



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias biológicas  
Programa Magíster en Ciencias, mención en Microbiología

**Capacidad antagónica contra *Pectobacterium carotovorum*,  
*Pectobacterium atrosepticum*, y colonización de sistema  
radicular de *Solanum tuberosum* cv. Pukará-INIA, de  
actinobacterias endófitas de *Solanum tuberosum* subsp.  
*tuberosum* nativa chilena.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias, mención  
Microbiología

NATALIA PATRICIA PADILLA GALVEZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2017

Profesor Guía: Homero Urrutia Briones  
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor tutor

---

Dr. Homero Urrutia Briones  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Profesor Co-tutor

---

Ph.D. Andrés France Iglesias  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias CRI  
Quilamapu

Comisión Evaluadora:



---

Ph.D. Ivette Acuña  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias CRI  
Remehue

---

Dra. Mariana Domínguez  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Gerardo González  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Director de Programa

---

Dr. Victor Campos  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Cocepción

*Dedicado a mis padres, quienes me inspiran a perseverar por mis sueños, y a la memoria de mi hermano, quien me enseñó a amar lo que se hace.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar, el financiamiento a partir del proyecto FIA PYT 2015 0093 que permitió parte de la realización de mi proyecto de tesis.

También agradezco sinceramente el apoyo de mis tutores, quienes respaldaron desde un inicio la formulación del proyecto y acogieron la propuesta con entusiasmo, lo cual motivó mi interés para trabajar en equipo en colaboración con el Laboratorio del Banco de Recursos Genéticos Microbianos en INIA Quilamapu dirigido por Andrés France y el laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental del Centro de Biotecnología dirigido por Homero Urrutia. Quisiera reconocer que la confianza y acogida recibida por parte de ellos, me brindó la seguridad para desarrollar mi tesis de Magíster bajo el alero de sus direcciones y orientaciones.

También agradezco a la investigadora Ivette Acuña, quien gentilmente apoyó la realización de la última etapa de la tesis, permitiéndome trabajar en su laboratorio de Fitopatología en INIA Remehue, siempre aportando desde su experiencia y visión. En este lugar conocí a Sandra Mancilla, a quien también agradezco su apoyo y enseñanza, quien tuvo siempre la buena disposición de ayudarme a ejecutar los ensayos en el laboratorio de Fitopatología.

Destaco el apoyo de Paola Luengo, a quien debo agradecer todas las jornadas de trabajo intenso que pasamos en el laboratorio de Biopelículas, fue incondicional su compañía, sin importar las veces que se alargó la jornada hasta muy tarde o incluso de noche, siempre manteniendo un buen ánimo y disposición, convirtiéndose en una gran amiga a quien quiero mucho. A lo cual debo agregar los gratos momentos compartidos con ella, Claudio y el profe Homero, que en más de una ocasión cuando se alargaba la jornada, terminábamos en la plaza Perú conversando de las anécdotas de la vida.

Agradezco a mis amigos Gustavo Riveros, Rene Sanhueza y Cristian Márquez, que a lo largo del transcurso de la tesis, siempre me mostraron su preocupación para que terminara este proceso, con la mejor buena onda y siempre logrando hacerme reír en los momentos de estrés o presión por la fatiga del tiempo.

Agradezco a mis padres, a su infinito amor y comprensión, para que a pesar de las dificultades, me dieran ánimo constantemente, entregándome todo su apoyo y fortaleciendo mi confianza para que esta etapa terminara con éxito.

Finalmente gracias a todas las personas que me apoyaron en los diferentes laboratorios, con gestiones técnicas o facilitando un ambiente de trabajo armonioso.

## TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Cultivo de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.).....	1
1.2. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> y <i>Pectobacterium atrosepticum</i> ...2	
1.3. Interacción Planta - Microbio .....	4
1.4. Rol de endófitos en el control biológico.....	6
1.5. Riqueza taxonómica de la comunidad endófito.....	11
1.6. Actinobacterias como componentes de la endósfera vegetal.....	12
1.7. Papa nativa chilena ( <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> ) .....	14
HIPOTESIS DE TRABAJO .....	16
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	17
2. MATERIALES Y METODOS.....	18
2.1. Resumen general .....	18
2.2. Material Vegetal.....	18
2.3. Extracción de ADN de raíces y tubérculos.....	19
2.4. PCR-DGGE.....	19
2.5. Secuenciación de bandas en DGGE.....	20
2.6. Análisis de imágenes del DGGE.....	21
2.7. Aislamiento de actinobacterias endófitas de papa nativa .....	22
2.8. Caracterización de actinobacterias .....	23
2.9. Determinación taxonómica a través de marcador 16 S ribosomal.....	23
2.10. Análisis filogenético.....	24
2.11. Ultraestructura de actinobacterias a través de microscopía de barrido.....	25
2.12. Actividad antibacteriana .....	25
2.12.1. Difusión en agar. ....	25
2.12.2. Difusión en pocillos.....	26
2.12.3. Siembra en estrías cruzada (cross strake).....	26
2.12.4. Difusión en discos de papel. ....	27

2.13.	Co-cultivo de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> y <i>Streptomyces</i> sp. TP199.....	27
2.14.	Ensayo de biocontrol de pudrición blanda en el tubérculo de papa .....	29
2.15.	Inoculación de actinobacterias en sistema radicular de plantas de papa.....	30
2.15.1.	<i>Inóculo de actinobacterias.</i> .....	30
2.16.	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> con sonda doblemente marcada (DOPE-FISH)..	31
2.16.1.	Selección de oligonucleótido (sonda) específico para actinobacterias.....	31
2.16.2.	Fijación de muestras.....	31
2.16.3.	Cortes histológicos. ....	32
2.16.4.	Preparación de cubreobjetos. ....	32
2.16.5.	Tipo de muestras.....	32
2.16.6.	Pre-tratamiento de muestras de raíces. ....	33
2.16.7.	Hibridación. ....	33
2.16.8.	Post-hibridación.....	33
2.16.9.	Obtención de imágenes de microscopio de laser confocal.....	34
3.	RESULTADOS .....	35
3.1.	Amplificación selectiva del gen ribosomal 16S para actinobacterias y separación electroforética en gel de gradiente denaturante (DGGE) de sus polimorfismos.....	35
3.2.	Aislamiento de actinobacterias endófitas putativas de plantas de papa ( <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> ) nativa chilena. ....	38
3.3.	Antagonismo <i>in vitro</i> .....	47
3.4.	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> con sonda doblemente marcada (DOPE-FISH). ....	53
4.	DISCUSION.....	60
	Objetivo específico 1. Determinar la presencia de actinobacterias endófitas en papas nativas ( <i>S. tuberosum</i> ) chilenas. ....	60
	Objetivo específico 2. Evaluar antagonismo de actinobacterias endófitas de papa nativa ( <i>S. tuberosum</i> ) chilena frente a <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> y <i>Pectobacterium atrosepticum</i> . ....	65
	Objetivo específico 3. Determinar la capacidad de colonización de actinobacterias endófitas de papa ( <i>S. tuberosum</i> ) nativa chilena en el rizoplano y la endoriza de papa ( <i>S. tuberosum</i> ) Pukará-INIA.....	71
5.	CONCLUSIONES .....	75
6.	PROYECCIONES.....	76
7.	REFERENCIAS .....	77

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A) Síntomas de negro en cultivo. B) Pudrición blanda en tubérculo. Tomado de Acuña y Cadiz (2012). .....	3
<b>Figura 2.</b> Diferenciación de nichos en la interface suelo – raíz. Desde lo exterior a lo interior, los hábitats son suelo, rizósfera y endósfera. Disyunción celular de la superficie de la raíz durante la emergencia de raíces laterales ofrece una puerta de entrada potencial de microbiota rizosférica en el interior de la raíz. Tomado de Bulgarelli <i>et al.</i> (2013). .....	8
<b>Figura 3.</b> Análisis de agrupamiento basado en la posición de bandas en el DGGE de la comunidad de actinobacterias endófitas (círculos en imagen) y rizosféricas (estrellas en imagen) presentes en tubérculos y raíces de papa nativa chilena y papa Pukará-INIA. En la imagen del gel, bandas punteadas corresponden a presencia incierta, mientras que bandas continuas corresponden a presencia segura. En el dendograma se muestra la escala de similitud de acuerdo al índice DICE, cuyo agrupamiento se realizó según el método UPGMA, el valor de los nodos indica el índice de correlación cofenética asociado a cada agrupamiento. En verde se agrupan comunidades endófitas y en rojo, rizosféricas PK: Endósfera de raíces de <i>S. tuberosum</i> Pukará-INIA. RNE: Endosfera de raíces de <i>S. tuberosum</i> nativa chilena. RNR: Rizósfera de raíces de <i>S. tuberosum</i> nativa chilena. TNE: Endósfera de tubérculo de <i>S. tuberosum</i> nativa chilena. TNR: Rizósfera de tubérculo de <i>S. tuberosum</i> nativa chilena. 1,2: réplicas de cada muestra. a, b y c se secuenciaron y se relacionaron a los géneros <i>Streptomyces</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp. y <i>Micromonospora</i> sp., respectivamente. ....	36
<b>Figura 4.</b> Ecotipo de papa nativa. A) Planta al momento de ser muestreada. B) Tejido colectado: raíces, tallos, hojas y tubérculo. ....	39
<b>Figura 5.</b> Características macroscópicas del cultivo de aislamientos de actinobacterias endófitas putativas en ISP2 luego de 14 días de incubación a 28°C.	

1, MP136. 2, DP143. 3, HP171. 4, G1TP199. 5, A2R31. 6, CR34. 7, H2TP199. 8, KR31. 9, NP199. 10, TP199..... 40

**Figura 6.** Visualización microscópica de la morfología de los aislamientos de actinobacterias endófitas putativas observadas por microscopía óptica a 1000X teñidas con violeta de genciana. 1, MP136. 2, DP143. 3, HP171. 4, G1TP199. 5, A2R31. 6, CR34. 7, H2TP199. 8, KR31. 9, NP199. 10, TP199..... 43

**Figura 7.** Arbol filogenético que muestra la relación de las secuencias parciales del gen 16S ribosomal de los aislamientos de actinobacterias endófitas de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena con miembros del género *Streptomyces* sp. obtenidos del análisis de BLASTn. *Corynebacterium* sp. (AY211127) se utilizó para enraizar el árbol que fue construido con el método de máxima verosimilitud y un bootstrap de 1000 iteaciones con el programa MEGA6. El número de acceso de Genbank de las secuencias modelo y de secuencias analizadas del gen 16S rDNA se muestra entre paréntesis..... 44

**Figura 8.** Árbol filogenético que muestra la relación de la secuencia parcial del gen 16S ribosomal del aislamiento CR34 de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena con miembros del género *Nocardia* sp. obtenidos del análisis de BLASTn. El árbol fue construido con el método de máxima verosimilitud y un bootstrap de 1000 iteaciones con el programa MEGA6. El número de acceso de Genbank de las secuencias modelo y de secuencias analizadas del gen 16S rDNA se muestra entre paréntesis..... 45

**Figura 9.** Visualización del aislamiento *Streptomyces* sp. A2R31 a través de microscopía electrónica de barrido. A) Filamentos en ISP1 luego de 120 h de incubación en agitación a 120 rpm a 28°C. Barra de escala de 10 µm. B) Cadenas de esporas (conidias) en ISP2 luego de 14 días de incubación a 28°C. Barra de escala de 2 µm. .... 45

**Figura 10.** Visualización del aislamiento *Streptomyces* sp. TP199 a través de microscopía electrónica de barrido. A) Filamentos en ISP1 luego de 120 h de incubación en agitación a 120 rpm a 28°C. Barra de escala de 2 µm. B) Cadenas de

esporas (conidias) en ISP2 luego de 14 días de incubación a 28°C. Barra de escala de 2 µm. ....	46
<b>Figura 11.</b> Visualización del aislamiento <i>Nocardia</i> sp. CR34 a través de microscopía electrónica de barrido. A) células bacilares que se generan a partir de la septación de filamentos que forman un pseudomicelio en ISP1 luego de 120 h de incubación en agitación a 120 rpm a 28°C. Barra de escala de 2 µm. B) Agrupación de células bacilares en ISP2 luego de 14 días de incubación a 28°C. Barra de escala de 5 µm. ....	46
<b>Figura 12.</b> Evaluación de la actividad antagónica <i>in vitro</i> de los aislamientos <i>Streptomyces</i> sp. TP199 y <i>Streptomyces</i> sp. A2R31 contra <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> y <i>Pectobacterium atrosepticum</i> a través de la técnica <i>cross strike</i> . a-d indican significancia estadística (T-test, P≤0,05), N=4. ....	48
<b>Figura 13.</b> Evaluación de la actividad antagónica <i>in vitro</i> de los aislamientos <i>Streptomyces</i> sp. TP199 y <i>Streptomyces</i> sp. A2R31 frente a <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> y <i>Pectobacterium atrosepticum</i> a través de difusión con discos de agar. a-e indican significancia estadística (T-test, P≤0,05), N=4. ....	49
<b>Figura 14.</b> Efecto sobre la maceración tubérculos de papa Pukará-INIA inoculados con <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> y <i>Pectobacterium atrosepticum</i> a una concentración de 10 <sup>8</sup> células/mL y <i>Streptomyces</i> sp. A2R31 con <i>Streptomyces</i> sp. TP199 a una concentración de 10 <sup>8</sup> esporas/mL, incubados a 28°C durante 36 h, los tratamientos fueron los siguientes: i) PCC; <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ii) A2R31; <i>Streptomyces</i> sp. A2R31 iii) TP199; <i>Streptomyces</i> sp. TP199 iv) A2R31-PCC; <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> + <i>Streptomyces</i> sp. A2R31 v) TP199-PCC; <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> + <i>Streptomyces</i> sp. TP199. a-c indican significancia estadística (T-test, P≤0,05), N=3. ....	51
<b>Figura 15.</b> Cinética de crecimiento (Ln(N/N <sub>0</sub> ) ufc/mL) de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> en cultivo sólo y en co-cultivo con <i>Streptomyces</i> sp. TP199. N=3 .....	53

**Figura 16.** Imagen de microscopía de laser confocal de hibridación fluorescente in situ de cultivo puro de *Streptomyces* sp. TP199 en ISP1 con la sonda HGC69a unida al fluoroforo Cy5 en extremos 5' y 3' visualizado a través de la excitación del laser rojo lejano (excitación 633 nm /emisión 638 – 747 nm). Barra de escala; 20 µm. .... 55

**Figura 17.** Imágenes de microscopía de laser confocal de hibridación fluorescente in situ de raíces de *S. tuberosum* Pukará-INIA control (sin inocular con *Streptomyces* sp. TP199) con sonda HGC69a unida a Cy5 en extremos 5' y 3'. Se muestra la autofluorescencia del tejido por separado y en una imagen compuesta, donde se visualiza en verde la excitación a 488 nm y emisión a 490 – 560 nm, en azul correspondiente a luz UV la excitación a 405 nm y emisión a 410 – 480 nm y en rojo correspondiente a luz rojo lejano la excitación a 633 nm y emisión a 638 – 747 nm A: Corte transversal de raíz en zona apical meristemática, barra de escala de 30 µm B: Superficie de raíz en zona apical meristemática, barra de escala de 50 µm C: Corte Longitudinal de raíz en zona de elongación, barra de escala de 50 µm. Rz; Rizodermis. Pz; Tejido provascular. Px; Protoxilema (flechas amarillas). ..... 56

**Figura 18.** Imágenes de microscopía de laser confocal de hibridación fluorescente in situ de raíces de *S. tuberosum* Pukará-INIA, inoculada con *Streptomyces* sp. TP199, con sonda HGC69a unida a Cy5 en extremos 5' y 3'. Se muestra la autofluorescencia del tejido por separado y en una imagen compuesta, donde se visualiza en verde la excitación a 488 nm y emisión a 490 – 560 nm, en azul correspondiente a luz UV la excitación a 405 nm y emisión a 410 – 480 nm y en rojo correspondiente a luz rojo lejano la excitación a 633 nm y emisión a 638 – 747 nm a-b: Superficie de raíz en zona pilífera después de 3 días desde la inoculación de *Streptomyces* sp. TP199. c-e: Rizodermis. f-g: Cortes histológicos longitudinales de raíz en zona de elongación después de 7 días desde la inoculación de *Streptomyces* sp. TP199. Rz: Rizodermis. Cr: Célula rizodérmica. Pr: Pelo radicular. Pz: Tejido provascular. Mx: Metaxilema. Px: Protoxilema. a-b, f-g: Barra de escala de 60 µm. c-e: Barra de escala de 20 µm. Flechas amarillas indican fluorescencia de sonda HGC69a..... 58

**Figura 19.** Imagen de microscopía de laser confocal de hibridación fluorescente in situ de una raíz de *S. tuberosum* Pukará-INIA, inoculada con *Streptomyces* sp.

TP199, con sonda HGC69a unida a Cy5 en extremos 5' y 3'. Se muestra la autofluorescencia en rojo lejano cuya excitación es a 633 nm y emisión a 638 – 747 nm. Vt: Vaso de metaxilema, Pc: Pared celular vegetal, Ei: Espacio intercelular eucarionte. Flechas amarillas indican fluorescencia de sonda HGC69a. Barra de escala de 5  $\mu\text{m}$ ..... 59



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Partidores utilizados para la amplificación selectiva de la región V3 del gen ribosomal 16S de Actinobacterias. ....	21
<b>Tabla 2.</b> Riqueza ponderada (Rr) obtenida a partir de los polimorfismos del gen 16S ribosomal e el PCR-DGGE en diferentes compartimentos de <i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> nativa chilena y <i>Solanum tuberosum</i> Pukará-INIA. ....	37
<b>Tabla 3.</b> Descripción fenotípica macro y microscópica de los aislamientos de actinobacterias endófitas de <i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> nativa chilena e identidad taxonómica de acuerdo al gen 16S ribosomal. ....	42
<b>Tabla 4.</b> Parámetros de la cinética de crecimiento del co-cultivo de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> y <i>Streptomyces</i> sp. TP199 de acuerdo al modelo de Gomperz (Zwietering <i>et al.</i> 1994).....	52



## RESUMEN

Las actinobacterias son parte de la microbiota endófitas de diferentes plantas, las cuales son reconocidas por la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Las papas nativas Chilotas (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* L.) representan una fuente inexplorada de endófitos con potencial de control biológico de patógenos, como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) y *Pectobacterium atrosepticum* (Pca), causantes de Pudrición blanda y Pie negro en papa. El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad antagónica contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* y de colonización del sistema radicular de *Solanum tuberosum* cv. Pukará-INIA, de actinobacterias endófitas de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena. Para determinar la riqueza de actinobacterias, se evaluó el polimorfismo del gen ADN16Sr mediante electroforesis en gel denaturante (DGGE). Luego, se realizó el aislamiento de actinobacterias a partir de tejidos desinfectados superficialmente en medio HVA. Se evaluó antagonismo contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* a través de técnicas de difusión en agar *in vitro* e inhibición de la maceración de tubérculos (Pukará-INIA). Para visualizar las actinobacterias en la endoriza de papa Pukará-INIA, se realizó DOPE-FISH y microscopía confocal. Los resultados indicaron que la riqueza de actinobacterias endófitas en papa nativa fue mayor ( $P < 0,05$ ) a la presente en papa cultivada Pukará-INIA con dominancia de *Streptomyces* spp. *Micromonospora* spp. y *Arthrobacter* spp. Dos aislamientos de *Streptomyces* inhibieron el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* *in vitro.*, sin embargo, sólo *Streptomyces* sp. TP199 disminuyó ( $P < 0,05$ ) la maceración en tubérculos y se visualizó en la endoriza de papa Pukará-INIA. Se concluye que las actinobacterias están presentes en papas Chilotas y pueden tener efectos antagónicos contra patógenos bacterianos.

## ABSTRACT

Actinobacterias are part of the endophytic plant microbiome. This phylum is recognized by the capability of synthesize secondary metabolites which have antimicrobial activity. Native chilean potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) represents an unexplored source of endophytes which might be biocontrol agents against diseases like Soft rot and Blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*. The main object of this work was to study the antagonistic activity against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*, and the colonization capacity into the roots of *Solanum tuberosum* cv. Pukará-INIA, of Actinobacterial endophytes from the Chilean native potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). The richness of Actinobacterial community was evaluated by mean of 16 S ribosomal gene polymorphism (PCR-DGGE technique). Then, different strains of actinobacteria were isolated from superficially disinfected pieces of plants tissues using HVA culture media. The antagonism against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* was evaluated *in vitro* by diffusion agar technique and through the measurement of the macerated tissue on tubers. To visualize the colonization of the actinobacteria into the endorize of potato plants, DOPE-FISH and Confocal Microscopy were used. Results indicated that richness of the actinobacterial endophytes from native potato was significantly higher than commercial potato cv. Pukará-INIA. Isolations belonged to Streptomyces, Micromonospora and Arthrobacter genus. Two Streptomyces isolations got to inhibit the growth of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* *in vitro*. However, only Streptomyces sp. TP199 decrease maceration on tubers and it was able to colonize the endorhyze of Potato Pukará-INIA. This work demonstrated that, endophytic Actinobacteria are present in native Chilean potato and they are potential biocontrol agent for bacterial phytopathogen

# 1. INTRODUCCION

## 1.1. Cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.)

La papa (*Solanum tuberosum* L.) se cultiva en todo el mundo y es actualmente el cuarto cultivo más importante a nivel global después del trigo (*Triticum* spp.), el maíz (*Zea mays*) y el arroz (*Oryza sativa*), cuya producción alcanzó 385 millones de toneladas el año 2014 con un rendimiento de 205,5 Hg/Ha (FAO 2015).

En Chile se cultivan anualmente alrededor de 50 mil hectáreas con papas, siendo el cuarto cultivo en superficie que tiene el mayor número de agricultores; 59.606 según el VII censo agropecuario, la mayor parte de ellos pequeños (ODEPA 2014). Su producción estimada para la temporada 2015 fue de 910.990 toneladas, con una superficie de 50.526 hectáreas y un rendimiento promedio de 18 toneladas por hectárea, un 17% menor que el de la temporada anterior (2014) (FAO 2015, Pfeaur 2015). Esta producción es destinada casi totalmente al mercado interno como alimento básico en la dieta de los chilenos (ODEPA 2015), con un consumo per cápita cercano a 50 Kg por año (Pfeaur 2015).

