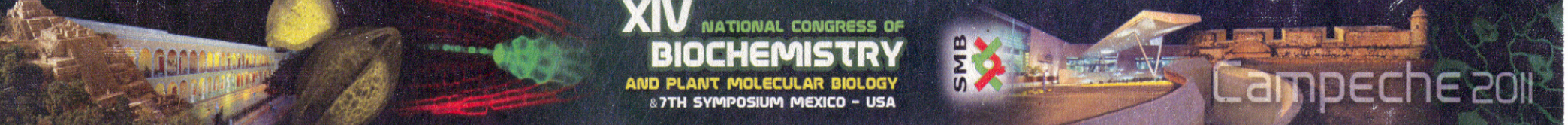
† Universidad de Occidente, Campus Los Mochis, Sinaloa.

Currentaddress: CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa

Corresponding author: neleyval@ipn.mx.

In the agricultural area of the northern Sinaloa is believed to common scab caused by some pathogenic *Streptomyces* specie was causing severe losses in potato production during the 2008-2009 cycle. It is suggested that this happened due to the introduction to the area of seed tubers infected with pathogenic *Streptomyces* species. Therefore, the aim of this study was to identify molecular *Streptomyces* and evaluate native antagonist against common scab of potato in northern of Sinaloa. *Streptomyces* were isolated from scabby potato tubers and potato rhizosphere from ten locations in three Sinaloa counties. Total DNA and genomic DNA were isolated from potato scab lesions and *Streptomyces* mycelia, respectively and according to Zhang *et al.* (2). The DNA was used as template in a PCR assay to amplify the *Streptomyces nec1* gene using primer Nf/Nr (1). Molecular species were identified as pathogenic *Streptomyces scabies* and the antagonist *Streptomyces coelicolor*. The potential antagonistic *in vitro* of eleven bacterial isolates (Isolated previously from potato rhizosphere in Sinaloa for our research group) against *Streptomyces scabies* was evaluated. Four bacterial isolates showed antagonistic activity against *Streptomyces scabies*, *Bacillus simplex*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces coelicolor* and *Pseudomonas lini*.

- 1) Bukhalid, R.A. and Loria. R. (1997). Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative factor. Journal of Bacteriology 179, 7776-7783.
- 2) Zhang, Y.P. *et al.* (1998). A small-scale procedure for extracting nucleotic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. J. Virol. Methods 71, 45-50.



The organizers of

**XIV NATIONAL CONGRESS OF BIOCHEMISTRY
AND PLANT MOLECULAR BIOLOGY
AND 7TH SYMPOSIUM MEXICO-USA**

certify that

Analilia Rete Corral

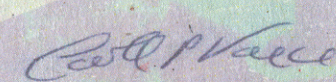
Presented the poster:

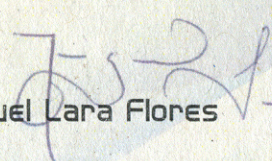
**Molecular identification of *Streptomyces* and evaluation of antagonistic against
potato common scab in Northern of Sinaloa**

by

**Analilia Rete Corral, Mariela Guadalupe Espinoza-Mancillas, María Elena Santos-Cervantes,
Alicia Chávez-Medina, Jesús Méndez-Lozano, Norma Elena Leyva-López, and Rubén Félix-Gastélum.**


Dra. Aída Martínez Hernández


Dr. Carroll Vance


Dr. Miguel Lara Flores


Dr. Scott Jackson