El tubérculo de la papa constituye un tejido vegetal de reserva que ofrece beneficios nutricionales que sustentan el interés de su producción, ya que es rico en carbohidratos, proteínas, vitamina C y potasio (Shewry 2003, FAO 2008). El cual además de ser un alimento básico, también es procesado para la producción de papas fritas, chips, producción de almidón y productos secos (Vreugdenhil *et al.* 2007).

## **1.2. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum***

Una de las principales amenazas de la producción de papa son las enfermedades causadas por patógenos bacterianos, ya que una vez introducidos en el cultivo pueden persistir y diseminarse en ambientes agrícolas de manera inadvertida o en infecciones latentes (asintomáticas) de tubérculos semilla (Vreugdenhil *et al.* 2007, Tein *et al.* 2015). Bajo condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, los fitopatógenos bacterianos se multiplican rápidamente y causan significativas pérdidas en el rendimiento del cultivo, provocando a la vez un daño económico (Vreugdenhil *et al.* 2007). Las pérdidas asociadas a pudriciones producidas por bacterias pectinolíticas, puede alcanzar el 60%; considerando campo, transporte y almacenamiento de tubérculos (Mantsebo *et al.* 2014). Estas enfermedades son especialmente dañinas en climas húmedos como el sur de Chile o en cultivos con riego mal aplicado (Acuña y Cadiz 2012).

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*, anteriormente denominados *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, son los agentes etiológicos causantes de las enfermedades “pie negro” (planta) y “pudrición blanda” (tubérculo) en papa (Hauben *et al.* 1998, Charkowski 2008). Se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos, no forman esporas, móviles y con flagelos peritricos, pertenecen a la subdivisión  $\gamma$  – *Proteobacteria*, agrupados en la familia *Enterobacteriaceae* (Hauben *et al.* 1998, Charkowski 2008).

La patogenicidad de estas bacterias está determinada, principalmente, por la secreción coordinada de exoenzimas que degradan la pared celular vegetal (PCWDE, en inglés; *plant cell wall degrading enzymes*), que incluye isoenzimas de proteasas, endoglucanasas, poligalacturonasas, pectato liasas y xilanasas (Toth *et al.* 2003, Lee *et al.* 2013) vinculadas a un sistema de secreción tipo II (T2SS) por el cual

se secretan los determinantes de patogenicidad (Toth *et al.* 2003, Onkendi y Moleleki 2014). La regulación de la expresión de los genes que codifican estos factores de virulencia en *Pectobacterium* sp. es controlada por quorum sensing a través de un conjunto de factores transcripcionales y reguladores post-transcripcionales (Pollumaa *et al.* 2012, Cubitt *et al.* 2013, Lee *et al.* 2013), en respuesta a estímulos ambientales y a la densidad celular (Pollumaa *et al.* 2012, Bowden *et al.* 2013). Por lo tanto, el desarrollo de la enfermedad en los tubérculos y tallos de la papa es comprendido en términos de la interacción entre el patógeno, el hospedero, el ambiente, la competencia microbiana y las bases moleculares de la patogenicidad (Pérombelon 2002).



**Figura 1.** A) Síntomas de negro en cultivo. B) Pudrición blanda en tubérculo. Fuente: Acuña y Cadiz (2012).

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* se han definido como patógenos oportunistas (Czajkowski *et al.* 2011), ya que son capaces de vivir en el tejido vegetal y en el suelo, sin causar síntomas de enfermedad en la planta. Czajkowski *et al.* (2010) demostró que las bacterias en el suelo, pueden colonizar las raíces y entrar por el sistema vascular de la planta, sin causar síntomas, ni signos de enfermedad. Por lo tanto, estas bacterias pueden ingresar a la planta a través de aperturas naturales o a través de heridas (Toth *et al.*

2003, Mantsebo *et al.* 2014). Se pueden mantener en lenticelas (poros en la superficie del tubérculo que permite el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono durante la respiración celular), en el extremo de un estolón y en heridas, hasta que las condiciones ambientales sean favorables respecto a la presencia de agua libre, condición de anaerobiosis y temperatura, para comenzar el desarrollo de la enfermedad (figura 1) (Perombelon 2002, Toth *et al.* 2003, Mantsebo *et al.* 2014).

Los síntomas de pie negro, pueden ocurrir en cualquier estado de desarrollo de la planta. Los tallos de la planta infectados muestran una pudrición de color negro (figura 1A), el cual generalmente comienza con la pudrición del tubérculo semilla (Perombelon 2002, Toth *et al.* 2003, Acuña y Cadiz 2012, Mantsebo *et al.* 2014).

Para el control de estas enfermedades, los compuestos bactericidas son inefectivos como agentes de protección de los cultivos y su utilidad para desinfectar tubérculos semilla es limitada, por lo tanto no existe un control químico eficiente (Vreugdenhil *et al.* 2007, Mantsebo *et al.* 2014). El método más adecuado de control preventivo, principalmente cuando el problema es la infección latente del tubérculo madre, es usar tubérculos semillas proveniente de material limpio de *Pectobacterium spp.*, lo cual se puede conseguir a través de esquejes, por multiplicación rápida *in vitro* o por semilla botánica (Acuña y Cadiz 2012).

### **1.3. Interacción Planta - Microbio**

La composición de la microbiota asociada a una planta es un factor determinante en la salud de ésta (Lugtenberg y Kamilova 2009, Andrews *et al.* 2010, Berendsen *et al.* 2012, Berg *et al.* 2014). Las interacciones entre la planta y los microorganismos pueden ser de tipo parasitismo (relación entre dos especies en la cual uno, el parásito, se beneficia del otro, el hospedero; esto involucra el detrimento del organismo hospedero), comensalismo (relación entre dos especies en la cual una

especie se beneficia y la otra no se ve afectada ni positiva, ni negativamente) o mutualismo (relación de beneficio mutuo entre dos especies, especialmente una relación mutualista beneficiosa obligada, sin la cual no se puede sobrevivir) (Newton *et al.* 2010), y ocurren a nivel de rizósfera, filósfera y endósfera de la planta (Turner *et al.* 2013).

La rizósfera se define como la zona de influencia de los sistemas radiculares de las plantas en el suelo y representa un *hot spot* de interacciones microbianas y exudados liberados por las raíces que atraen organismos beneficiosos o deletorios para la planta, alcanzando concentraciones de  $10^{10}$  células/g (Raaijmakers *et al.* 2009, Doornbos *et al.* 2012). La filósfera corresponde a la interface aérea de la planta colonizada en su mayoría por bacterias epífitas con densidades que alcanzan  $10^8$  células/cm<sup>2</sup> (Berlec 2012, Rastogi *et al.* 2013). La endosfera corresponde al hábitat interno de la planta, que puede ser colonizado por microorganismos endófitos (Hardoim *et al.* 2015), estableciendo subpoblaciones en un rango de  $10^5 - 10^7$  células/g de peso fresco, el cual puede variar según el tejido y especie de la planta (Hallman y Berg 2006, Compant *et al.* 2010, Bulgarelli *et al.* 2013). En el caso de la papa se ha reportado una densidad de  $10^5$  ufc/g en raíces (Krechel *et al.* 2002).

Los microorganismos que componen la microbiota benéfica para la planta pueden actuar en la supresión de enfermedades (Ridout y Newcombe 2016), en la estimulación del crecimiento vegetal (Armanda *et al.* 2016), en ocupar un espacio que por otro lado podría estar disponible para patógenos (Köberl *et al.* 2013), en promover resistencia al estrés (Martínez – Hidalgo *et al.* 2015) y finalmente influenciar el rendimiento de un cultivo y la calidad de éste por la movilización y transporte de nutrientes (Lugtenberg y Kamilova 2009, Berendsen *et al.* 2012, Berg *et al.* 2014).

#### 1.4. Rol de endófitos en el control biológico

El control biológico se plantea como una herramienta alternativa y sustentable para la prevención y control de enfermedades infectocontagiosas en plantas (Welbaum *et al.* 2004, Compant *et al.* 2005). Involucra el estudio de las interacciones microbianas del agente controlador con el hospedero y el patógeno para reducir el inóculo del patógeno o controlar la severidad de los síntomas de enfermedad (Campbell 1989).

El término endófito se ha aplicado a microorganismos cuyo nicho ecológico es el interior de una planta, es decir, la endósfera (Podolich *et al.* 2015). La endosfera representa un hábitat de interacción íntima con la planta, donde los microorganismos endófitos pueden colonizar el tejido interno vegetal durante su ciclo de vida completo o durante una parte de éste (Reinhold – Hurek y Hurek 2011, Hardoim *et al.* 2015). De acuerdo a estas estrategias de vida, los endófitos pueden ser clasificados como “obligados” o “facultativos”. Los endófitos obligados son estrictamente dependientes de la planta hospedera para su multiplicación, sobrevivencia y transmisión a otras plantas. Los endófitos facultativos tienen una etapa de vida en la cual existen fuera de la planta hospedera (Hardoim *et al.* 2008, Hardoim *et al.* 2015).

Se ha observado que la mayoría de las bacterias endófitas derivan de la rizósfera (figura 2), las cuales tienen la capacidad de entrar a la endoriza (interior de la raíz) de sus hospederos una vez que el rizopiano (superficie de la raíz) ha sido colonizado (Hallman y Berg 2006, Hardoim *et al.* 2015). La colonización se define como el establecimiento de un sitio de reproducción microbiana, sobre o dentro de un hospedero, el cual no necesariamente resulta en la invasión o daño de los tejidos (Prescott 2002). La colonización depende de la capacidad de las bacterias para competir con éxito con la microbiota normal del hospedero. Estructuras especializadas son necesarias para que la bacteria pueda adherirse como primera etapa de la colonización (Prescott 2002). En general, se ha propuesto que la composición de la comunidad endófitas presente en una planta, está determinada por

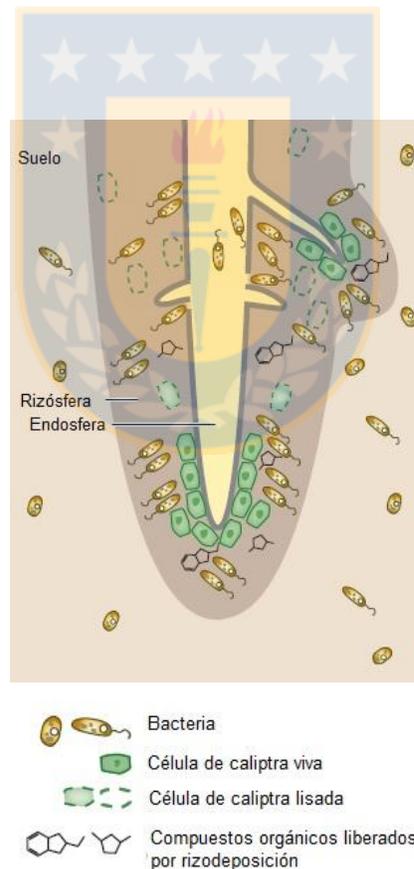
una miríada de factores, entre ellos, la composición del suelo, el genotipo de la planta hospedera y las competencias de la bacteria endófito (Danhorn y Fuqua 2007, Gaiero *et al.* 2014).

Los principales puntos de colonización descritos en la raíz, son los puntos de emergencia de pelos radiculares laterales, zonas de elongación y diferenciación celular y espacios intercelulares en la epidermis y la corteza de la raíz (figura 2) (Reinold – Hurek y Hurek 2011, Mercado – Blanco y Prieto 2012). Cabe mencionar, que los procesos de infección no necesariamente involucran mecanismos activos, la penetración pasiva puede tener lugar en las puntas radiculares y/o grietas; generadas en sitios de emergencia radicular (figura 2) o creadas por microorganismos deletéreos para la planta (Compant *et al.* 2010).

En el estudio realizado por Meneses *et al.* (2011), se demostró que la infección y colonización endófito de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, requiere la biosíntesis de exopolisacáridos, el cual es requerido para la formación de biopelículas sobre el sistema radicular de arroz (*Oryza sativa*). Mientras que Balsanelli *et al.* (2010) reportaron que los lipopolisacáridos cumplieron un rol determinante en *Herbaspirillum seropedicae* para que se llevara a cabo la adherencia de la bacteria en la raíz de maíz (*Zea mays*) y la colonización interna del tejido vegetal. En el estudio de Buschart *et al.* (2012) encontraron que el flagelo en *Azoarcus* sp. BH72, fue requerido para la colonización endófito, sin embargo, en la cepa mutada sin flagelo, no se impidió la formación de microcolonias en la superficie de la raíz de arroz (*Oryza sativa*). En el trabajo desarrollado por Böhm *et al.* (2007), la movilidad contráctil en *Azoarcus* sp. BH72 fue determinante para la invasión y establecimiento interno de la planta, aunque el Pili tipo IV no fue esencial para que se desarrollara la colonización en la superficie de arroz (*O. sativa*). Finalmente la secreción de enzimas como endogluconasas, también forman parte de las competencias que requieren los endófitos para establecerse en el tejido vegetal interno de la planta (Reinhold – Hurek *et al.* 2006). Por lo tanto, la adherencia, la formación de microcolonias y

biopelículas en la superficie del tejido vegetal parecen ser pasos requeridos para la posterior colonización del tejido interno (Dahorm y Fuqua 2007, Mercado – Blanco y Prieto 2012).

Durante la co-existencia de los endófitos y sus hospederos, se ha considerado que han ocurrido procesos de co-evolución, donde los endófitos han desarrollado estrategias para mantenerse exitosamente en este nicho ecológico logrando una interacción simbiótica con la planta hospedera, contribuyendo en los mecanismos de defensa de la planta (Wani *et al.* 2015), por lo tanto, el estudio de endófitos ha surgido como una alternativa para el control de patógenos, específicamente, aquellos que infectan el sistema vascular de las plantas (Mercado-Blanco y Prieto 2012, Eljounaidi *et al.* 2016).



**Figura 2.** Diferenciación de nichos en la interface suelo – raíz. Desde lo exterior a lo interior, los hábitats son suelo, rizósfera y endósfera. Disyunción celular de la superficie de la raíz

durante la emergencia de raíces laterales ofrece una puerta de entrada potencial de microbiota rizosférica en el interior de la raíz. Fuente: Bulgarelli *et al.* (2013).

En el trabajo realizado por Upreti y Thomas (2015), se comparó las competencias antagónicas de endófitos de tomate de un cultivar resistente y un cultivar susceptible a *Ralstonia solanaceum*. Sus conclusiones fueron que la prevalencia de una mayor diversidad de bacterias endófitas y actividad antagónica, de bacterias aisladas de raíces de tomate del cultivar resistente, en comparación con el genotipo susceptible, sugieren un posible rol de los endófitos asociados a las raíces, en la defensa natural frente a patógenos.

En consecuencia, los endófitos facultativos se proponen como potenciales agentes de biocontrol, que presentan competencias adaptativas para colonizar la superficie de la raíz, lo cual podría ser un paso determinante para la expresión de efectos beneficiosos para la planta hospedera antagonizando patógenos a través de la competencia por el nicho ecológico (Kamilova *et al.* 2005, Kamilova *et al.* 2007, Pang *et al.* 2009).

Si bien, se han reportado aislamientos de endófitos (Reinhold – Hurek y Hurek 2011), muchos de estos se han obtenido a partir de tejidos vegetales desinfectados superficialmente, sin evidencia explícita de la interacción de estos microorganismos con la planta hospedera (Nimnoi *et al.* 2010, Verma *et al.* 2011, Lai *et al.* 2012). Considerando que las uniones celulares de las células epidérmicas de la raíz son sitios comunes de adherencia bacteriana, donde las bacterias se encuentran íntimamente adheridas a hendiduras y/o embebidas en mucílagos, es muy probable que estas bacterias puedan escapar de la desinfección química superficial y ser erróneamente clasificadas como endófitas, Por lo tanto, Reinhold-Hurek y Hurek (2011) indican que el criterio para reconocer una bacteria endófitas “verdadera” requiere no sólo el aislamiento a partir de un tejido desinfectado superficialmente,

sino que también una evidencia microscópica para visualizar la bacteria marcada dentro del tejido vegetal.

Esta evidencia microscópica se puede conseguir a través del análisis de imágenes, donde se ha logrado un progreso en la comprensión de la interacción planta – microbio a través del uso de la microscopía de laser confocal basada en detectar organismos marcados con proteínas fluorescentes o a través de la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Cardinale 2014). Rosenblueth y Martínez – Romero (2006) recomiendan utilizar el término “putativo” para aquellas bacterias que no han sido validadas microscópicamente como endófitas. Y agregan que un “verdadero” endófito podría también ser reconocido por su capacidad de re-infectar plántulas desinfectadas.

Compant *et al.* (2013) marcaron *Saccharothrix algeriensis* NRRL a través de DOPE-FISH y visualizaron la colonización de la bacteria en raíces de vid después de 10 días desde la inoculación, específicamente en sitios de emergencia radicular, zonas de elongación y endoriza a través de microscopio de epifluorescencia. Krzyzanowska *et al.* (2012) observaron la formación de microcolonias de *Bacillus subtilis* MB73/2, *Pseudomonas* sp. P482 y *Ochrobactrum* sp. A44 sobre la superficie de raíces de *S. tuberosum*, marcados con la proteína fluorescente GFP y visualizadas a través de microscopía de laser confocal (LSM). En el trabajo realizado por Bonaldi *et al.* (2015) se marcó un aislamiento de *Streptomyces* sp. con la proteína verde fluorescente y observaron a través de LSM, que esta cepa fue capaz establecerse en el suelo y colonizar la rizósfera y endósfera de raíces de lechuga.

### 1.5. Riqueza taxonómica de la comunidad endófitas

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación y sus correspondientes herramientas bioinformáticas han permitido revelar la estructura taxonómica y abundancia relativa de los miembros de las diferentes comunidades que habitan las plantas, ya sean; rizosféricas, epífitas o endófitas (Bulgarelli *et al.* 2013, Turner *et al.* 2013), donde la composición filogenética de estas comunidades se ha definido dominante para bacterias pertenecientes a los *phylum*; Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria (Bulgarelli *et al.* 2013, Hardoim *et al.* 2015).

En el caso del cultivo de papa, en el trabajo realizado por Pageni *et al.* (2013) los grupos de bacterias endófitas dominantes se estructuraron con miembros de los *phylum* Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria y Bacteroidetes a través de un análisis de T-RFLP. Que corresponde a lo propuesto por Bulgarelli *et al.* (2013). Mientras que en el estudio de Sessitsch *et al.* (2002), quienes estudiaron la estructura de las poblaciones de endófitas bacterianas en tres variedades de papa a través de T-RFLP (Terminal Restriction fragment Length Polymorphism) y DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), encontraron dominancia de los grupos Proteobacteria y Actinobacteria. Estos resultados coinciden con los resultados de Lundberg *et al.* (2012), quienes estudiaron la microbiota asociada a la raíz de *Arabidopsis thaliana*, distinguiendo la microbiota de la rizósfera y de compartimentos endófitas radiculares y encontraron que los compartimentos endófitas tienen una comunidad de baja complejidad enriquecida marcadamente en Actinobacteria y familias específicas de Proteobacteria, cuyo análisis se hizo a través de secuenciación masiva. Koiv *et al.* (2015) estudiaron la estructura de la comunidad endófitas de tubérculos de *S. tuberosum* previa y post infección con *P. atrosepticum*, y también miembros del *phylum* actinobacteria se encontraron presentes a través de un análisis de secuenciación masiva del gen 16Sr. Por lo tanto, el *phylum* actinobacteria podría ser un grupo taxonómico inocuo en la comunidad endófitas de diferentes plantas. Sin embargo, hay que considerar, según lo

que indican Hardoim *et al.* (2008) que la estructura de la comunidad microbiana asociada a la planta podría variar de acuerdo a la especie vegetal y el tipo de suelo.

### **1.6. Actinobacterias como componentes de la endósfera vegetal.**

Las actinobacterias son conocidas por la producción de metabolitos secundarios, específicamente actinobacterias filamentosas productoras de alrededor del 45% de todos los metabolitos secundarios de origen microbiano, donde un 80% de éstos corresponden a 7600 compuestos producidos por *Streptomyces sp.* (Berdy 2005, Firáková *et al.* 2007).

Miembros del *phylum* Actinobacteria han demostrado actividad antagónica frente a fitopatógenos *in vitro* e *in vivo*, actuando a través de diversos mecanismos caracterizándolos como PGPB (Bacterias promotoras de crecimiento vegetal) o PGPR (Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal) y potenciales agentes de control biológico (El – Tarabily y Sivasithamparam 2006, Franco – Correa 2008, Errakhi *et al.* 2009, Gopalakrishnan *et al.* 2012, Evangelista – Martínez 2013, Medina *et al.* 2013, Poovarasan *et al.* 2013).

Las actinobacterias son bacterias Gram positivas o Gram variables, aerobios o anaerobios facultativos o anaerobios, los cuales tienen una pared rígida que contiene ácido murámico. La mayoría son quimiorganotrofos los cuales crecen a pH neutro, pero hay acidófilos o alcalófilos. Otros son halófilos y algunos termófilos. El contenido de G+C en su ADN, varía desde un 50% en algunas *Corynebacterias sp.*, *Hoyosella* y *Tropheryma*, a más de un 70% en *Streptomyces sp.* y *Frankia sp.* Exhiben una gran variedad de morfologías, pero la mayoría se diferencia por su crecimiento filamentoso. Los miembros de este taxón están ampliamente distribuidos en hábitat terrestres y acuáticos (Ventura *et al.* 2007, Goodfellow *et al.* 2012). Este *phylum* abarca 5 clases, 19 órdenes, 50 familias y 221 géneros (Goodfellow *et al.* 2012).

El – Tarabily (2003) encontró una actinobacteria endófitas, específicamente *Actinoplanes missouriensis*, capaz de inhibir significativamente el crecimiento del hongo *Plectosporium tabacinum in vitro*, agente causal de pudrición de la raíz en lupino a través de la plasmólisis y la lisis de la pared celular del hongo por la actividad de quitinasas producidas por la actinobacteria.

De Oliveira *et al.* (2010) estudiaron 70 aislamientos de actinobacterias endófitas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), de las cuales un 88,6% mostraron actividad antimicrobiana frente al menos un fitopatógeno, un 72,1% mostró una reacción positiva para la producción de ácido indolacético (fitohormona), un 86,8% produjo sideróforos y un 16,2% mostró una reacción positiva para la solubilidad de fosfato. Hubo un aislamiento con actividad antagonica frente a todos los microorganismos fitopatogenos estudiados y se relacionó a *Streptomyces pluricologrescens*.

Verma *et al.* (2011) encontraron 3 aislamientos de actinobacterias endófitas, cuya identidad se relacionó a *Streptomyces sp.* capaces de promover significativamente el crecimiento vegetativo de plantas de tomate y antagonizar el crecimiento de *Alternaria alternata*, el agente causal de la enfermedad del tizón temprano en plantas de tomate, a través de la producción de sideroforos y ácido indolacético.

En los ejemplos citados, se observó la capacidad de actinobacterias endófitas de antagonizar diferentes fitopatógenos, sin embargo, en ningún caso se realizó una validación explícita de los aislamientos endófitos, por lo tanto, como sugiere Rosenblueth y Martínez – Romero (2006) se deberían reportar como actinobacterias endófitas putativas.

En cuanto al control biológico de miembros de *Pectobacterium sp.* causantes de “pudrición blanda” en tubérculos de papa y “pie negro” en plantas de papa, Baz *et al.* (2012a) encontraron actinobacterias aisladas de suelo rizosférico, relacionadas con

*Streptomyces sp.*, capaces de reducir la severidad de los síntomas entre un 65% y 94% en rodajas de tubérculo de papa infectadas con *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. atrosepticum*.

Mientras que Chankhamhamhaengdecha *et al.* (2013) demostraron en un ensayo de patogenicidad *in vitro*, la eficiencia de HSL – acilasas purificadas parcialmente de un aislamiento de *Streptomyces* endófito, capaz de suprimir la pudrición blanda causada por *P. carotovorum* dado que la síntesis de enzimas pectinolíticas está regulada bajo quórum sensing tipo I. Reportando su trabajo como el primero respecto a la producción de HSL-acilasas derivadas de un *Streptomyces sp.* endófito. Sin embargo, como se explicó anteriormente, esta actinobacteria corresponde a un endófito putativo, ya que no se validó la capacidad de esta actinobacteria endófito de colonizar el tejido vegetal vivo de papa.

### **1.7. Papa nativa chilena (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*)**

Varias hipótesis gobiernan la estrategia de selección de plantas para el aislamiento de endófitos, que corresponden a i) Plantas de ambientes únicos y que poseen una biología y estrategias de sobrevivencia inusual ii) Plantas que tienen una historia etnobotánica que se relacionan a usos específicos iii) Plantas endémicas que tienen una longevidad inusual y iv) plantas que crecen en áreas de gran biodiversidad (Strobel y Daisy 2003).

En Chile, existe un germoplasma único de papas nativas en la isla de Chiloé, el cual es un sub centro de origen de la papa. La particular condición de aislamiento de la isla ha permitido la proliferación de una variedad de papa nativas mantenidas en campos de pequeños agricultores, caracterizadas por sus formas, tamaños, colores y características fenológicas (Solano *et al.* 2007). Actualmente, no hay información respecto a la microbiota endófito asociada a estas variedades nativas, por lo tanto,

representan una fuente única de microorganismos endófitos donde se puedan encontrar potenciales agentes para el control biológico de *Pectobacterium sp.* en plantas de papa comercial susceptibles a este patógeno, como *S. tuberosum* Pukará-INIA, considerando que se ha postulado que la transferencia de microorganismos desde plantas nativas a plantas no hospederas podría representar una biotecnología para mejorar el germoplasma vegetal (Barrow *et al.* 2008). Podolich *et al.* (2015) también plantean que la inoculación de una planta por bacterias benéficas, podría activar comunidades endófitas que se encuentren en estado de dormancia y que también podrían cumplir un rol en la protección de la planta a través de una interacción simbiótica.

En síntesis el desarrollo de estrategias de control de enfermedades producidas por bacterias en papas comerciales a partir de endófitos provenientes de variedades nativas requiere responder preguntas de investigación como por ejemplo; ¿Existen actinobacterias endófitas en papa nativa chilena?, ¿Poseen las Actinobacterias endófitas de papa nativa, actividad antagónica frente a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (patógeno modelo)? y ¿Tienen las actinobacterias endófitas de papa nativa, la capacidad de colonizar el rizoplano y la endoriza de plantas de papa pukará-INIA?.

## HIPOTESIS DE TRABAJO

- Hipótesis nula H0: *Solanum tuberosum* L. nativa chilena no contiene actinobacterias endófitas.
- Hipótesis alternativa H1: *Solanum tuberosum* L. nativa chilena contiene actinobacterias endófitas.
  
- Hipótesis nula H2: Actinobacterias endófitas de *Solanum tuberosum* L. nativa chilena no poseen actividad antagónica *in vitro* frente a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*.
- Hipótesis alternativa H3: Actinobacterias endófitas de *Solanum tuberosum* L. nativa chilena no poseen actividad antagónica *in vitro* frente a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*.
  
- Hipótesis nula H4: Actinobacterias endófitas de *Solanum tuberosum* L. nativa chilena no colonizan el rizoplano y la endoriza de *Solanum tuberosum* var. Pukará-INIA.
- Hipótesis alternativa H5: Actinobacterias endófitas de *Solanum tuberosum* L. nativa chilena colonizan el rizoplano y la endoriza de *Solanum tuberosum* var. Pukará-INIA.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la capacidad antagónica contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* y de colonización del sistema radicular de *Solanum tuberosum* cv. Pukará-INIA, de actinobacterias endófitas de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la presencia de actinobacterias endófitas en papas nativas (*S. tuberosum*) chilenas.
2. Evaluar antagonismo de actinobacterias endófitas de papa nativa (*S. tuberosum*) chilena frente a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*.
3. Determinar la capacidad de colonización de actinobacterias endófitas de papa (*S. tuberosum*) nativa chilena en el rizoplano y la endoriza de papa (*S. tuberosum*) Pukará-INIA.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Resumen general

Se estudió la comunidad dominante de actinobacterias endófitas en papa nativa chilena (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*) a través del estudio del polimorfismo del gen ribosomal 16 S en una electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida (DGGE). Se aislaron actinobacterias endófitas putativas de plantas de papa nativa chilena, a las cuales se evaluó su actividad antagónica frente a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum in vitro*. Se seleccionaron los aislamientos que mostraron una actividad antagónica positiva para su evaluación de interacción con el sistema radicular de papa (*S. tuberosum*) Pukará-INIA. Las raíces de papa (*S. tuberosum*) Pukará-INIA se inocularon con  $10^8$  esporas/mL de actinobacterias seleccionadas, luego las plantas se mantuvieron en sustrato estéril en condiciones climáticas controladas. Se colectaron muestras de raíces de plantas inoculadas, a partir de las cuales se realizaron cortes histológicos que fueron marcados con sondas específicas para actinobacteria a través de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y luego se visualizaron a través de microscopía de laser confocal, para determinar si estas bacterias fueron capaces de colonizar el rizoplasma o la endosfera de la planta y así determinar si son verdaderos endófitos.

### 2.2. Material Vegetal

Tubérculos de papa nativa chilena (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*) fueron facilitados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias Centro Regional Remehue de Osorno, las cuales se sembraron en macetas con suelo trumao estéril en invernadero durante 5 meses para la colecta de tejidos vegetales y su posterior procesamiento para análisis molecular y para aislamiento de actinobacterias endófitas.

### **2.3. Extracción de ADN de raíces y tubérculos.**

Raíces y tubérculos fueron procesados para estudiar la comunidad endófito y rizosférica de papa nativa. Para estudiar la comunidad endófito se realizó una remoción de la microbiota asociada a la superficie de los tejidos, para esto los tejidos fueron sonicados a 2000 Hz por 5 min (intervalos de 30 s de sonication y 30 s de descanso) (Lundberg *et al.* 2012) y posteriormente fueron inmersos secuencialmente en etanol 70%, hipoclorito de sodio (NaClO) al 3%, seguido de 3 lavados en PBS con tween 20 al 0,01%, secados en papel absorbente estéril (Coombs y Franco, 2003, Kaewkla y Franco 2013).

Para estudiar la comunidad rizosférica, los tejidos fueron lavados en agua y secados en papel absorbente estéril. Las muestras estudiadas fueron: i) raíces de papa nativa desinfectadas superficialmente ii) raíces de papa nativa sin desinfectar superficialmente iii) tubérculo de papa nativa desinfectado superficialmente iv) tubérculo de papa nativa sin desinfectar superficialmente v) raíces de papa Pukará-INIA desinfectadas superficialmente vi) raíces de papa Pukará-INIA sin desinfectar superficialmente. Los tejidos vegetales fueron sumergidos en nitrógeno líquido (-196°C) y molidos en mortero (Nimnoi *et al.* 2010), posteriormente se realizó la extracción de ADN con el kit ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™ de acuerdo a las instrucciones de manufacturación.

### **2.4. PCR-DGGE.**

Se amplificó el gen ribosomal 16S de actinobacterias con el partidor forward F243 (Heuer *et al.* 1997, Das *et al.* 2007, Tan *et al.* 2009) que es específico para este grupo junto con el partidor reverse R1378 (Das *et al.* 2007) (Tabla 1). Este producto de PCR se utilizó como templado para realizar una PCR anidada con el partidor F341 unido a la cola de GC (Heuer *et al.* 1997, Muyzer *et al.* 1998, Xiao *et al.* 2011) y el

partidor reverse R534, esta amplificación corresponde a la región V3 del gen ribosomal 16S (Muyzer *et al.* 1993, Nimnoi *et al.* 2010, Xiao *et al.* 2011) (Tabla 1). Cada reacción de PCR se realizó para un volumen final de 25 uL, conteniendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5 mM de cada partidor, 1X de tampón, 0,025 U/μL de taq DNA polimerasa y 1,5 μL de templado de ADN. Las condiciones para el programa de amplificación del par de partidores F243-R1378 fue una denaturación inicial a 95°C durante 5 min, 35 ciclos consistentes en 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 2 min a 72°C y finalmente una extensión a 72°C durante 10 min (Nimnoi *et al.* 2010). La PCR anidada, correspondiente al par de partidores F341GC-R534, se programó con una etapa inicial de denaturación a 95°C durante 2 min, 28 ciclos consistentes en 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C, con una etapa de extensión final a 72°C durante 3 min. La integridad del producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa 1,2% (p/v) con bromuro de etidio 0,008% (v/v) bajo luz UV. Los productos de PCR anidado fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 7,5% con un gradiente de denaturación de 40 – 65% de urea – formamida. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 60 V a 60°C durante 16 h. La visualización de las bandas en el gel de poliacrilamada se realizó con una tinción de nitrato de plata (Muyzer *et al.* 1998).

## **2.5. Secuenciación de bandas en DGGE.**

Para la secuenciación de las bandas en el gel, se realizó una tinción con bromuro de etidio (0,01% v/v) del gel de poliacrilamida, desde donde se recuperaron las bandas más fuertes y se amplificaron nuevamente con los partidores F341 y R534, cuyo producto de PCR se purificó y secuenció a través del servicio de MacroGen.

**Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación selectiva de la región V3 del gen ribosomal 16S de Actinobacterias.**

Partidor <sup>a</sup>	Blanco de gen		Referencia
	16Sr DNA (posición <sup>b</sup> )	Secuencia nucleotídica	
F243	Actinobacteria (226 – 243)	5'-GGATGAGCCCGCGGCCTA-3'	Heuer <i>et al.</i> 1997
R1378	Bacteria (1378 – 1401)	5'-CGGTGTGTACAAGCCCCGGGAACG-3'	Heuer <i>et al.</i> 1997
F341GC	Bacteria (341 – 357)	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGG CGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGC AGCAG-3'	Muyzer <i>et al.</i> 1993
R534	Bacteria (518 – 534)	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	Muyzer <i>et al.</i> 1993

<sup>a</sup> F, partidor *forward*; R; partidor *reverse*; GC, secuencia de G+C unido a terminal 5'.

<sup>b</sup> Numeración en *E. coli*. Fuente: Elaboración propia.

## 2.6. Análisis de imágenes del DGGE.

Las imágenes obtenidas de los perfiles de ADNr 16S en el gel de poliacrilamida fueron analizados con el software Bionumerics versión 7.5. Se utilizó el coeficiente de similitud DICE (Núñez-Colín y Escobedo-López 2011) para la generación de la matriz de similitud, basado en la presencia y ausencia de bandas con una optimización de un 0,5% y una tolerancia de un 0,5%. Luego se realizó el dendograma con el algoritmo UPGMA que consideró analizar las desviaciones típicas asociadas a cada agrupamiento y la correlación cofenética, que es un parámetro que expresa la consistencia de un cluster (Abreu-Tarazi *et al.* 2010). De acuerdo a Muyzer *et al.* (1993) y Van Hannen (1999) una banda en un gel de desnaturalización representa una “secuencia tipo” o “filotipo”, según Das *et al.* (2007) una banda representa un “ribotipo”, en este trabajo se generalizará una banda como una unidad taxonómica operativa (OTU, por su sigla en inglés) (Núñez –Colín y Escobedo – López 2011). La

riqueza de la comunidad de actinobacterias se evaluará de acuerdo al índice de riqueza ponderado ( $Rr$ ) según la fórmula (1):

$$(1) Rr = (N^2 * Dg)$$

Donde  $N$  representa el número total de bandas u OTUs en un patrón y  $Dg$  comprende el gradiente de denaturación entre la primera y la última banda del patrón observado (Marzorati *et al.* 2008). Se utilizó T-test (comparaciones pareadas) para determinar los cambios de la riqueza de actinobacterias en los diferentes tejidos estudiados.

## 2.7. Aislamiento de actinobacterias endófitas de papa nativa

A partir de 25 ecotipos de papas nativas (*S. tuberosum*) chilenas, facilitadas por INIA Remehue, Osorno, Chile, se realizó la colecta de material vegetal a partir de plantas que no presentaron síntomas visibles de enfermedad. El tejido vegetal colectado se lavó con una solución jabonosa, posteriormente 2 – 3 g de cada tejido fue sonicado en una solución de PBS con tween 20 al 0,01% a una frecuencia de 2000 Hz durante 10 s (Coombs y Franco 2003, Kaewkla y Franco 2013). Luego los tejidos fueron secuencialmente inmersos en etanol 70% durante 1 min, hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% durante 4 min, seguido de 3 lavados en agua estéril y finalmente secados en papel absorbente estéril. Cortes de 4 mm<sup>2</sup> aprox. se sembraron en medios selectivos de ácidos húmicos (HV) para actinobacterias (Hayakawa y Nonomura 1987) suplementado con nistatina (0,05 g/mL) y ciclohexamida (0,05 g/mL) e incubado a 30°C (Nimnoi *et al.* 2010, Shimizu 2011, Kaewkla y Franco 2013). Se validó la desinfección superficial de los tejidos a través de la impresión en agar HV de los tejidos, los cuales fueron incubados a 28°C durante al menos 30 días donde se seleccionaron los aislamientos cuyo control de desinfección no presentara crecimiento de microorganismos (Nimnoi *et al.* 2010, Shimizu 2011, Kaewkla y Franco 2013).

## 2.8. Caracterización de actinobacterias

La caracterización morfológica macroscópica se realizó según las directrices de Shirling y Gottlieb (1966) en 3 medios de cultivo diferentes; ISP2 (agar extracto de malta – extracto de levadura), ISP3 (agar avena) e ISP4 (agar almidón – sales inorgánicas), donde se categorizó el crecimiento de acuerdo al área de crecimiento en la placa petri, respecto al área total y se expresó como porcentaje con las siguientes categorías: excelente (EX, 76 – 100%) , muy bueno (MB, 51 – 75%), bueno (B, 26 – 50%), pobre (P, 1 – 25%) y negativo (N, 0%), donde las mediciones se realizaron con el programa ImageJ (Schindelin *et al.* 2015). Los aislamientos se incubaron a 28°C y se observaron a los 21 días. Se registró la producción de pigmentos solubles, el color del micelio aéreo y el color del micelio de sustrato (Goodfellow *et al.* 2012). Las observaciones microscópicas se realizaron a partir de cultivos obtenidos a través de la técnica *slide culture*, donde se utilizó ISP2 como medio de crecimiento y se incubaron por 14 días. El cubre objeto con crecimiento, fue removido y ubicado sobre otro portaobjeto para ser fijado con metanol absoluto por 15 min y teñido con cristal violeta por 1 min. Luego de enjuagar y secar, el cubre objeto fue examinado en microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100X). Se observó la morfología de filamentos y esporas (Grebeyohannes *et al.* 2013). Se midió diámetro de filamentos y esporas.

## 2.9. Determinación taxonómica a través de marcador 16 S ribosomal.

Los aislamientos se cultivaron en ISP1 durante 120 h a 28°C inoculado con  $2,5 \times 10^8$  esporas/mL y luego se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C, y a partir del pellet formado se extrajo el ADN con el kit ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™ de acuerdo a las instrucciones de manufacturación. En el caso del aislamiento que no formó esporas, se realizó la extracción de ADN a partir de un tapiz en medio ISP2. Se amplificó por

PCR el gen 16 S ribosomal con partidores universales para bacterias; 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAACC-3') (Weisburg *et al.* 1991). El producto de PCR se visualizó a través de una electroforesis en gel de agarosa 1,2% (p/v) con bromuro de etidio (10 mg/mL) en un transiluminador con luz UV (Kumar *et al.* 2010). Los servicios de secuenciación fueron solicitados a Macrogen (<http://www.macrogen.com/>). Las secuencias de ADNr 16S fueron analizadas utilizando la herramienta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se seleccionaron las secuencias arrojadas en Blast con una identidad del 100%.

## 2.10. Análisis filogenético

Las secuencias parciales del gen ribosomal 16S de los aislamientos de actinobacterias fueron contrastadas con la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a través de la herramienta Blastn. Se infirió la historia evolutiva usando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura y Nei (1993). Se validó estadísticamente el árbol a través de un bootstrap con 1000 iteraciones (Felsenstein 1985). El porcentaje de arboles que se agruparon con las respectivas asociaciones de los taxos se muestra junto a los cladogramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo aplicando el método de Neighbor Joining (Saitou y Nei 1987) a una matriz de distancia estimada generada usando el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (Tamura *et al.* 2004). El largo de las ramas del árbol representa el número de sustituciones por sitio. El análisis se realizó con el programa MEGA6 (Tamura *et al.* 2013). Las secuencias problema y las secuencias modelo fueron analizadas con el software MEGA6, donde se realizó un alineamiento múltiple y posteriormente se construyó un árbol filogenético con el algoritmo de máxima verosimilitud, cuyo sustento estadístico se determinó con un bootstrap de 1000 iteraciones.

## 2.11. Ultraestructura de actinobacterias a través de microscopía de barrido

Se seleccionaron aislamientos representantes de diferentes géneros taxonómicos para observar su morfología celular a través de microscopía de barrido (Li *et al.* 2016), tanto en condición de cultivo sólido en ISP2 luego de 14 días de incubación a 28°C y cultivo líquido en ISP1 luego de 120 h de incubación en agitación a 120 rpm a 28°C.

## 2.12. Actividad antibacteriana

*Pectobacterium carotovorum* spp. *carotovorum* fue facilitado por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria CRI Remehue, Osorno, Chile. Se cultivó en caldo nutritivo y se mantuvo en glicerol 20% a -20°C (Perombelon y van der Wolf 2002). La actividad antagónica de los aislamientos de actinobacterias frente a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* se evaluó a través de 4 métodos; difusión en agar (Kafur y Khan 2011, Sugathan *et al.* 2012, Kaur *et al.* 2013), siembra en estrías cruzadas (*Cross – streak*) (Oskay *et al.* 2004, Oskay 2009, Sugathan *et al.* 2012) y difusión en discos de papel (Mingma *et al.* 2014).

### 2.12.1. Difusión en agar.

*Pectobacterium* spp. se cultivó en caldo nutritivo durante 18 h a 27°C y se ajustó a una concentración de  $10^8$  cel/mL. (Perombelon y Van der Wolf 2002). Posteriormente se sembró homogéneamente sobre agar nutritivo y luego dispusieron discos de agar (6 mm) con crecimiento de los aislamientos de actinobacteria en fase de esporulación (Kafur y Khan 2011, Kaur *et al.* 2013). Se incluyó discos de agar de medio ISP2 estéril como blanco y discos de ampicilina de 10 ug como control

positivo. Este ensayo se realizó por triplicado. Luego se incubó a 28°C durante 24 h. La formación de halos de inhibición indicó bioactividad y se midió el diámetro (Kafur y Khan 2011, Sugathan *et al.* 2012, Kaur *et al.*, 2013). Los resultados fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon por el test de Tukey, donde un valor de  $P \leq 0,05$  fue considerado significativamente diferente (Sugathan *et al.* 2012).

#### 2.12.2. *Difusión en pocillos.*

*Pectobacterium* spp. se cultivó en caldo nutritivo durante 18 h a 27°C y se ajustó a una concentración de  $10^8$  cel/mL. (Perombelon y Van der Wolf 2002). Posteriormente se sembró homogéneamente sobre agar nutritivo y luego hicieron tres pocillos en el agar con un sacabocado de 6 mm de diámetro. A un pocillo se le agregó 120 uL del sobrenadante de un cultivo de actinobacterias de 120 h (Kaur *et al.* 2013, Mingma *et al.* 2014), a un segundo pocillo se le agregó caldo del medio ISP1 estéril como control negativo, y al tercer pocillo se le agregó ampicilina (10 µg/µL). Este ensayo se realizó por triplicado. Luego se incubó a 28°C durante 24 h. La formación de halos de inhibición indicó bioactividad y se midió restando el diámetro del pocillo (Kafur y Khan 2011, Sugathan *et al.* 2012, Kaur *et al.*, 2013). Los resultados fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon por el test de Tukey, donde un valor de  $P \leq 0,05$  fue considerado significativamente diferente (Sugathan *et al.* 2012).

#### 2.12.3. *Siembra en estrías cruzada (cross strake).*

Se sembró el aislamiento de la actinobacteria sobre agar nutritivo en línea recta en el diámetro de la placa petri, se incubó a 28°C hasta que se observara esporulación (7-

14 días). Luego se sembró *Pectobacterium* spp. en estrías en línea recta en una orientación perpendicular del sembrado del aislamiento de actinobacteria. Estas placas se incubaron a 28°C durante 48 h. El antagonismo se midió por la determinación de la zona de inhibición (Oskay *et al.* 2004, Oskay 2009, Sugathan *et al.* 2012). Cada ensayo se realizó por triplicado para cada actinobacteria. Los resultados fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon por el test de Tukey, donde un valor de  $P \leq 0,05$  se consideró significativamente diferente (Sugathan *et al.* 2012).

#### 2.12.4. Difusión en discos de papel.

Se tomó 10 uL del sobrenadante del cultivo actinobacterias en ISP1 de 120 h (Mingma *et al.* 2014, Kaur *et al.* 2013) y se agregó a discos de papel filtro que fueron ubicados en la superficie de una placa de agar nutriente sembrada homogéneamente con *Pectobacterium* sp. desde un cultivo con una concentración de  $10^8$  cel/mL. Luego se incubó a 28°C durante 24 h para posteriormente medir la zona de inhibición en torno al disco. Un disco con 10 ug de ampicilina se usó como control positivo y caldo del medio ISP1 estéril como control negativo (Mingma *et al.* 2014). Los resultados fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon por el test de Tukey, donde un valor de  $P \leq 0.05$  se considero significativamente diferente (Sugathan *et al.* 2012).

#### 2.13. Co-cultivo de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Streptomyces* sp. TP199

Se inoculó *Streptomyces* sp. TP199 en caldo soya tripticasa (TSB) una concentración final de  $10^6$  esporas/mL que se incubó a 28°C durante 48 h a 120 rpm, luego se agrego Pcc desde un cultivo en fase exponencial a una concentración final

de  $10^6$  células/mL para evitar la inhibición del crecimiento de *Streptomyces* sp. TP199 por un rápido consumo de los nutrientes por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovrum* (Baz *et al.* 2012b, Wu *et al.* 2015). Como control se realizó la curva de crecimiento de Pcc en las mismas condiciones, y se realizó recuento de unidades formadoras de colonia cada 3 h en medio TSA por triplicado (Baz *et al.* 2012b).

Se utilizó el modelo de Gompertz (ecuación 1) de acuerdo a lo propuesto por Zwietering *et al.* (1990) para describir la cinética de crecimiento relativo de Pcc en presencia y ausencia de *Streptomyces* sp. TP199. Se determinó la duración de la fase lag ( $\lambda$ ), la velocidad de crecimiento específica ( $\mu_m$ ) y el recuento máximo de la fase exponencial ( $A$ ), ajustando los datos al modelo mediante ajuste no lineal, utilizando el paquete estadístico SYSTAT.

Ecuación 1

$$\ln(N/N_0) = A \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{\mu_m \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

En donde:

$N$  = Recuento microbiano (ufc/mL)

$N_0$  = Recuento microbiano en tiempo cero (ufc/mL)

$N/N_0$  = Crecimiento relativo; Recuento  $N$  a tiempo  $t$ , dividido por recuento inicial ( $N_0$ )

$\ln(N/N_0)$  = Log natural base  $e$  ( $\ln$ ) del crecimiento relativo microbiano

$\lambda$  = Duración de fase Lag (h)

$\mu_m$  = Velocidad específica máxima de crecimiento (1/h)

$A$  = Recuento máximo en fase estacionaria (unidades de  $\ln(N/N_0)$ )

Utilizando la prueba  $t$  de Student ( $\alpha \leq 0.05$ ) se determinó el efecto de la presencia de *Streptomyces* sp. TP199 en la velocidad específica máxima y el recuento máximo en fase exponencial ( $A$ ) de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Sokal *et al.* 1990).

## 2.14. Ensayo de biocontrol de pudrición blanda en el tubérculo de papa

Tubérculos de papa sin síntomas de enfermedad fueron lavados con una solución jabonosa, secados y flameados en su superficie, posteriormente sonicados en PBS con tween 20 al 0,01% a una frecuencia de 2000 Hz durante 10 s (Coombs y Franco 2003, Kaewkla y Franco 2013) y desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5% conteniendo una gota de detergente durante 10 min. Se enjuagaron en agua destilada estéril, se retiró el exceso de agua en papel absorbente estéril y se mantuvieron dentro de una cámara de flujo laminar hasta que se secaron completamente. Luego se cortaron rodajas con un grosor de 7 – 8 mm aproximadamente con un cuchillo estéril (Perombelon y Van der Wolf 2002), donde se realizaron tres pocillos (5x5 mm) en cada rodaja (Krzyzanowska *et al.* 2012, Zamani *et al.* 2013). Estas rodajas se depositarán en placas Petri estéril que contenían un papel filtro humedecido con agua destilada estéril (Perombelon y Van der Wolf 2002).

Una suspensión patogénica de *Pectobacterium sp.* será preparada ( $10^8$  ufc/mL) mezclada con una suspensión de inóculo inicial de actinobacterias en una relación 1:1 se utilizó como inóculo. Las suspensiones control fueron preparadas similarmente, pero sólo con el patógeno o sólo el antagonista mezclando las cepas con PBS estéril en una relación 1:1. Un volumen de 30 uL de cada inóculo fue agregado a cada pocillo. Posteriormente se incubó a 28°C durante 48 h y el diámetro del tejido macerado entorno a los pocillos se midió. Se utilizará una escala de categorías de maceración; 1= sin maceración, 2= maceración moderada (no más de 5 mm entorno al sitio de infección), 3= maceración severa (más de 5 mm). Cada ensayo se realizó por triplicado (Jafra *et al.* 2006, Krzyzanowska *et al.* 2012, Zamani *et al.* 2013). Se utilizará el test de Kruskal – Wallis ( $\alpha = 0.05$ ) que permitirá el análisis estadístico de las categorías de maceración (Cirou *et al.* 2012).

## **2.15. Inoculación de actinobacterias en sistema radicular de plantas de papa**

### *2.15.1. Inóculo de actinobacterias.*

El inóculo se preparó a partir de la recuperación de esporas de cultivos en placa, agregando alrededor de 2-3 mL de solución de PBS con tween 20 al 0,01% sobre el cultivo que luego cuidadosamente se removió con un asa bacteriológica para aflojar las esporas y finalmente traspasar la suspensión a un nuevo tubo estéril. La solución de esporas se filtró en jeringas con algodón estéril para la obtención de la suspensión final. Para determinar la concentración de esporas se realizó recuento con cámara de Neubauer y a partir de una dilución seriada (Shirling y Gottlieb 1966, Misk y Franco 2011).

Plantas de papa Pukará-INIA fueron facilitados por el Centro Regional de Investigación INIA Remehue, Osorno, Chile. Las cuales se aclimataron en condiciones controladas con un fotoperiodo de 16 h a una temperatura de 20 – 25°C hasta que alcanzaron un estadio de enraizamiento (Volkova *et al.* 2014). El sistema radicular de las plantas fue sumergido en una suspensión de actinobacterias de 120 h de cultivo de un inóculo original de  $10^8$  esporas/mL durante 3 min antes de que las plantas fueran ubicadas en macetas con arena estéril, humedecidas con una solución nutritiva (SAH). Estas plantas se mantuvieron en condiciones controladas con un fotoperiodo de 16 h a 20 – 25°C.

## 2.16. Hibridación fluorescente *in situ* con sonda doblemente marcada (DOPE-FISH)

### 2.16.1. Selección de oligonucleótido (sonda) específico para actinobacterias.

Para visualizar actinobacterias inoculadas en plantas de papa *in vitro* se realizó hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Compant *et al.* 2013). La sonda que se utilizó fue HGC69a (5' – TATAGTTACCACCGCCGT – 3') (Lundberg *et al.* 2012) para el 16S rRNA cuya especificidad se verificó *in silico* en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), en la base de datos de Probe Check (<http://microbial-ecology.net/>) (Cardinale 2014) y en la base de datos de Ribosomal Database Release 9 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (Cole *et al.* 2005). La sonda fue marcada con el fluorocromo Cy5 en los extremos 5' y 3' de la secuencia nucleotídica.

### 2.16.2. Fijación de muestras.

Se colectaron raíces (aprox 0,5 - 1 cm) que fueron dispuestas en tubos eppendorf en solución de paraformaldehído 4% en PBS estéril (PF4%) a pH 7.2 durante 24 h a 4°C. Luego se lavaron en PBS para posterior tratamiento o almacenamiento. Su almacenamiento se realizó en PBS/EtOH 95,5% (1:1) a -20°C hasta procesamiento.

### 2.16.3. *Cortes histológicos.*

Las raíces colectadas fueron embebidas en gel gelificante en un molde que permitió que la muestra quedara en el centro de la matriz. Para su congelamiento se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su procesamiento. En los casos en que se mantuvo por más de 24 h antes de su procesamiento, se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En el criostato HM525 (Centro de microscopia avanzada, UdeC, Concepción) fueron procesadas para la obtención de cortes transversales de  $30\ \mu\text{m}$  de grosor. Los cortes histológicos fueron dispuestos en cubreobjetos previamente tratados con polilisina ( $1\ \text{mg/mL}$ ).

### 2.16.4. *Preparación de cubreobjetos.*

Los portaobjetos fueron desinfectados superficialmente con etanol  $95,5^{\circ}\text{C}$ . Se mantuvieron en EtOH durante 24 h. se secaron bajo campana. Luego, se agregó polilisina ( $1\ \text{mg/mL}$ ) bajo cámara de flujo laminar, cuidando de que la superficie del portaobjeto quedara completamente cubierta con la solución.

### 2.16.5. *Tipo de muestras.*

Se procesaron muestras de raíces no cortadas (para observar colonización en superficie del tejido) y cortes histológicos dispuestos en cubreobjetos. Para facilitar la manipulación de portaobjetos con cortes histológicos, se marcó la zona del portaobjeto (con cortes) con un lápiz hidrofóbico. Las muestras de raíces directas se procesaron en tubos de  $0,5\ \text{mL}$ .

#### 2.16.6. *Pre-tratamiento de muestras de raíces.*

Se lavaron las muestras una vez con PBS, luego se incubaron con lisozima (1 mg/mL) a 37°C durante 15 min (Compant *et al.* 2013). Luego se deshidrataron en serie con EtOH (50 – 99,9%; 30 min para cada etapa).

#### 2.16.7. Hibridación.

Se agregó la solución de hibridación (Tris-HCl 0,02 mM, SDS 0,01%, NaCl 0,9 M, 25% formamida) (Roller *et al.* 1994) sobre cortes histológicos en portaobjetos y en tubos eppendorf para raíces completas. Luego se agregó la sonda para que quede a una concentración final de 15 ng/μL (Compant *et al.* 2013). En oscuridad se incubó a baño maría durante 3 h a 48-50°C.

#### 2.16.8. *Post-hibridación.*

Los portaobjetos fueron escurridos con un poco de solución de lavado (Tris-HCl 0,02 mM, SDS 0,01%, NaCl 5M) precalentada a 51°C. Los portaobjetos fueron transferidos rápidamente a la solución de lavado, mientras que las raíces en tubos eppendorf se lavaron y fueron inmersas en solución de lavado en el mismo tubo eppendorf. Se incubó a baño maría durante 20 min a 52°C (Roller *et al.* 1994), se hizo una última inmersión en agua estéril precalentada a 52°C (Compant *et al.* 2013). Finalmente las muestras se secaron en cámara de flujo laminar. Luego se agregó la solución de inmersión para mantener fluorescencia (Prolong, SIGMA) y se colocó el cubreobjeto. Se mantuvieron en oscuridad hasta su visualización en microscopio confocal.

### 2.16.9. *Obtención de imágenes de microscopio de laser confocal.*

Se usó el microscopio de laser confocal espectral y dos fotones LSM780 NLO Zeiss (Centro de Microscopía Avanzada, CMA BIO-BIO, Proyecto CONICYT PIA ECM-12) vinculado al software ZEN blue para la captura de imágenes. Se usó diferentes laser para diferentes rangos de excitación y emisión de las muestras, correspondientes a los espectros de excitación/emisión: 488/490–560 nm, 405/410–480 nm (luz UV) y 633/638–747 nm (luz rojo lejano). Se utilizó el programa Image J (Schindelin *et al.* 2015) para el procesamiento de las imágenes.



### 3. RESULTADOS

Objetivo específico 1. Determinar la presencia de actinobacterias endófitas en papas nativas (*S. tuberosum*) chilenas.

#### 3.1. Amplificación selectiva del gen ribosomal 16S para actinobacterias y separación electroforética en gel de gradiente denaturante (DGGE) de sus polimorfismos.

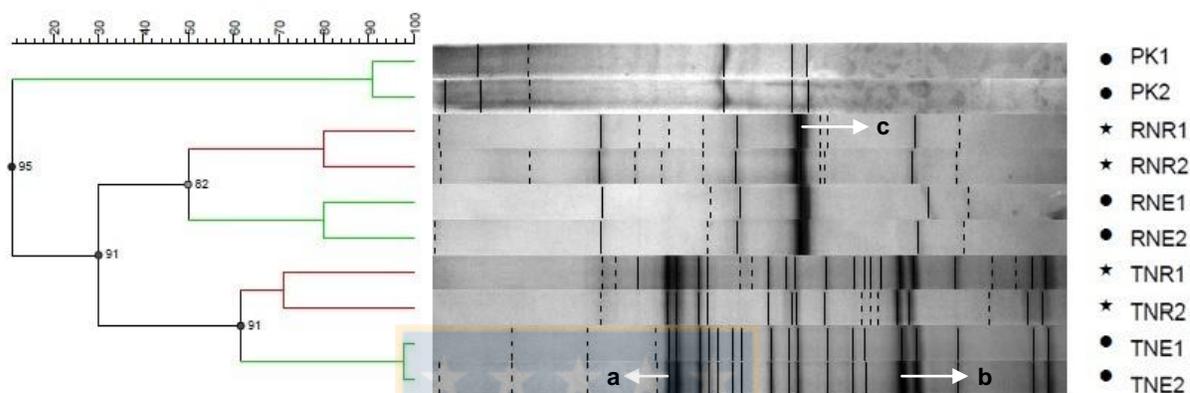
El análisis del gen 16 S ribosomal específico para el *phylum* Actinobacteria a través de PCR-DGGE (figura 3) reveló la presencia de polimorfismos de esta comunidad asociada a raíces y tubérculos de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* chilota nativa y de *S. tuberosum* Pukará-INIA, tanto en la endósfera como en la rizósfera.

En *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa, al comparar las comunidades presentes en tubérculos y raíces se observó un 30,1% de similitud entre ambos tejidos, mientras que a nivel de compartimentos, entre las comunidades presentes en la endósfera y rizósfera de raíces se observó un 49% de similitud, y en el caso del tubérculo, para las comunidades presentes en los mismos compartimentos, se observó una agrupación con un 61,6% de similitud.

Luego, al analizar la similitud entre los patrones de bandas correspondientes a las comunidades de los diferentes tejidos vegetales, se observó que las comunidades presentes en las variedades nativa y Pukará-INIA poseen un 10,8% de similitud.

El análisis de la riqueza ponderada (*Rr*) propuesto por Marzorati *et al.* (2008) para la comunidad de actinobacterias presentes en *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* chilota y *S. tuberosum* Pukará-INIA mostró diferencias significativas (T-test  $P < 0,05$ ) a nivel de tejidos y compartimentos entre las variedades (figura 3).

La riqueza ponderada correspondiente a la comunidad presente en la zona rizosférica del tubérculo de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* chilota ( $62,44 \pm 29,2$ ) no se diferenció significativamente (T-test  $P > 0,05$ ) de los demás compartimentos estudiados.



**Figura 3.** Análisis de agrupamiento basado en la posición de bandas en el DGGE de la comunidad de actinobacterias endófitas (círculos en imagen) y rizosféricas (estrellas en imagen) presentes en tubérculos y raíces de papa nativa chilena y papa Pukará-INIA. En la imagen del gel, bandas punteadas corresponden a presencia incierta, mientras que bandas continuas corresponden a presencia segura. En el dendrograma se muestra la escala de similitud de acuerdo al índice DICE, cuyo agrupamiento se realizó según el método UPGMA, el valor de los nodos indica el índice de correlación cofenética asociado a cada agrupamiento. En verde se agrupan comunidades endófitas y en rojo, rizosféricas PK: Endósfera de raíces de *S. tuberosum* Pukará-INIA. RNE: Endosfera de raíces de *S. tuberosum* nativa chilena. RNR: Rizósfera de raíces de *S. tuberosum* nativa chilena. TNE: Endósfera de tubérculo de *S. tuberosum* nativa chilena. TNR: Rizósfera de tubérculo de *S. tuberosum* nativa chilena. 1,2: réplicas de cada muestra. a, b y c se secuenciaron y se relacionaron a los géneros *Streptomyces* sp., *Arthrobacter* sp. y *Micromonospora* sp., respectivamente. Fuente: Elaboración propia.

Sólo las comunidades presentes en la endósfera radicular de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* chilota ( $8,39 \pm 3,6$ ) y Pukará-INIA ( $3,49 \pm 1,05$ ), tuvieron valores de riqueza ponderada menores a 10 (tabla 2), las cuales no se diferenciaron significativamente entre ellas (T-test  $P > 0,05$ ), sin embargo, fueron significativamente menores (T-test  $P < 0,05$ ) al resto de las comunidades evaluadas.

La comunidad endófito del tubérculo de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* chilota tuvo el valor de riqueza ponderada más alto (T-test  $P < 0,05$ ) con un índice de  $85,95 \pm 13,1$  y el que le siguió en orden decreciente fue la comunidad rizosférica de la raíz de la misma variedad con un valor de  $26,12 \pm 2,9$  (T-test  $P < 0,05$ ).

La riqueza de la comunidad rizosférica del tubérculo no se diferenció significativamente a ningún nivel, es decir, ni a nivel de variedad, ni de tejido, ni de compartimento (tabla 2).

**Tabla 2. Riqueza ponderada (Rr) obtenida a partir de los polimorfismos del gen 16S ribosomal e el PCR-DGGE en diferentes compartimentos de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena y *Solanum tuberosum* Pukará-INIA.**

Variedad de Planta	Tejido vegetal	Compartimento	Muestra	Rango número de bandas	Rr*
<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i>	Raíces	Endosfera	RNE	7 – 8	$8,39 \pm 3,6^a$
		Rizósfera	RNR	12 – 13	$26,12 \pm 2,9^b$
Nativa chilena	Tubérculo	Endósfera	TNE	21 – 22	$85,95 \pm 13,1^c$
		Rizósfera	TNR	17 – 24	$62,44 \pm 29,2^{abc}$
<i>Solanum tuberosum</i> Pukará-INIA	Raíces	Endosfera	PK	5 – 6	$3,49 \pm 1,05^a$

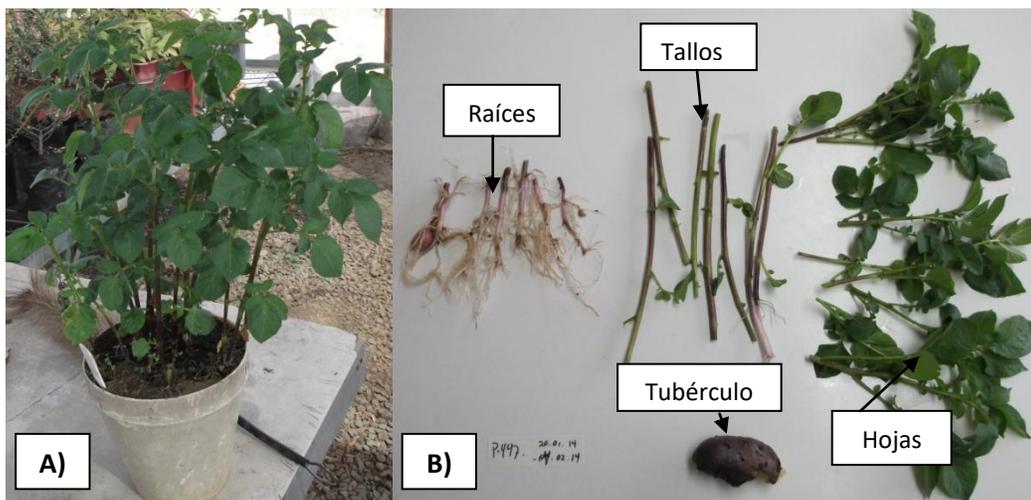
\* El valor Rr es reportado como un promedio  $\pm$  desviación estándar de las muestras analizadas.

<sup>a,b,c</sup> Significancia estadística de acuerdo T-test ( $P < 0,05$ ). Fuente: Elaboración propia.

Del polimorfismo de bandas observado en el DGGE, tres bandas con diferente movilidad electroforética fueron secuenciadas y analizadas con la herramienta BLAST, que arrojó como resultado que la identidad de estas secuencias se relaciona a los géneros *Streptomyces* sp., *Micromonospora* sp. y *Arthrobacter* sp. con un 97% de identidad. Los géneros *Streptomyces* sp. y *Arthrobacter* sp. se observan como grupos dominantes en el tubérculo de papas nativas, presentes en la rizósfera y endósfera de este tejido. En el caso de *Micromonospora* sp. está presente como grupo dominante en la endósfera y rizósfera de raíces de papas nativas.

### 3.2. Aislamiento de actinobacterias endófitas putativas de plantas de papa (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*) nativa chilena.

Se realizó la siembra de tubérculos de papa nativa (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*) en condición de invernadero. 25 tubérculos fueron sembrados y mantenidos durante 5 meses aproximadamente para la colecta de las muestras vegetales. En la figura 4 se muestra un ecotipo que representa el crecimiento de todas las plantas cultivadas en invernadero donde se hizo la colección de tejidos vegetales.

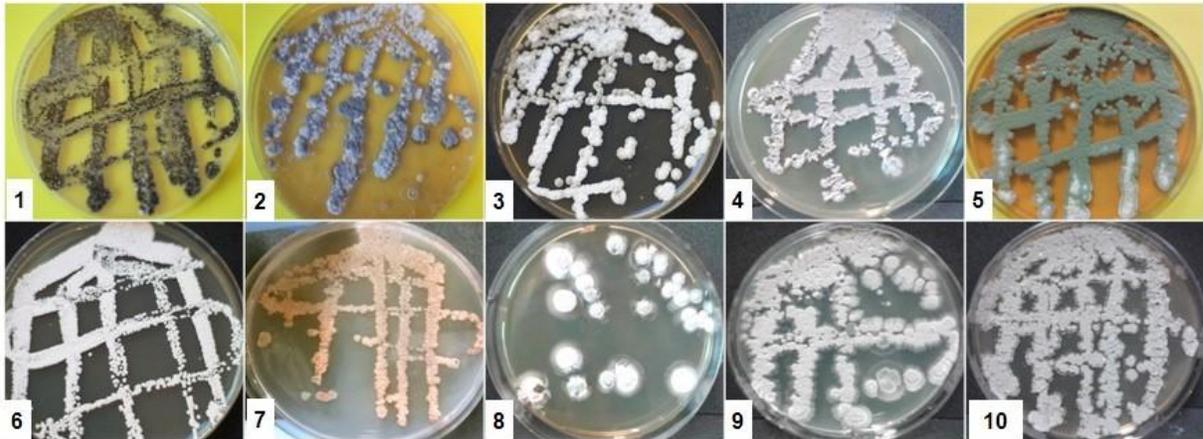


**Figura 4.** Ecotipo de papa nativa. A) Planta al momento de ser muestreada. B) Tejido colectado: raíces, tallos, hojas y tubérculo. Fuente: Elaboración propia.

Se obtuvo 10 aislamientos de actinobacterias endófitas putativas desde tallos, raíces, hojas y tubérculos de papa nativa (tabla 3), las cuales fueron seleccionadas de acuerdo a la morfología de su crecimiento, es decir, específicamente colonias con crecimiento radial característico de *Streptomyces* sp. cuya textura fue seca, polvorosa y adherida al agar (Goodfellow *et al.* 2012), y que no crecieron antes de 7 días de incubación (incubación a 28°C), aunque se mantuvieron por al menos 1 mes en incubación para permitir el desarrollo de cepas de crecimiento lento. Se obtuvo 2 aislamientos desde tallo, 3 aislamientos desde tubérculo, 2 aislamientos desde raíz y 2 aislamientos desde hojas.

Además se consideró que en el tratamiento de desinfección superficial de los tejidos vegetales, no se observó crecimiento en el agua de lavado durante 7 días de incubación, ni en las impresiones en agar de los tejidos vegetales desinfectados superficialmente.

Los aislamientos seleccionados presentaron un buen crecimiento en ISP2 (Shirling y Gottlieb 1966), lo cual permitió observar su fenotipo, donde se visualizó el crecimiento del micelio vegetativo y el micelio aéreo en los casos en que hubo esporulación (figura 5).



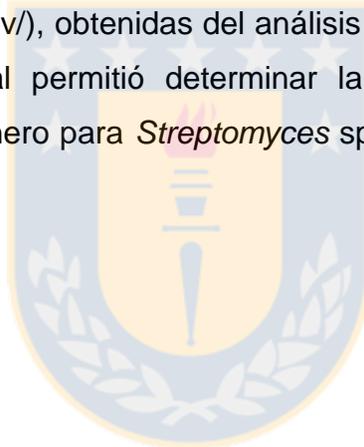
**Figura 5.** Características macroscópicas del cultivo de aislamientos de actinobacterias endófitas putativas en ISP2 luego de 14 días de incubación a 28°C. 1, MP136. 2, DP143. 3, HP171. 4, G1TP199. 5, A2R31. 6, CR34. 7, H2TP199. 8, KR31. 9, NP199. 10, TP199. Fuente: Elaboración propia.

El medio de cultivo sólido en el cual se observó el desarrollo de micelio de sustrato y la diferenciación del micelio aéreo (esporas) seleccionado fue el ISP2 (agar extracto de malta – extracto de levadura). Todos los aislamientos formaron esporas, excepto el aislamiento CR34, el cual se relacionó a *Nocardia* sp. (figura 5). En la tabla 3 se resumen características macro y microscópicas estudiadas de los aislamientos obtenidos, donde se registró el crecimiento de los aislados en diferentes medios de cultivo, el color del micelio aéreo y del micelio de sustrato en ISP2, la producción de pigmentos solubles en ISP1 y microscópicamente se midió el diámetro de los aislados y esporas (figura 6). La determinación de la identidad taxonómica a través de la secuenciación del amplicón del gen 16S ribosomal reveló 9 aislamientos relacionados al género *Streptomyces* sp. (figura 7) mientras que 1 aislamiento se relacionó a *Nocardia* sp (figura 8).

El diámetro de los filamentos y esporas de diferentes aislamientos estudiados fueron menores a 1  $\mu\text{m}$  (Tabla 3). Los aislamientos HP171, A2R31, H2P199 y TP199, todos relacionados al género *Streptomyces* sp. mostraron una morfología del micelio aéreo del tipo *Rectiflexibles* (Li *et al.* 2016), mientras que los aislamientos DP143 y KR31,

también representantes del género *Streptomyces* sp., mostraron una morfología del tipo *Retinaculiaperti* (Li et al. 2016). Finalmente el aislamiento MP136, cuya identidad taxonómica no pudo ser determinada a través del marcador molecular 16Sr, muestra filamentos del micelio aéreo del tipo *Spira*. En los demás aislamientos no se logró visualizar una morfología determinada. En el caso del aislamiento CR34 correspondiente a *Nocardia* sp. se visualizó un tipo de filamento que podría corresponder al tejido rastreado que le caracteriza, ya que los miembros de este taxón no esporulan (Goodfellow et al. 2012).

La identidad taxonómica a través del gen 16S ribosomal se validó a través de la construcción de un árbol filogenético con secuencias nucleotídicas modelo de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), obtenidas del análisis de alineamiento múltiple con la Herramienta Blastn lo cual permitió determinar la identidad taxonómica de los aislamientos a nivel de género para *Streptomyces* sp. (figura 7) y para *Nocardia* sp. (figura 8).



**Tabla 3. Descripción fenotípica macro y microscópica de los aislamientos de actinobacterias endófitas de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena e identidad taxonómica de acuerdo al gen 16S ribosomal.**

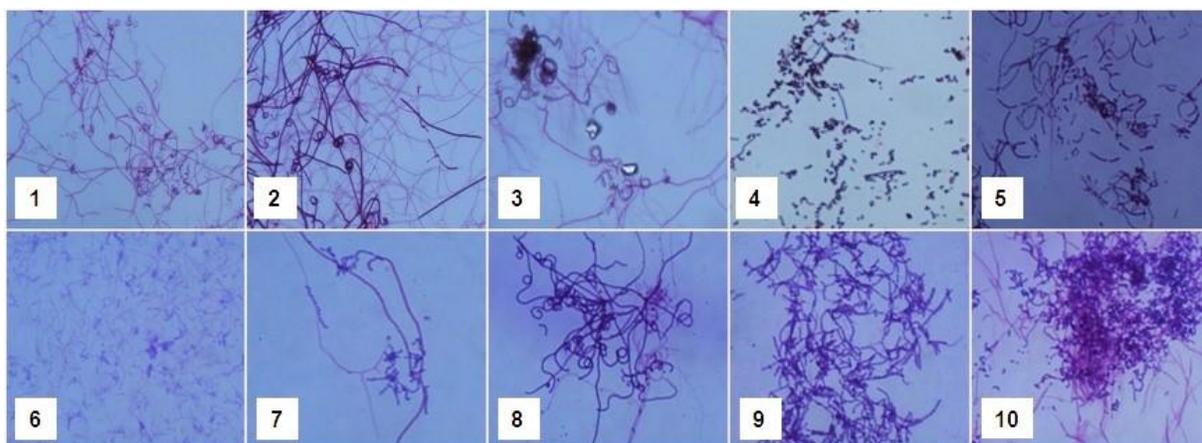
<sup>a</sup> Medios de cultivo según Shirling y Gottlieb (1974)

Código aislamiento	Origen del tejido vegetal	Medios de cultivo <sup>a</sup>			Micelio aéreo	Micelio sustrato	Pigmentos solubles	Diámetro filamentos	Diámetro espora	Disposición esporas <sup>b</sup>	Identidad según gen parcial ADN 16S ribosomal	Número de Acceso en NCBI
		ISP2	ISP3	ISP4								
H2TP199	Hoja	B	MB	MB	gris	Anaranjado	+	0,77 um	0,62 um	<i>Rectiflexibiles</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	KY242591
G1TP199	Raíz	MB	MB	B	gris	Anaranjado	+	<0,5 um	<0,5 um	ND <sup>c</sup>	<i>Streptomyces</i> sp.	KY242592
KR31	Tallo	B	B	B	blanco	Marrón	+	0,72 um	<0,5 um	<i>Retinaculiaperti</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	KY242593
DP143	Tubérculo	MB	MB	MB	blanco/gris	Marrón	+	0,67 um	< 0,5 um	<i>Retinaculiaperti</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	KY242596
A2R31	Tallo	MB	EX	B	gris	Marrón	+	0,77 um	0,89 um	<i>Rectiflexibiles</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>	KY242590
CR34	Tubérculo	MB	B	B	ND	Crema	-	<0,5 um	<0,5 um	ND	<i>Nocardia</i> sp.	KY296348
HP171	Raíz	MB	MB	EX	blanco	Anaranjado	-	0,67 um	0,66 um	<i>Rectiflexibiles</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	KY242594
MP136	Hoja	MB	MB	MB	negro	Amarillo	-	0,56 um	0,66 um	<i>Spira</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	KY242595
TP199	Tubérculo	EX	B	MB	gris	Amarillo	-	0,56 um	<0,5 um	ND	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i>	KY228978
NP199	Tubérculo	MB	MB	MB	gris	Amarillo	-	0,77 um	0,58 um	ND	<i>Streptomyces</i> sp.	KY242597

<sup>b</sup> Descripción según Li *et al.* (2016)

<sup>c</sup> ND; No determinado.

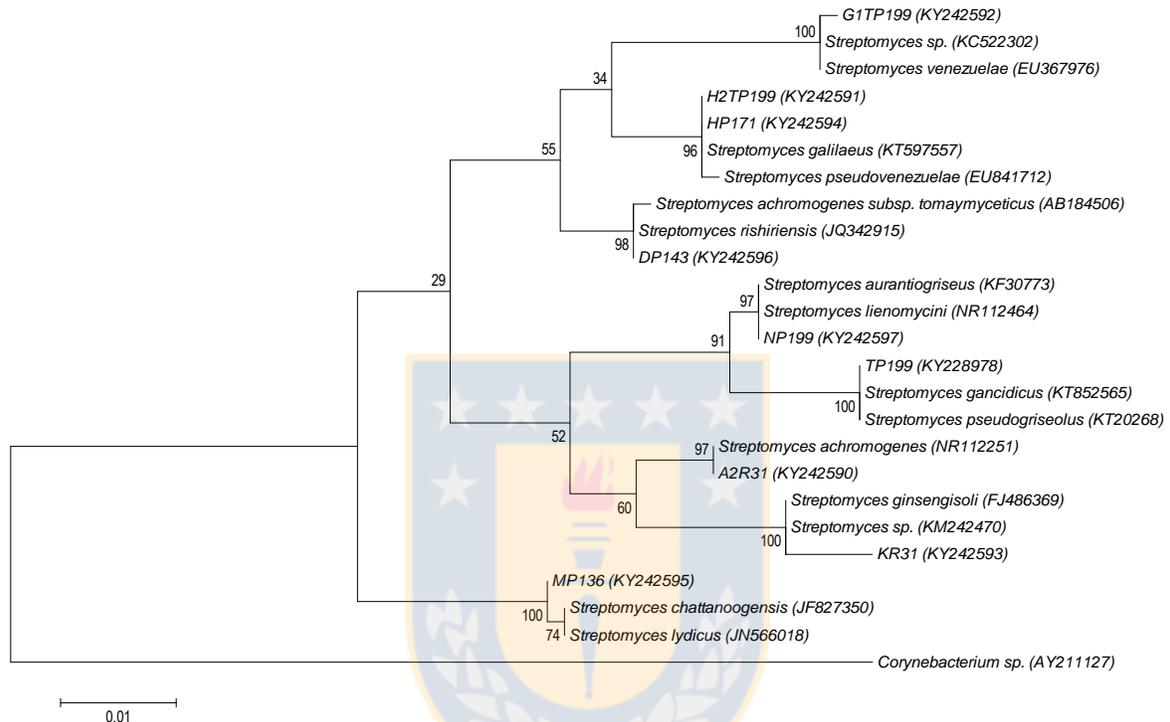
Fuente: Elaboración propia.



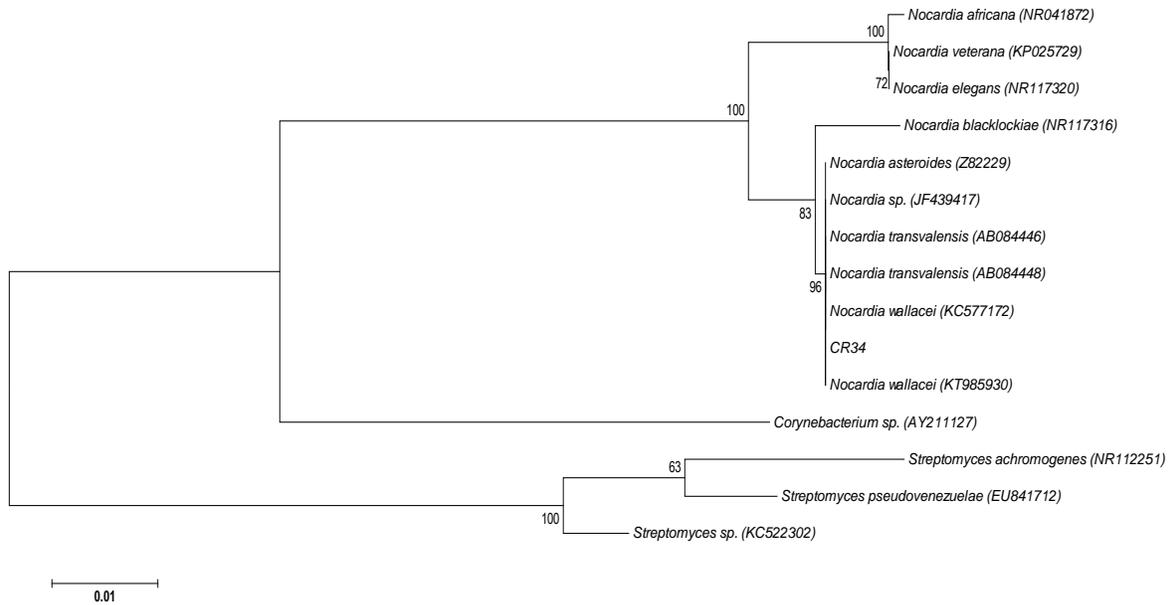
**Figura 6.** Visualización microscópica de la morfología de los aislamientos de actinobacterias endófitas putativas observadas por microscopía óptica a 1000X teñidas con violeta de genciana. 1, MP136. 2, DP143. 3, HP171. 4, G1TP199. 5, A2R31. 6, CR34. 7, H2TP199. 8, KR31. 9, NP199. 10, TP199. Fuente: Elaboración propia.

Se seleccionaron dos aislamientos de *Streptomyces* sp.; TP199 que no produce pigmentos solubles y A2R31 que sí produce pigmentos solubles, para visualizar su morfología celular a través de microscopía electrónica de barrido. Junto a los dos aislamientos anteriores, se seleccionó el aislamiento *Nocardia* sp. CR34 para observar su micromorfología ya que fue el único diferente. *Streptomyces* sp. A2R31 en caldo ISP1 sólo tuvo crecimiento vegetativo formando conglomerados de micelio donde no se observan septos en los filamentos (figura 9A), mientras que en ISP2 se puede visualizar la morfología de las esporas de tipo *doliform* (Li *et al.* 2016) de superficie lisa agrupadas en cadenas (figura 9B), luego *Streptomyces* sp. TP199 también forma aglomeraciones de micelio en ISP1 donde se visualizan los filamentos vegetativos (figura 10A), mientras que en ISP2 se pueden observar esporas de forma *doliform* (Li *et al.* 216) que se agrupan de igual manera que *Streptomyces* sp. A2R31, sin embargo, presentan una superficie verrugosa (figura 10B) (Shirling y Gottlieb 1966, Li *et al.* 2016).

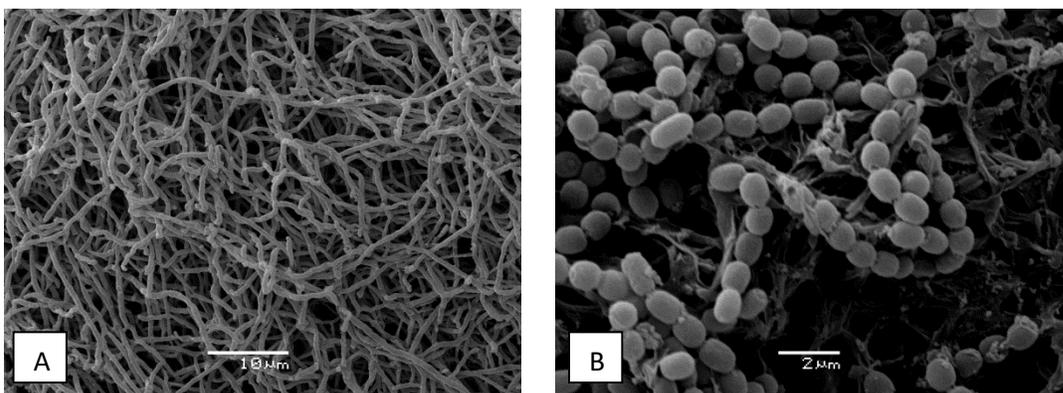
Luego sólo se obtuvo un aislamiento perteneciente al género *Nocardia* sp. con el código CR34, el cual mostró tanto en cultivo líquido ISP1 (figura 11A) y cultivo sólido ISP2 (figura 11B) la morfología de un pseudomicelio con células bacilares generadas a partir de la septación de los filamentos.



**Figura 7.** Arbol filogenético que muestra la relación de las secuencias parciales del gen 16S ribosomal de los aislamientos de actinobacterias endófitas de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena con miembros del género *Streptomyces* sp. obtenidos del análisis de BLASTn. *Corynebacterium* sp. (AY211127) se utilizó para enraizar el árbol que fue construido con el método de máxima verosimilitud y un bootstrap de 1000 iteaciones con el programa MEGA6. El número de acceso de Genbank de las secuencias modelo y de secuencias analizadas del gen 16S rDNA se muestra entre paréntesis. Fuente: Elaboración propia.

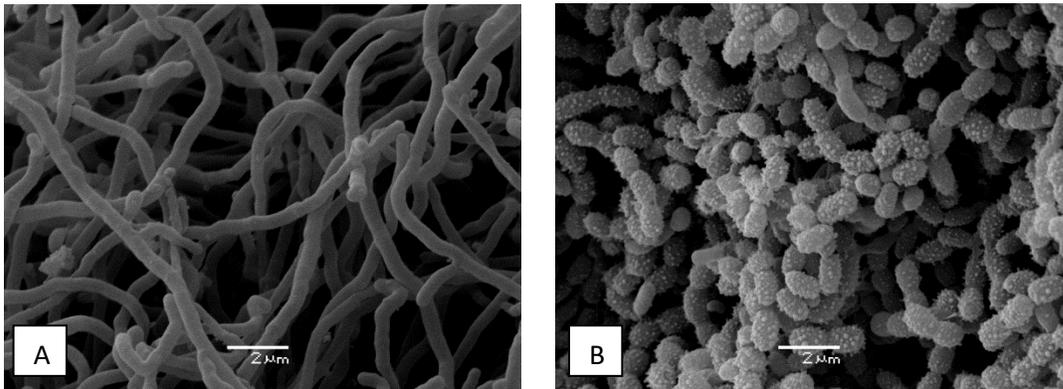


**Figura 8.** Árbol filogenético que muestra la relación de la secuencia parcial del gen 16S ribosomal del aislamiento CR34 de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena con miembros del género *Nocardia* sp. obtenidos del análisis de BLASTn. El árbol fue construido con el método de máxima verosimilitud y un bootstrap de 1000 iteaciones con el programa MEGA6. El número de acceso de Genbank de las secuencias modelo y de secuencias analizadas del gen 16S rDNA se muestra entre paréntesis. Fuente: Elaboración propia.

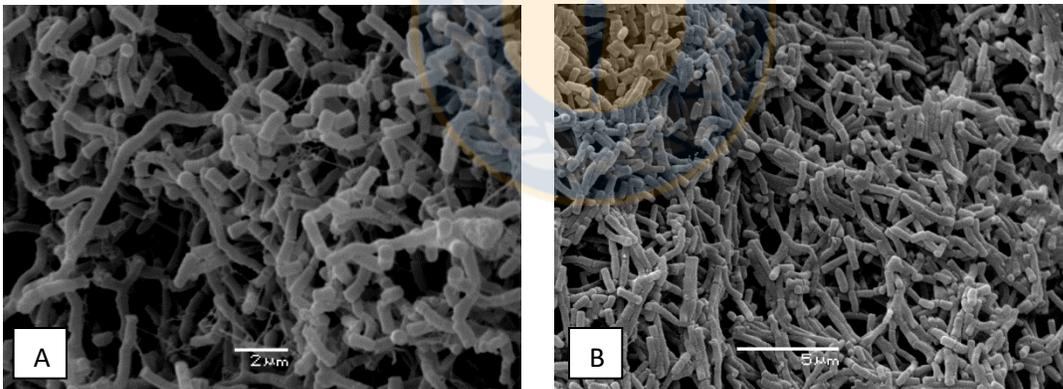


**Figura 9.** Visualización del aislamiento *Streptomyces* sp. A2R31 a través de microscopía electrónica de barrido. A) Filamentos en ISP1 luego de 120 h de incubación en agitación a 120 rpm a 28°C. Barra de escala de 10 μm. B) Cadenas de esporas (conidias) en ISP2

luego de 14 días de incubación a 28°C. Barra de escala de 2  $\mu\text{m}$ . Fuente: Elaboración propia.



**Figura 10.** Visualización del aislamiento *Streptomyces* sp. TP199 a través de microscopía electrónica de barrido. A) Filamentos en ISP1 luego de 120 h de incubación en agitación a 120 rpm a 28°C. Barra de escala de 2  $\mu\text{m}$ . B) Cadenas de esporas (conidias) en ISP2 luego de 14 días de incubación a 28°C. Barra de escala de 2  $\mu\text{m}$ . Fuente: Elaboración propia.



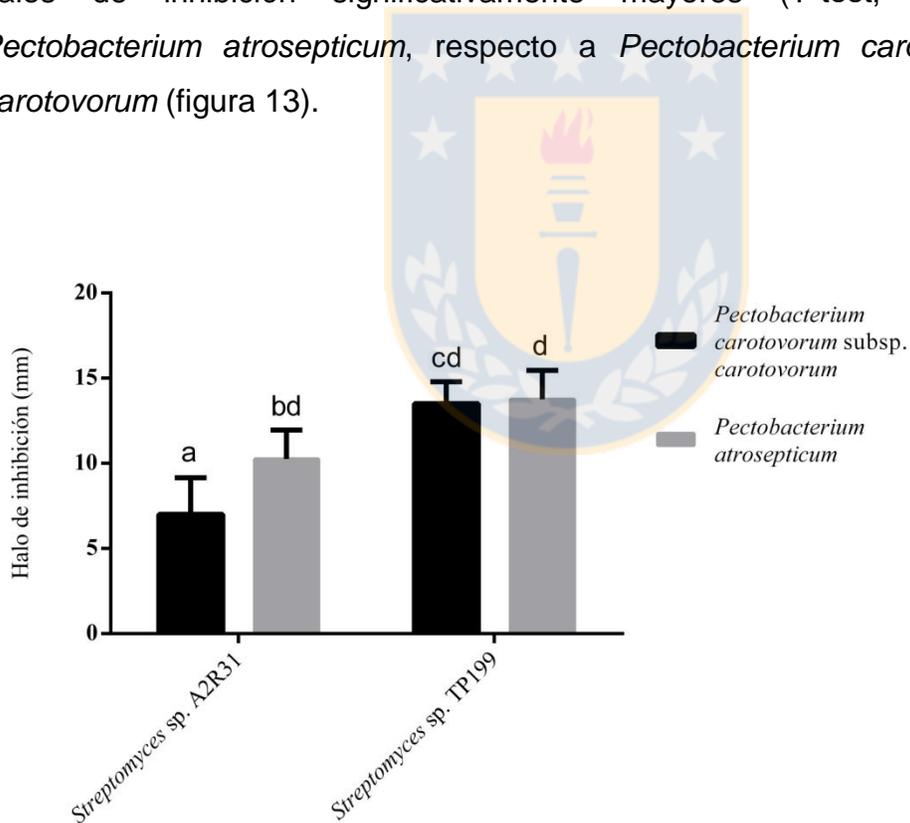
**Figura 11.** Visualización del aislamiento *Nocardia* sp. CR34 a través de microscopía electrónica de barrido. A) células bacilares que se generan a partir de la septación de filamentos que forman un pseudomicelio en ISP1 luego de 120 h de incubación en agitación a 120 rpm a 28°C. Barra de escala de 2  $\mu\text{m}$ . B) Agrupación de células bacilares en ISP2 luego de 14 días de incubación a 28°C. Barra de escala de 5  $\mu\text{m}$ . Fuente: Elaboración propia.

### 3.3. Antagonismo *in vitro*

Todos los aislamientos de actinobacterias endófitas putativas obtenidas a partir de papa nativa, fueron evaluadas para seleccionar aquellas que inhibieran el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* a través de técnicas de difusión *in vitro*, donde sólo los aislamientos *Streptomyces* sp. TP199 y *Streptomyces* sp. A2R31 formaron halos de inhibición a través de las técnicas *cross strake* (figura 12) y con discos de agar (figura 13). Sin embargo, cuando se evaluaron los sobrenadantes de todos los aislamientos de *Streptomyces* sp. y *Nocardia* sp. cultivados en ISP1 durante 120 h en pocillos en agar contra estos patógenos, no se observó el mismo efecto.

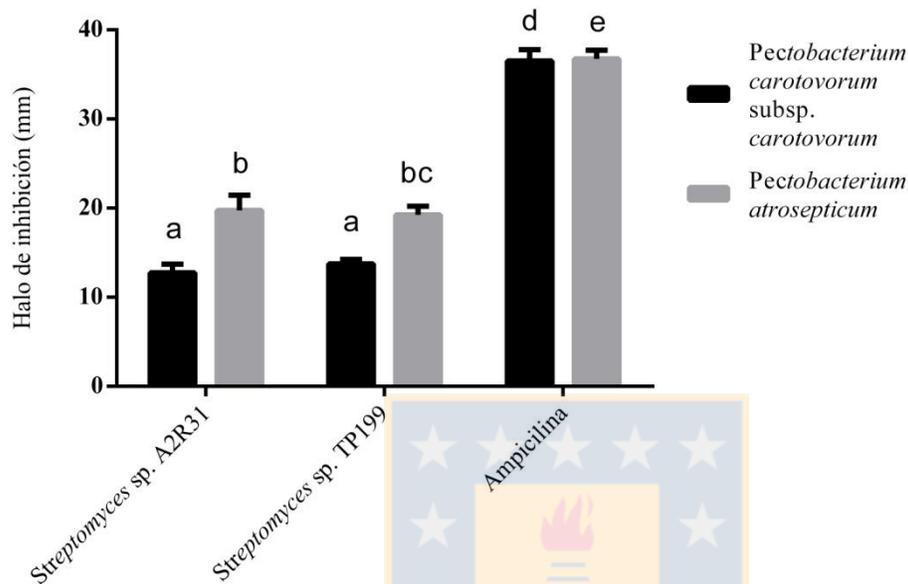
A través de la técnica *cross strake*, *Streptomyces* sp. TP199 generó halos de inhibición de  $13 \pm 1,29$  mm y  $14 \pm 1,71$  mm contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*, respectivamente, mientras que *Streptomyces* sp. A2R31 generó halos de inhibición de  $7 \pm 2,37$  mm y  $10 \pm 1,71$  mm, contra estos mismos patógenos (figura 12). Respecto a la inhibición de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *caortovorum*, *Streptomyces* sp. TP199 tuvo un efecto significativamente mayor (T-test,  $P \leq 0,05$ ) al efecto del aislamiento *Streptomyces* sp. A2R31 (figura 12), mientras que para *Pectobacterium atrosepticum*, ambos aislamientos de *Streptomyces* sp. formaron un halo de inhibición que no se diferenció significativamente entre ellos (T-test,  $P \geq 0,05$ ) (figura 12). Luego, *Streptomyces* sp. A2R31 generó un halo de inhibición significativamente mayor (T-test,  $P \leq 0,05$ ) contra *Pectobacterium atrosepticum*, que contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Y por otro lado, no se diferenció significativamente (T-test,  $P \geq 0,05$ ) el efecto de *Streptomyces* sp. TP199 contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *caortovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*, al comparar sus respectivos halos de inhibición (figura 12).

A través de la técnica de difusión en discos de agar, *Streptomyces* sp. TP199 generó halos de inhibición de  $14 \pm 0,5$  mm y  $19 \pm 0,96$  mm contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*, respectivamente, mientras que *Streptomyces* sp. A2R31 generó halos de inhibición de  $13 \pm 0,96$  mm y  $20 \pm 1,71$  mm, contra estos mismos patógenos (figura 13). La ampicilina, que se usó como control positivo, generó halos de inhibición de  $37 \pm 1,29$  mm y  $37 \pm 0,96$  mm, contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*, respectivamente. Tanto *Streptomyces* sp. TP199 como *Streptomyces* sp. A2R31 generaron halos de inhibición significativamente menores (T-test,  $P \leq 0,05$ ) a los generados por el disco de ampicilina (10  $\mu$ g) (figura 13). Luego, tanto *Streptomyces* sp. TP199 como *Streptomyces* sp. A2R31 generaron halos de inhibición significativamente mayores (T-test,  $P \leq 0,05$ ) contra *Pectobacterium atrosepticum*, respecto a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (figura 13).



**Figura 12.** Evaluación de la actividad antagónica *in vitro* de los aislamientos *Streptomyces* sp. TP199 y *Streptomyces* sp. A2R31 contra *Pectobacterium carotovorum* subsp.

*carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* a través de la técnica *cross strike*. a-d indican significancia estadística (T-test,  $P \leq 0,05$ ), N=4. Fuente: Elaboración propia.

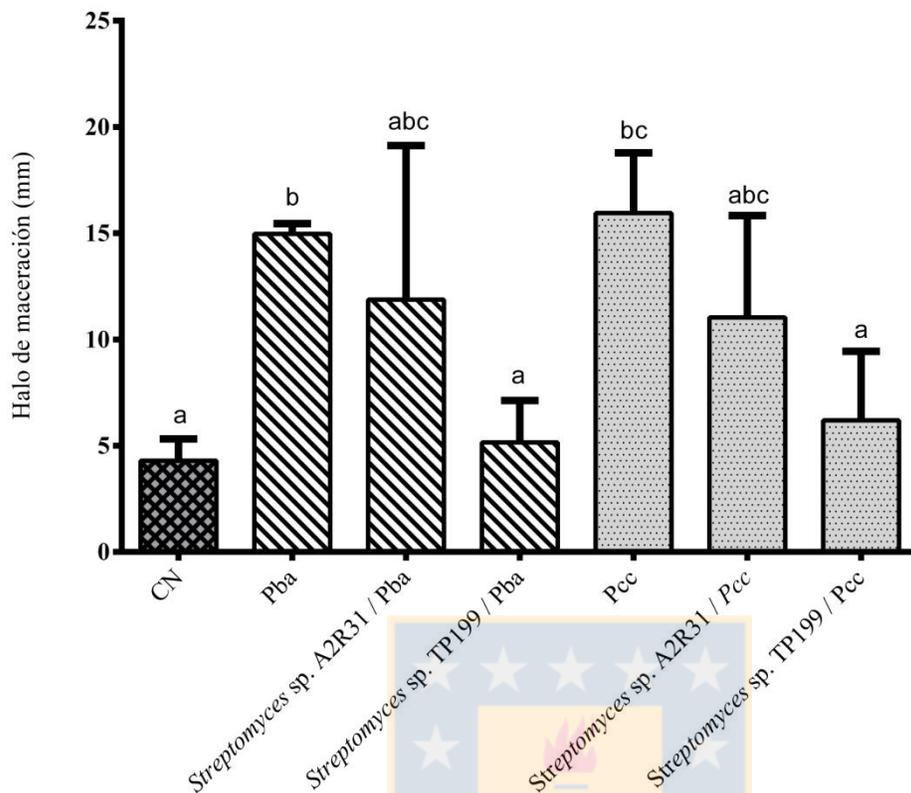


**Figura 13.** Evaluación de la actividad antagonista *in vitro* de los aislamientos *Streptomyces* sp. TP199 y *Streptomyces* sp. A2R31 frente a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* a través de difusión con discos de agar. a-e indican significancia estadística (T-test,  $P \leq 0,05$ ), N=4. Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente, se evaluó el efecto sobre la maceración de tubérculos de papa Pukará-INIA al ser inoculados con *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* junto a los aislamientos *Streptomyces* sp. TP199 y *Streptomyces* sp. A2R31, donde se midieron halos de maceración entorno a pocillos que se realizaron en láminas de tubérculos de papa Pukará-INIA (figura 14), donde se inocularon las bacterias, resultando en halos de maceración de  $4,29 \pm 1,03$  mm para el pocillo con caldo nutritivo estéril,  $14,97 \pm 0,49$  para el pocillo inoculado con suspensión de *Pectobacterium atrosepticum*,  $11,87 \pm 7,25$  mm para el pocillo inoculado con suspensión de *Pectobacterium atrosepticum* y *Streptomyces* sp. A2R31 en relación 1:1,  $5,16 \pm 1,97$  mm para el pocillo inoculado

con suspensión de *Pectobacterium atrosepticum* y *Streptomyces* sp. TP199 en relación 1:1,  $15,95 \pm 2,83$  mm para el pocillo inoculado con suspensión de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*,  $11,03 \pm 4,79$  para el pocillo inoculado con suspensión de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Streptomyces* sp. A2R31 en relación 1:1 y  $6,19 \pm 3,25$  mm para el pocillo inoculado con suspensión de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Streptomyces* sp. TP199 en relación 1:1 (figura 14).

No hubo diferencias significativas (T-test,  $P \geq 0,05$ ) entre los halos de maceración generados en los pocillos inoculados con suspensión de *Pectobacterium atrosepticum* y *Streptomyces* sp. A2R31 en relación 1:1, respecto a los pocillos inoculados sólo con *Pectobacterium atrosepticum* (figura 14), al igual que al comparar los halos de maceración generados en pocillos inoculados con suspensión de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Streptomyces* sp. A2R31 en relación 1:1 (figura 14), mientras que los halos de maceración generados en los pocillos inoculados con suspensión de *Pectobacterium atrosepticum* y *Streptomyces* sp. TP199 en relación 1:1 fue significativamente menor (T-test,  $P \leq 0,05$ ) a los halos de maceración generados en pocillos inoculados con suspensión de *Pectobacterium atrosepticum* sólo (figura 14), luego, también resultó que la suspensión de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Streptomyces* sp. TP199 en relación 1:1 generó halos de maceración significativamente menores (T-test,  $P \leq 0,05$ ) respecto a los generados en pocillos inoculados con suspensión de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* sólo (figura 14).



**Figura 14.** Efecto sobre la maceración tubérculos de papa Pukará-INIA inoculados con *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* a una concentración de  $10^8$  células/mL y *Streptomyces* sp. A2R31 con *Streptomyces* sp. TP199 a una concentración de  $10^8$  esporas/mL, incubados a  $28^\circ\text{C}$  durante 36 h, los tratamientos fueron los siguientes: i) PCC; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ii) A2R31; *Streptomyces* sp. A2R31 iii) TP199; *Streptomyces* sp. TP199 iv) A2R31-PCC; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* + *Streptomyces* sp. A2R31 v) TP199-PCC; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* + *Streptomyces* sp. TP199. a-c indican significancia estadística (T-test,  $P \leq 0,05$ ),  $N=3$ . Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo a resultados de antagonismo *in vitro* y de efecto sobre la maceración de tubérculos de papa Pukará-INIA, se seleccionó el aislamiento *Streptomyces* sp. TP199 para evaluar su efecto sobre la cinética de crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* en un co-cultivo según el modelo de Gompertz

analizado por Zwietering *et al.* (1994) (figura 15) en las condiciones óptimas de crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, donde se encontró que el valor del recuento microbiano máximo en fase estacionaria (*A*) de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* difirió significativamente ( $P < 0,05$ ) en los dos experimentos (Tabla 4). La tasa de crecimiento específica máxima de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* aumentó significativamente ( $P < 0,05$ ) en el co-cultivo con un valor de  $0,855 \pm 0,04$  ( $h^{-1}$ ) respecto al valor de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* creciendo sólo, el cual fue de  $0,855 \pm 0,04$  ( $h^{-1}$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4. Parámetros de la cinética de crecimiento del co-cultivo de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Streptomyces* sp. TP199 de acuerdo al modelo de Gomperz (Zwietering *et al.* 1994)**

Parámetro	<i>Pcc</i>	<i>Pcc</i> + <i>Streptomyces</i> sp. TP199	Unidad de medida
$A^a$	$10,056 \pm 0,35$	$12,102 \pm 0,45$	$\ln(N/N_0)$
$\mu_m^b$	$0,855 \pm 0,04$	$1,154 \pm 0,41^*$	1/h
$\gamma^c$	$0,521 \pm 0,13$	$0,01 \pm 0,02$	h

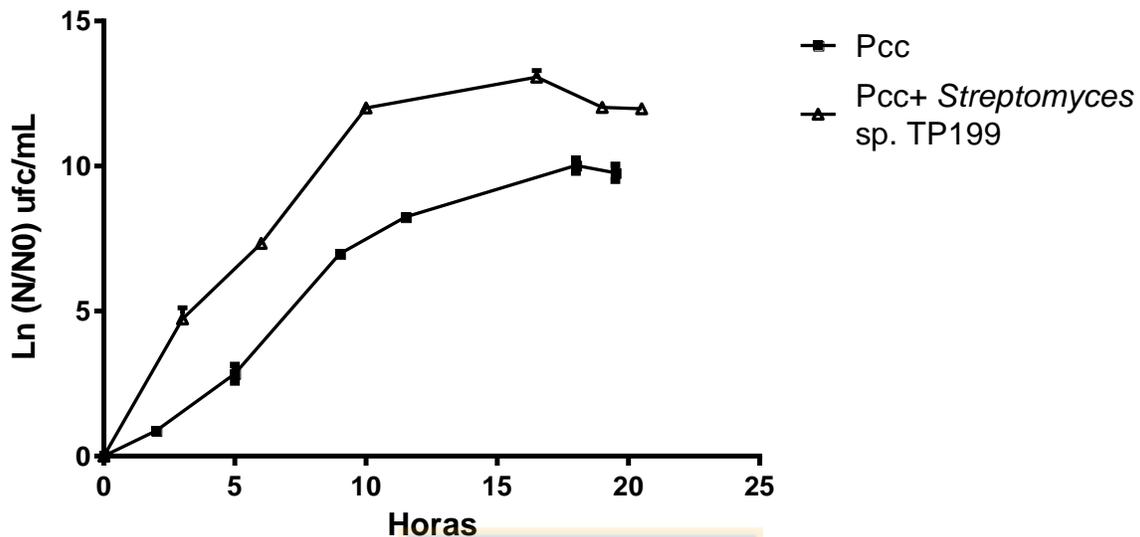
<sup>a</sup> Recuento máximo de fase estacionaria (Zwietering *et al.* 1994)

<sup>b</sup> Tasa de crecimiento específica máxima en fase exponencial (Zwietering *et al.* 1994)

<sup>c</sup> Tiempo en fase lag (Zwietering *et al.* 1994)

\* Significancia estadística T-test ( $P < 0,05$ )

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 15.** Cinética de crecimiento ( $\ln(N/N_0)$  ufc/mL) de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* en cultivo sólo y en co-cultivo con *Streptomyces* sp. TP199. N=3. Fuente: Elaboración propia.

### 3.4. Hibridación fluorescente in situ con sonda doblemente marcada (DOPE-FISH).

El sistema radicular de *Solanum tuberosum* sp. cv. Pukará-INIA fue inoculado con *Streptomyces* sp. TP199 para demostrar visualmente la capacidad de este aislamiento para colonizar el rizoplasma y la endoriza de la planta a través de microscopía de laser confocal (Centro de Microscopía Avanzada, CMA BIO-BIO, Proyecto CONICYT PIA ECM-12). Se utilizó la sonda HGC69a unida al fluoróforo Cy5 en los extremos 5' y 3' para realizar DOPE-FISH en los tejidos radiculares. Este fluoróforo se excita en el rango de 625-650 nm y emite fluorescencia a 670 nm, por lo tanto, se utilizó el laser rojo lejano (excitación 633 nm /emisión 638 – 747 nm) para la obtención de imágenes en el espectro de la sonda, que se seleccionó, ya que en este espectro el tejido radicular mostró una débil autofluorescencia (figura 17).

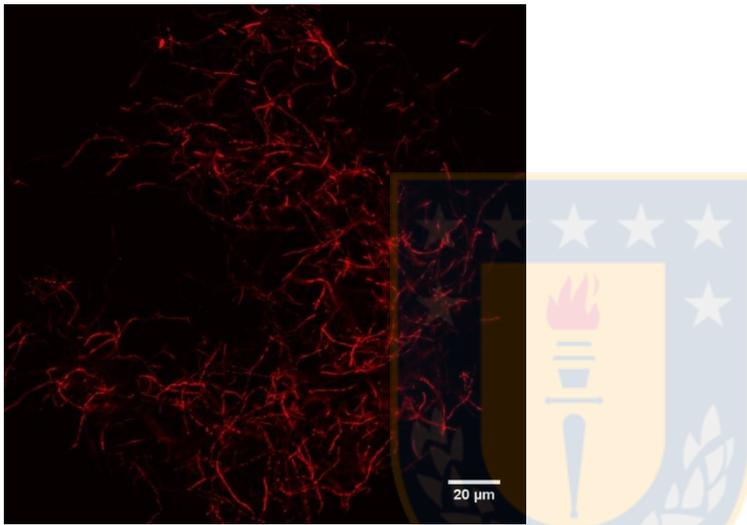
Se realizó la hibridación fluorescente *in situ* con un cultivo puro de *Streptomyces* sp. TP199 donde se visualizó su morfología filamentosa en caldo de cultivo ISP1 (Figura 16), lo cual confirmó que la sonda HGC69a fue capaz de hibridar con este aislamiento.

Se usó la autofluorescencia del tejido radicular para describir la anatomía y linajes celulares de la raíz en los rangos de excitación/emisión de 488/490-560 nm y 405/410-480 nm, que permitió diferenciar pelos radicales en imágenes de la superficie de la raíz (figuras 18a y 18b), células de la rizodermis (figuras 18c, 18d y 18e) y protoxilema (tejido vascular para transporte de agua y compuestos inorgánicos en plantas) en imágenes de raíces completas (figuras 18d y 18f) y de corte histológico longitudinal (figura 17c).

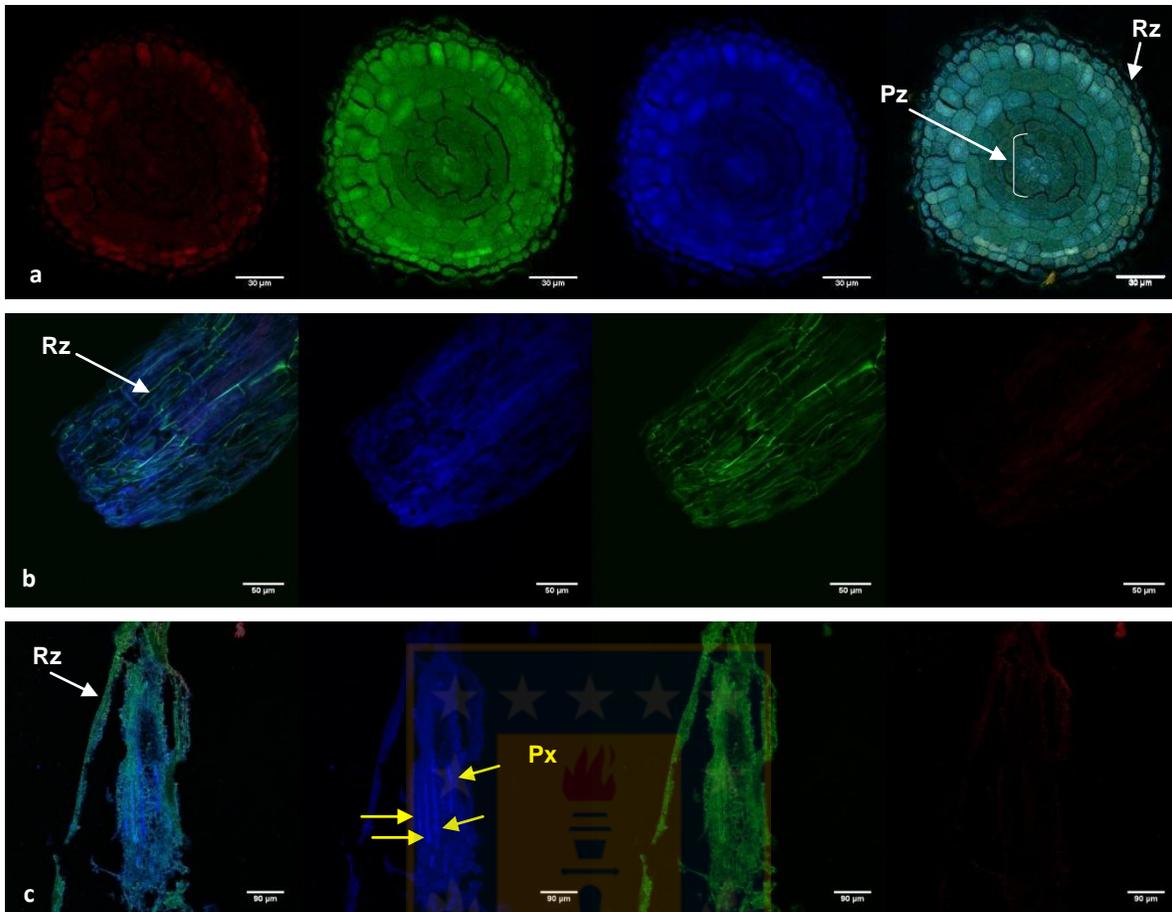
Se observó que en tejido proveniente de plantas control (no inoculadas con *Streptomyces* sp. TP199) no hubo fluorescencia que mostrara colonización microbiana de falsos positivos por unión inespecífica con la sonda HGC69a en corte transversal de la zona apical de la raíz (Figura 17a), en superficie de zona apical de tejido radicular, es decir, en la rizodermis (Figura 17b), y en corte longitudinal de la zona de elongación de la raíz (Figura 17c).

La visualización de fluorescencia correspondiente a la sonda HGC69a en la superficie de las raíces de plantas inoculadas con *Streptomyces* sp. TP199, se realizó a partir de muestras provenientes de plantas con crecimiento en etapa vegetativa y luego de 3 días desde la inoculación, donde se visualizó la presencia de puntos de fluorescencia en espectro de rojo lejano sobre la rizodermis en la zona pilífera de la raíz (figuras 18a y 18b) y sobre células rizodérmicas (Figuras C-E) donde no se diferenció un patrón espacial específico de los puntos correspondientes a la sonda HGC69a.

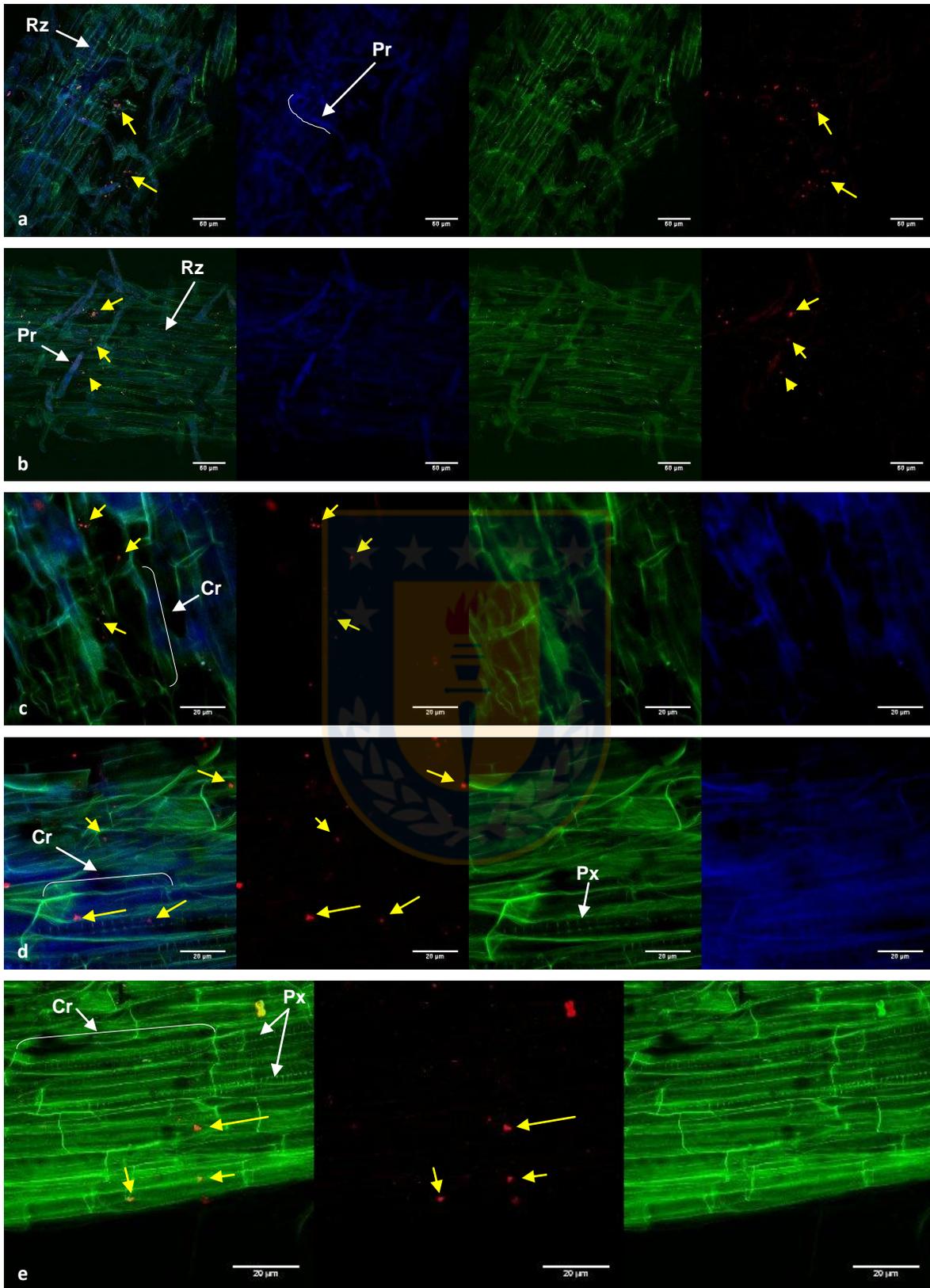
En el caso de los cortes histológicos, que corresponden a 10 días después de la inoculación, se observó una mayor intensidad en la fluorescencia correspondiente a la sonda HGC69a en zona de crecimiento de pelo radical (figura 18f y 18g), en rizodermis (figura 18f y 18g) y en el metaxilema (figura 18f). El acercamiento de células vegetales del haz vascular, permitió visualizar que los puntos de mayor intensidad de la fluorescencia de la sonda HGC69a se presentaron en paredes celulares y espacios intercelulares de células eucariontes (figura 19).

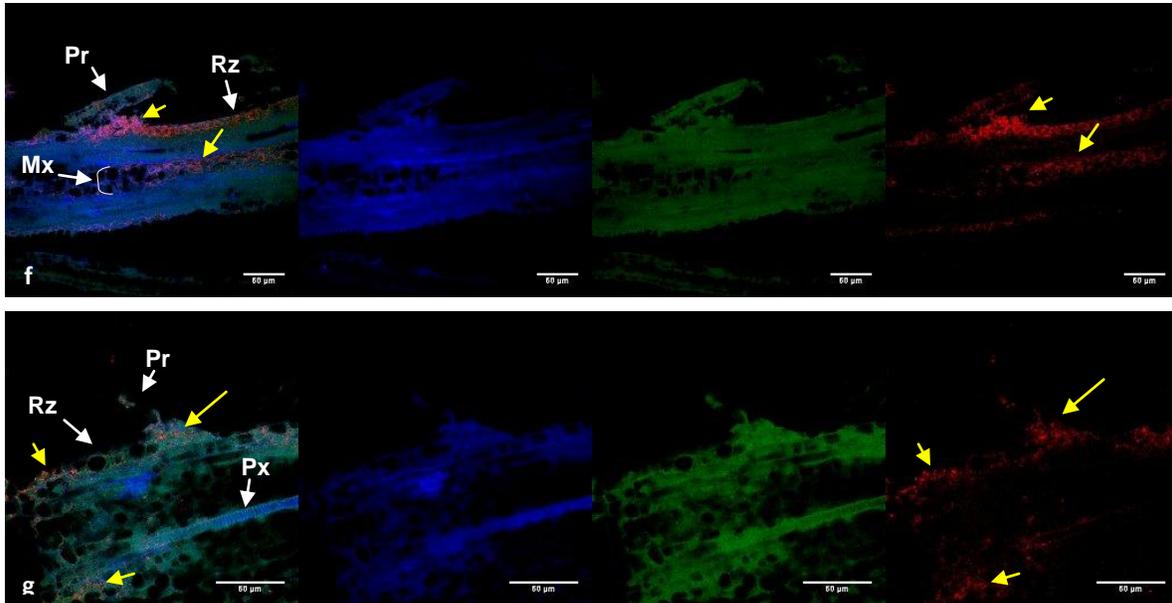


**Figura 16.** Imagen de microscopía de laser confocal de hibridación fluorescente in situ de cultivo puro de *Streptomyces* sp. TP199 en ISP1 con la sonda HGC69a unida al fluoroforo Cy5 en extremos 5' y 3' visualizado a través de la excitación del laser rojo lejano (excitación 633 nm /emisión 638 – 747 nm). Barra de escala; 20 μm. Fuente: Elaboración propia.

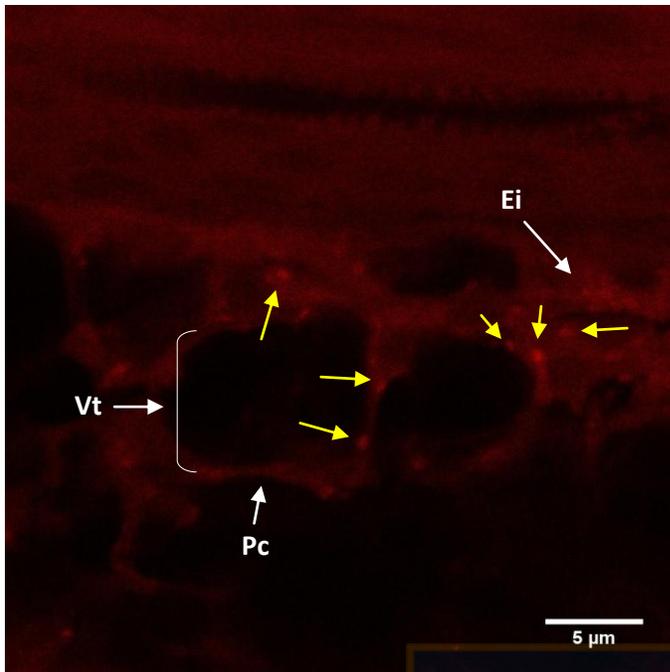


**Figura 17.** Imágenes de microscopía de laser confocal de hibridación fluorescente in situ de raíces de *S. tuberosum* Pukará-INIA control (sin inocular con *Streptomyces* sp. TP199) con sonda HGC69a unida a Cy5 en extremos 5' y 3'. Se muestra la autofluorescencia del tejido por separado y en una imagen compuesta, donde se visualiza en verde la excitación a 488 nm y emisión a 490 – 560 nm, en azul correspondiente a luz UV la excitación a 405 nm y emisión a 410 – 480 nm y en rojo correspondiente a luz rojo lejano la excitación a 633 nm y emisión a 638 – 747 nm A: Corte transversal de raíz en zona apical meristemática, barra de escala de 30 µm B: Superficie de raíz en zona apical meristemática, barra de escala de 50 µm C: Corte Longitudinal de raíz en zona de elongación, barra de escala de 50 µm. Rz; Rizodermis. Pz; Tejido provascular. Px; Protoxilema (flechas amarillas). Fuente: Elaboración propia.





**Figura 18.** Imágenes de microscopía de laser confocal de hibridación fluorescente in situ de raíces de *S. tuberosum* Pukará-INIA, inoculada con *Streptomyces* sp. TP199, con sonda HGC69a unida a Cy5 en extremos 5' y 3'. Se muestra la autofluorescencia del tejido por separado y en una imagen compuesta, donde se visualiza en verde la excitación a 488 nm y emisión a 490 – 560 nm, en azul correspondiente a luz UV la excitación a 405 nm y emisión a 410 – 480 nm y en rojo correspondiente a luz rojo lejano la excitación a 633 nm y emisión a 638 – 747 nm a-b: Superficie de raíz en zona pilífera después de 3 días desde la inoculación de *Streptomyces* sp. TP199. c-e: Rizodermis. f-g: Cortes histológicos longitudinales de raíz en zona de elongación después de 7 días desde la inoculación de *Streptomyces* sp. TP199. Rz: Rizodermis. Cr: Célula rizodérmica. Pr: Pelo radicular. Pz: Tejido provascular. Mx: Metaxilema. Px: Protoxilema. a-b, f-g: Barra de escala de 60 µm. c-e: Barra de escala de 20 µm. Flechas amarillas indican fluorescencia de sonda HGC69a. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 19.** Imagen de microscopía de laser confocal de hibridación fluorescente in situ de una raíz de *S. tuberosum* Pukará-INIA, inoculada con *Streptomyces* sp. TP199, con sonda HGC69a unida a Cy5 en extremos 5' y 3'. Se muestra la autofluorescencia en rojo lejano cuya excitación es a 633 nm y emisión a 638 – 747 nm. Vt: Vaso de metaxilema, Pc: Pared celular vegetal, Ei: Espacio intercelular eucarionte. Flechas amarillas indican fluorescencia de sonda HGC69a. Barra de escala de 5 μm. Fuente: Elaboración propia.

#### 4. DISCUSION

##### **Objetivo específico 1. Determinar la presencia de actinobacterias endófitas en papas nativas (*S. tuberosum*) chilenas.**

Las Actinobacterias son un *phylum* bacteriano diferenciado por su alto contenido de G+C en su ADN, las cuales se distribuyen inocuamente en ecosistemas acuáticos y terrestres (Goodfellow *et al.* 2012, Barka *et al.* 2016). En el caso de las plantas, se ha descrito que este taxón conforma parte de la microbiota vegetal colonizando diferentes compartimentos, como la endósfera, filósfera y rizósfera (Andreote *et al.* 2009, Hardoim *et al.* 2015).

Dentro de los trabajos realizados en plantas, se ha reportado el estudio de la comunidad de actinobacterias en diferentes variedades comerciales de *Solanum tuberosum* (Garbeva *et al.* 2001, Sessitsch *et al.* 2002, Berg *et al.* 2005, Podolich *et al.* 2007, van Overbeek y van Elsas 2008, Andreote *et al.* 2010, Weinert *et al.* 2010, Inceoglu *et al.* 2011, Someya *et al.* 2013, Kobayashi *et al.* 2015), sin embargo, este trabajo corresponde al primer reporte de la presencia de actinobacterias endófitas en *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena.

El análisis de la distribución de la comunidad de actinobacterias en *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena se basó en la amplificación específica del gen ribosomal 16S y la separación electroforética en gel de gradiente denaturante (DGGE) de sus polimorfismos (Muyzer *et al.* 1993, Muyzer y Smalla 1998), para lo cual se utilizó el partidador F243, diseñado para el estudio específico de este taxón (Heuer *et al.* 1997, Das *et al.* 2007, Tan *et al.* 2009).

El DGGE es una técnica que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo largo (hasta 500 pb), pero con diferentes secuencias de pares de bases (Myers *et al.* 1985). En ecología microbiana, este método se ha utilizado para estudiar el polimorfismo de genes conservados como el 16S rRNA amplificado por

PCR, a partir del ADN/ARN extraído de una muestra ambiental, cuya información permite analizar la estructura de una comunidad microbiana (Muyzer *et al.* 1993) en función de su riqueza, es decir, a partir de la composición de los principales grupos taxonómicos que componen una comunidad (Dejonghe *et al.* 2001), aceptando que una banda corresponde a un amplicón del gen 16S ribosomal de un grupo taxonómico diferente, que se define como una unidad taxonómica operacional (OTU) (Rastogi y Sani 2011).

En el análisis de agrupamiento de los polimorfismos observados en *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena a través de PCR-DGGE, se observó que los tejidos (raíz o tubérculo) tuvieron un mayor efecto en diferenciar las comunidades de actinobacterias respecto a los compartimentos (endósfera o rizósfera). De acuerdo a lo propuesto por Santhanam *et al.* (2014) esta diferenciación está dada porque los tejidos podrían actuar como diferentes nichos ecológicos de una misma planta, lo cual también es coherente a lo interpretado por van Overbeek *et al.* (2008) y Weinert *et al.* (2010) respecto a sus resultados, ya que no encontraron diferencias significativas entre comunidades bacterianas de diferentes grupos taxonómicos estudiados en tubérculos provenientes de distintos genotipos de papa (*S. tuberosum*), sin embargo sí a nivel de tejido. El fundamento de lo expuesto anteriormente se podría explicar por las diferencias nutricionales provistas por ambos tejidos, donde en los exudados radiculares se encuentran azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos (Bais *et al.* 2006), mientras que sobre la superficie de los tubérculos no hay secreción de exudados, sino que principalmente se liberan células vegetales debido a lesiones o por el crecimiento del tubérculo (Lottman *et al.* 2000).

Sin embargo, en contraste a lo anterior, Marques *et al.* (2014) y Kobayashi *et al.* (2015) proponen que el genoma de la planta sí tiene un efecto significativo en la estructura de la comunidad bacteriana asociada a la papa (*S. tuberosum*), mientras que Inceoglu *et al.* (2011) profundiza en que en la etapa juvenil existe dependencia del cultivo para determinar la microbiota asociada a la planta, la cual

desaparece en las etapas de floración y senescencia de la planta. De acuerdo a los resultados de la comparación de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena y *S. tuberosum* Pukará-INIA se observa una diferenciación superior al 80% en la comunidad de actinobacterias, lo cual podría responder a una dependencia del cultivo, pero esta conclusión requiere profundizar el estudio de las comunidades bacterianas en todos los tejidos y durante todas las etapas de crecimiento de la planta.

Respecto a la similitud entre las comunidades de actinobacterias presentes en la endósfera y rizósfera de raíces (49%) y tubérculos (61,6%), se puede inferir que la comunidad endófito proviene de la comunidad rizosférica, lo cual es coherente a los resultados de Inceoglu *et al.* (2012) y Lundberg *et al.* (2012), quienes también observaron que el suelo es determinante en la comunidad microbiana que colonizará la planta (Bulgarelli *et al.* 2013, Gaiero *et al.* 2013). Sessitsch *et al.* (2001) no encontraron diferencias entre la comunidad de actinobacterias endófitas en las variedades de papa estudiadas a través de DGGE, aunque a través de la técnica de T-RFLP, encontraron fragmentos que sólo estuvieron presentes en la endosfera radicular, al igual que en los resultados de Berg *et al.* (2005), quienes también lograron diferenciar al menos 3 fragmentos en la endósfera que no se observaron en la rizósfera, por lo tanto, el análisis a través de esta técnica podría tener una mayor sensibilidad respecto al PCR-DGGE para diferenciar grupos taxonómicos bacterianos en los diferentes tejidos de la endósfera de las plantas.

Posteriormente al analizar la riqueza de actinobacterias, tanto en *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena y *S. tuberosum* Pukará-INIA, se observó una riqueza ponderada menor a 10 en la endosfera radicular, lo cual de acuerdo a lo propuesto por Marzorati *et al.* (2008), se interpreta como un ambiente de restringida colonización que se diferenció significativamente de la comunidad rizosférica. Esta interpretación también se desprende del trabajo realizado por Sessitsch *et al.* (2001) a través de PCR-DGGE al realizar el cálculo de la riqueza ponderada de la endosfera radicular de las variedades Achirana Inta, Bionta y

Mehlige Mühlviertler de *S. tuberosum*, cuyos valores son  $0,95 \pm 0,06$ ;  $2,93 \pm 0,83$  y  $1,40 \pm 0,06$ ; respectivamente. Luego en el trabajo de Garbeva *et al.* (2001) también se calcula un valor de riqueza ponderada menor a 10 ( $5,36 \pm 5,03$ ) para este nicho. Finalmente de acuerdo a los resultados de Manter *et al.* (2010), quienes estudiaron la comunidad bacteriana endófito de raíces de papa (*S. tuberosum*) a través de pirosecuenciación, se confirma que existe una baja riqueza en este hábitat, con 5 grupos dominantes a nivel de *phylum* donde las Actinobacterias corresponden a uno de éstos.

Ahora bien, para el caso de los tubérculos, se observa que la colonización de la comunidad de actinobacterias endófito es de una alta riqueza (índice ponderado mayor a 10) (Marzorati *et al.* 2008) al igual que en la rizósfera. En el estudio de Sessitsh *et al.* (2002), a través de la técnica de T-RFLP no se diferenció la comunidad de actinobacterias presente en los tubérculos respecto a la presente en la rizósfera, lo cual también es comparable a los resultados de Weinert *et al.* (2010), quienes estudiaron la comunidad de la familia *Streptomycetaceae* en tubérculos, y la riqueza encontrada en promedio entre las diferentes variedades estudiadas fue de un  $56,5 \pm 11,02$ , lo cual también es comparable a los resultados obtenidos en este trabajo. Cabe destacar que en el trabajo de Sessitsch *et al.* (2004), además encontraron una mayor riqueza de endófitos en plantas caracterizadas como saludables, haciendo alusión al estado fisiológico de las plantas.

Desde el punto de vista taxonómico, se ha reportado que la microbiota endófito en papas es dominada en primer lugar por Proteobacterias y en segundo lugar por Actinobacterias (Pageni *et al.* 2013, Someya *et al.* 2013, Barnett *et al.* 2014, Pageni *et al.* 2014). En este trabajo, el género *Micromonospora sp.* se detectó presente tanto en la endósfera de la raíz, como en la rizósfera de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena, por lo tanto, podría ser un endófito facultativo. Este género se ha observado presente asociado a plantas de papa (Krechel *et al.*

2002) y también en otros cultivos caracterizándose como uno de los géneros de actinobacterias inocuas como endófito (Sheng *et al.* 2011).

Luego, *Streptomyces sp.* y *Arthrobacter sp.* son 2 géneros de actinobacterias cuya identidad se relacionó para grupos presentes en la endósfera y rizósfera del tubérculo *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* nativa chilena, los cuales también han sido detectado a través de técnicas independiente de cultivo en otras variedades de papa (Manter *et al.* 2010, Weinert *et al.* 2010, Someya *et al.* 2013, Kobayashi *et al.* 2015).

Al considerar que el tubérculo es capaz de hospedar una mayor riqueza de actinobacterias, los tubérculos semillas podrían actuar como reservorios de actinobacterias endófitas. Sin embargo, hay que considerar que la riqueza microbiana endófitas podría cambiar ante un proceso de infección de un fitopatógeno como lo estudiaron Reiter *et al.* (2002) y Köiv *et al.* (2015) al inocular *Pectobacterium sp.* en plantas de papa donde observaron cambios en la microbiota del hospedero y donde además hay que considerar que hay especies patógenas de Actinobacterias, entre ellas, *Streptomyces sp.* (Sessitsch *et al.* 2002) y *Clavibacter sp.* (Reiter *et al.* 2002, Sessitsch *et al.* 2004).

El aislamiento de actinobacterias en el medio selectivo HV (Hayakawa y Nonomura 1987) favoreció la recuperación de actinobacterias del género *Streptomyces sp.*, las cuales ya se han reportado como endófitos putativos aislados en diferentes variedades de papa (*S. tuberosum*) (Garbeva *et al.* 2001, Sssitsch *et al.* 2004, Weinert *et al.* 2010, Pageni *et al.* 2013, Pageni *et al.* 2014). Este género es históricamente el más comúnmente estudiado del *phylum* de las Actinobacterias, principalmente por ser uno de los principales productores de compuestos naturales bioactivos de origen microbiano (Berdy 2005, Franco – Correa y Chavarro – Anzola 2016).

El primer criterio de selección de los aislamientos de actinobacterias endófitas putativas fue en base a la validación de la desinfección superficial (Kaewkla y Franco 2013). Los 10 aislamientos de actinobacterias obtenidas se estudiaron considerando que los controles de desinfección no mostraron crecimiento al ser cultivados. Ahora bien, esta validación está sujeta a las restricciones de culturabilidad de los microorganismos (Alain y Querellou 2009), por lo tanto, no se puede concluir que la desinfección superficial sea efectiva o que los aislamientos obtenidos sean endófitos verdaderos (Rosenblueth y Martínez – Romero 2006, Reinhold – Hurek y Hurek 2011), ya que los aislamientos de actinobacterias recuperadas podrían ser epífitos que podrían haberse protegido de la desinfección en microcolonias y/o biopelículas (Castiblanco y Sudin 2016). Ahora bien, se ha propuesto que la colonización de la superficie de los tejidos vegetales (Meneses *et al.* 2011) es un proceso requerido en el ciclo de vida de endófitos facultativos, por lo tanto, estos aislamientos se reportan como endófitos putativos facultativos (Rosenblueth y Martínez – Romero 2006, Reinhold – Hurek y Hurek 2011).

De los 10 aislamientos de actinobacterias endófitas putativas obtenidas desde diferentes tejidos de plantas de papa nativa, la evaluación morfológica y molecular fue consistente con los géneros *Streptomyces* y *Nocardia* (Goodfellow *et al.* 2012). Luego, se podría utilizar medios de cultivos específicos para actinobacterias diferentes al género *Streptomyces* sp., de modo de hacer una recuperación más diversa de este *phylum* (Tiwari y Gupta 2012).

**Objetivo específico 2. Evaluar antagonismo de actinobacterias endófitas de papa nativa (*S. tuberosum*) chilena frente a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*.**

Tanto, la técnica *cross strake*, como la técnica de difusión con discos de agar, resultaron en la selección de dos aislamientos antagonistas de *Pectobacterium*

*carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* *in vitro*, correspondientes a *Streptomyces* sp. A2R31 y *Streptomyces* sp. TP199.

*Streptomyces* sp. A2R31 y *Streptomyces* sp. TP199 formaron halos de inhibición de crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* a través de las dos técnicas mencionadas anteriormente, donde cabe mencionar que el tamaño del halo de inhibición es producto de la combinación de la bioactividad y propiedad de difusión de la molécula secretada por el antagonista en el medio de agar (Balouiri *et al.* 2016).

Para llevar a cabo ambas técnicas, fue necesario que los dos aislamientos de *Streptomyces* sp. crecieran hasta una etapa de esporulación, ya que de acuerdo al ciclo de crecimiento de esta bacteria, la síntesis de metabolitos secundarios ocurre en concomitancia con la diferenciación del micelio aéreo, es decir, la esporulación (Flärdh y Buttner 2009).

En el caso de la técnica *cross strake*, *Streptomyces* sp. TP199 tuvo un efecto antagónico mayor (T-test,  $P \leq 0,05$ ) que *Streptomyces* sp. A2R31 contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* de acuerdo a los halos de inhibición medidos, sin embargo, a través de esta técnica no hay una estandarización de las concentraciones iniciales de los antagonistas y de los patógenos, por lo tanto, sólo se considera una evidencia preliminar los resultados obtenidos a través de este método, respecto al desempeño de la actividad antimicrobiana.

En el caso de los resultados obtenidos por la técnica de difusión en agar, tanto *Streptomyces* sp. TP199 como *Streptomyces* sp. A2R31 tuvieron un mayor efecto antagonista (T-test,  $P \leq 0,05$ ) contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, que contra *Pectobacterium atrosepticum*, sin embargo, habría que conocer cuál es el metabolito activo que está siendo secretado por los antagonistas, cual es la propiedad de difusión de este metabolito activo en el

medio de agar y a que concentración se encuentra, para categorizar el potencial antagonista de los aislamientos de *Streptomyces* sp., o la susceptibilidad de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y de *Pectobacterium atrosepticum*, así como también respecto al efecto de la Ampicilina, ya que no es posible cuantificar la cantidad del agente antimicrobiano que está difundiendo en el medio de agar (Balouiri *et al.* 2016).

Aislamientos pertenecientes al género *Streptomyces* spp. ya han sido reportados como antagonistas de *Pectobacterium* spp. a través de técnicas de evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro*, por ejemplo, Abdalla *et al.* (2013) seleccionaron dos aislamientos de *Streptomyces* sp. que inhibieron el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* *in vitro* con halos de inhibición mayores a 25 mm, mientras que Baz *et al.* (2011), también reportó cuatro aislamientos de *Streptomyces* spp. que inhibieron el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* con rangos de halos de inhibición de 11 a 27,33 mm, y anteriormente El Karkouri *et al.* (2010) reportó 13 aislamientos de actinobacterias con actividad antagonica frente a *Erwinia chrysanthemi* 3937VIII, el cual también es un fitopatógeno causante de pudrición blanda, donde destacó los resultados obtenidos con un aislamiento de *Streptomyces cinereoruber* para su evaluación como biocontrolador. En consecuencia, estas técnicas permiten realizar una selección cualitativa de microorganismos con actividad antagonista contra ciertos patógenos de interés, como se ha usado en el área agronómica para la selección de potenciales agentes de control biológico (Misk y Franco 2011, Kaur *et al.* 2013, Medina *et al.* 2013, Mingma *et al.* 2014, Singh y Gaur 2016).

Donde además varios reportes científicos sustentan el estudio de actinobacterias como potenciales agentes de biocontrol (Qin *et al.* 2011), de hecho ya hay productos comerciales basados en actinobacterias, tales como Actino-Iron (*Streptomyces lydicus* cepa WYEC108) y Mycostop (*Streptomyces griseoviridis* cepa K61) que se utilizan como fungicidas biológicos (Shimizu 2011).

Por otro lado, la selección de antagonistas a través de estas técnicas también se ha utilizado para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos de interés farmacéutico (Gouda *et al.* 2016), que requieren la obtención de extractos concentrados y la separación de compuestos según la naturaleza química de éstos, donde actinobacterias endófitas han sido blancos de investigación (Abdalla *et al.* 2014, Baba *et al.* 2015).

Luego, respecto a la evaluación de antagonismo de los sobrenadantes de los cultivos de actinobacterias en ISP1, en pocillos en agar y en discos de papel, que no resultaron en la formación de halos de inhibición de crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* o *Pectobacterium atrosepticum*, se podría deber a que sea necesario realizar extractos concentrados de la producción de metabolitos secundarios de estas actinobacterias en cultivo líquido, para evaluar su efecto en el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*, tal como lo reportaron Elleuch *et al.* (2009), quienes realizaron una extracción de metabolitos secundarios bioactivos de un cultivo de un aislamiento de *Streptomyces* spp. donde diferenciaron 8 compuestos de naturaleza polar con actividad antimicrobiana, mientras que 3 metabolitos se detectaron de la fracción apolar del extracto.

Además, se podría considerar la posibilidad de que la síntesis de compuestos antimicrobianos detectada para *Streptomyces* sp. TP199 y *Streptomyces* sp. A2R31 sea inducida por la presencia del patógeno en el medio y por esta razón en la evaluación del sobrenadante de los cultivos de actinobacterias no se observó actividad antimicrobiana contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*, de hecho se ha reportado la inducción de metabolitos secundarios en condiciones de co-cultivos microbianos (Bertrand *et al.* 2014) como lo reportado por Slattery *et al.* (2001), quienes comprobaron que se indujo la síntesis de istamicina por un aislamiento marino de *Streptomyces tenjimariensis* en condiciones de co-cultivo, y bajo la misma premisa Wu *et al.*

(2015) encontraron una correlación en la obtención de ciertos metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces coelicolor* y *Aspergillus niger*. Por lo tanto, en consideración con la ecología de los microorganismos en el ambiente donde se encuentran co-existiendo comunidades microbianas mixtas desde el punto de vista taxonómico (Bertrand *et al.* 2014, Marmann *et al.* 2014), es posible plantear la hipótesis de que la actividad antagónica de *Streptomyces* sp. TP199 y *Streptomyces* sp. A2R31 esté condicionada por la presencia y contacto con el patógeno.

Para complementar los resultados de antagonismo *in vitro*, *Streptomyces* sp. TP199 y *Streptomyces* sp. A2R31 fueron evaluados respecto a su habilidad para disminuir la maceración de tubérculos de papa Pukará-INIA inoculados con *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*, donde se observó que sólo el aislamiento *Streptomyces* sp. TP199 redujo significativamente (T-test,  $P \leq 0,05$ ) la maceración de los tubérculos respecto a lo observado tras la inoculación de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* sólo. Este resultado podría ser explicado por los resultados de antagonismo *in vitro*, ya que el efecto protector de *Streptomyces* sp. TP199 podría ser consecuencia de la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*. Ahora bien, en el caso de *Streptomyces* sp. A2R31 no se vio el mismo efecto al ser evaluados en laminas de tubérculos, lo cual podría estar relacionado al tiempo de inoculación del antagonista respecto al patógeno, ya que según lo reportado por Baz *et al.* (2012), un aislamiento de *Streptomyces* sp. fue capaz de reducir la severidad de los síntomas de pudrición en plantas y en tubérculos, en un rango de 65 – 95% al ser inoculado 24 h antes que los patógenos *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*.

Para profundizar en la naturaleza del efecto inhibitorio (bactericida o bacteriostático) de un agente antimicrobiano, metodologías de citometría de flujo y

pruebas de cinéticas de muerte, generan información que discriminen este efecto, sin embargo, estas pruebas se han estandarizado para estudiar compuestos puros o extractos (Balouiri *et al.* 2016). En el caso del método de la curva de muerte (*Time-kill test/ time-kill curve*), es posible estudiar la dinámica de la interacción del agente microbiano y el microorganismo, revelando la dependencia del tiempo y de la concentración del efecto del compuesto en estudio (Pfaller *et al.* 2004). Ahora bien, como en el caso de *Streptomyces* sp. TP199 se observó un efecto inhibitorio sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*, y también, sobre la maceración en el tubérculo. Se seleccionó este aislamiento para evaluar el efecto de *Streptomyces* sp. TP199 sobre la cinética de crecimiento de *Pectobacterium atrosepticum*, ya que en el caso de un efecto bactericida se habría logrado obtener una curva de muerte. Por lo tanto, se realizó un co-cultivo de *Streptomyces* sp. TP199 y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* considerando los trabajos realizados en co-cultivos para el estudio de metabolitos secundarios (Maisuria *et al.* 2015, Wu *et al.* 2015) y se realizó recuento de colonias (ufc), según lo recomendado para el análisis de curvas de muerte, ya que es fácilmente distinguible la morfología de las colonias de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* comparadas con *Streptomyces* sp. TP199 y se comparó los parámetros cinéticos de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* creciendo sólo y en co-cultivo. Lo cual resultó en que *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* generó cinéticas de crecimientos donde en cocultivo presentó una mayor (T-test,  $P \leq 0,05$ ) tasa de crecimiento (parámetro  $\mu$ ) durante su fase exponencial y también tuvo un mayor (T-test,  $P \leq 0,05$ ) recuento bacteriano en fase estacionaria, respecto a su crecimiento sólo, por lo tanto, *Streptomyces* sp. TP199 no tuvo un efecto bactericida ni bacteriostático sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* al crecer juntos en medio líquido, sin embargo, para este tipo de análisis sería necesario estandarizar las condiciones óptimas de los inóculos de partida, el medio de cultivo, los volúmenes transferidos y la agitación del cultivo para asegurar un contacto óptimo entre el antagonista y el microorganismo blanco que se desea evaluar, considerando además que el caso de este trabajo, se

evaluó una bacteria filamentosa aeróbica junto a un bacilo anaeróbico facultativo (Pfaller *et al.* 2004, Bertrand *et al.* 2014).

Finalmente si *Streptomyces* sp. TP199 fue capaz de disminuir el efecto de la maceración sobre el tubérculo de papa Pukará-INIA, aunque en co-cultivo no mostró un efecto bactericida ni bacteriostático sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, sería importante considerar el efecto sobre la virulencia del patógeno, donde trabajos como los realizados por Yung *et al.* (2000), Dong *et al.* (2004) y Maisuria y Nerurkar (2015) demuestran que es posible disminuir la virulencia del patógeno a través de la interrupción de señales de comunicación que regulan la síntesis de enzimas pectinolíticas a nivel transcripcional, en diferentes cepas de *Pectobacterium* spp. donde ya existe el reporte de un aislamiento de *Streptomyces* sp. endófito putativo que actúa a través de este mecanismo (Chankhamhamhaengdecha *et al.* 2013).

**Objetivo específico 3. Determinar la capacidad de colonización de actinobacterias endófitas de papa (*S. tuberosum*) nativa chilena en el rizoplano y la endoriza de papa (*S. tuberosum*) Pukará-INIA.**

Se ha demostrado que patógenos como *Pectobacterium* spp, son capaces de infectar la planta hospedera (Czakowski *et al.* 2009, Kubheka *et al.* 2013, Gorshkov *et al.* 2016), y proliferar por los tejidos vasculares de la planta, donde podría mantenerse en forma latente (Eljounaidi *et al.* 2016). Considerando que no existe un tratamiento eficaz para curar una planta infectada, el uso de endófitos resulta atractivo como potenciales agentes de biocontrol considerando que pueden colonizar el mismo nicho ecológico que estos patógenos podrían usar como reservorio (Eljounaidi *et al.* 2016).

Por lo tanto, se estudió la capacidad de *Streptomyces* sp. TP199 para colonizar la rizodermis y endoriza de papa Pukará-INIA a través de la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Esta técnica molecular (FISH) requiere la utilización de oligonucleótidos marcados con un fluoroforo a los cuales se les denomina sonda y que están diseñados para que puedan hibridar con RNA ribosomal, de este modo permiten la identificación de microorganismos en muestras ambientales (Pernthaler y Pernthaler 2007), ahora bien, por esta misma característica tiene la restricción de que si los microorganismos tienen un bajo número de ribosomas por célula o se encuentran a una baja concentración celular, la intensidad de la fluorescencia podría no ser detectada por el microscopio utilizado (Pernthaler y Pernthaler 2007, Stoecker *et al.* 2009). El DOPE-FISH corresponde a la misma técnica, pero con la modificación de que la sonda que se utilice corresponde a una secuencia de un oligonucleotido unido a ambos extremos (5' y 3') con el fluoroforo seleccionado, lo cual fue probado con el objetivo de mejorar la intensidad de la señal fluorescente (Stoecker *et al.* 2009).

La combinación de la utilización de DOPE-FISH con el uso de microscopía de laser confocal (CLSM) ha facilitado la exploración de micro-habitats y ha permitido la observación de microorganismos asociados a su hospedero *in situ* con una excelente precisión (Cardinale *et al.* 2014).

En este trabajo se uso la sonda HGC69a diseñada por Roller *et al.* (1994) donde se valida la especificidad para el *phylum* Actinobacteria, la cual se unió al fluoroforo Cy5 en los extremos 3' y 5' de la secuencia, ya que este fluoroforo es excitado dentro del espectro (625 – 650 nm) donde el tejido radicular mostró una menor autofluorescencia, específicamente con el laser de 633 nm, como tambien lo utilizaron Watt *et al.* (2005) en raíces de trigo para detectar *Pseudomonas* y bacterias filamentosas y Toumatia *et al.* (2016), tambien en trigo, pero para detectar *Streptomyces muatbilis* IA1.

Igualmente se uso la propiedad de autofluorescencia del tejido radicular, que está dada por compuestos fenolicos, suberina y celulosa, que permiten diferenciar las paredes celulares vegetales (Cardinale *et al.* 2014), lo cual permitió interpretar la colonización de *Streptomyces* sp. TP199 en la raíz de papa Pukará-INIA.

En este trabajo, se montó un ensayo con plantas provenientes de esquejes que se mantuvieron en un sustrato estéril para evitar contaminación con otros microorganismos, de modo que se usaron plantas de papa pukará-INIA que no fueron inoculadas con *Streptomyces* sp. TP199 como control, para comparar con la detección en muestras de raíces de plantas de papa pukará-INIA que si fueron inoculadas.

En consecuencia se visualizó la presencia de *Streptomyces* sp. TP199 en la zona pilífera de la raíz, donde la fluorescencia de la sonda HGC69a podría corresponder a agregados de esporas en germinación adheridas en una primera etapa de colonización sobre la rizodermis, ya que no se diferenció un patrón espacial de colonización, por lo tanto luego de 3 días de la inoculación, las esporas inoculadas fueron capaces de adherirse a las células rizodermicas, lo cual es comparable a los resultados de *Toumatia et al.* (2016) quienes observaron la colonización de *Streptomyces mutabilis* IA1 despues de 10 días desde la inoculación en semillas de trigo, donde la zona de los pelos radicales mostró una mayor colonización, mientras que en las zonas de emergencia de pelos radicales y en la zona apical, no se observó el mismo comportamiento.

Posteriormente, luego de 10 días desde la inoculación, *Streptomyces* sp. TP199 fue capaz de ingresar al cilindro central de la raíz donde se observó una mayor fluorescencia en la zona de emergencia de un pelo radical y tambien en la zona de los haces vasculares, mientras que en los resultados de *Toumatia et al.* (2016) con una cepa de *Streptomyces* sp. se pudo diferenciar la colonización en la endodermis, corteza y en haces vasculares de la raíz de trigo.

En el caso del trabajo realizado por Compant *et al.* (2013), estudiaron la colonización de una actinobacteria correspondiente a *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 en raíces de vid, e igualmente identificaron los mismo puntos de colonización de este trabajo, con la diferencia que lograron diferenciar filamentos y esporas en los tejidos después de 10 días desde la inoculación al igual que Chen *et al.* (2016), quienes estudiaron la colonización de Streptomycetes en lechuga.

Respecto al modo de inoculación de las plantas, Bonaldi *et al.* (2015) diferenciaron que al añadir el inóculo al sustrato, no se visualizó la colonización de la endosfera de raíces de lechuga, mientras que al inocular las semillas de la planta, posteriormente permitió visualizar el aislamiento de *Streptomyces* sp como endófito. Por lo tanto, para los resultados de este trabajo, la inoculación de las raíces de papa pukará-INIA pudo determinar que *Streptomyces* sp TP199 fuese capaz de ingresar a la endoriza.

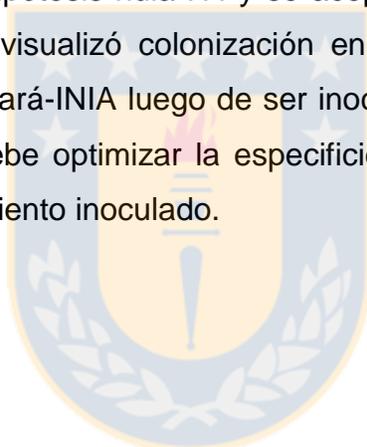
Por lo tanto, el aislamiento *Streptomyces* sp. TP199 podría comportarse como un endófito de papa Pukará-INIA. Sin embargo, se debe mejorar la evaluación de colonización realizando un DOPE-FISH con una sonda diseñada a nivel de cepa para mejorar la especificidad o realizar un marcaje a través de la proteína fluorescente verde (GFP) (Krzyzanowska *et al.* 2012, Cardinale *et al.* 2014, Bonaldi *et al.* 2015).

## 5. CONCLUSIONES

Se rechazó la hipótesis nula H0, por lo tanto, se aceptó la hipótesis alternativa H1, es decir, que *Solanum tuberosum* L. nativa chilena contiene actinobacterias endófitas.

Luego, se rechazó la hipótesis nula H2 y se aceptó la hipótesis alternativa H3, ya que se demostró que dos aislamientos de actinobacterias endófitas de *Solanum tuberosum* L. nativa chilena poseen actividad antagónica *in vitro* frente a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum*.

Finalmente se rechazó la hipótesis nula H4 y se aceptó parcialmente la hipótesis alternativa H5, ya que se visualizó colonización en el rizoplaneo y endoriza de *Solanum tuberosum* cv Pukará-INIA luego de ser inoculado con *Streptomyces* sp. TP199, sin embargo, se debe optimizar la especificidad de la sonda marcada a nivel de cepa para el aislamiento inoculado.



## 6. PROYECCIONES

El presente trabajo se proyecta para continuar con las evaluaciones de efecto protector de aislamientos de actinobacterias endófitas putativas en plantas que no hayan mostrado actividad antagónica *in vitro*, pero que podrían actuar a través de otros mecanismos *in vivo*.

Además, se proyecta continuar el estudio de colonización de endófitos en plantas inoculadas, para determinar si son capaces de colonizar sistemáticamente las plantas, si permanecen a lo largo de las diferentes etapas fisiológicas del ciclo de vida de las plantas y si los endófitos son transmitidos a la progenie.



## 7. REFERENCIAS

Abdalla, M. Matasyoh, J. 2014. Endophytes as producers of peptides: An overview about the recently discovered peptides from endophytic microbes. *Nat. Prod. Bioprospect.* **4**: 257 – 270.

Abreu – Tarazi, M. Navarrete, A. Andreote, F. Almeida, C. Tsai, S. Almeida, M. 2010. Endophytic bacteria in long – term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World J Microbiol Biotechnol.* **26** : 555 – 560.

Acuña, I. Cadiz, F. 2012. Pie negro y pudriciones blandas de papa. Informativo INIA Remehue. 4 p.

Alain, K. Querellou, J. 2009. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles.* **13**: 583 – 594.

Andreote, F. Azevedo, J. Araújo, W. 2009. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Brazilian Journal of Microbiology.* **40**: 417 – 432.

Andreote, F. da Rocha, U. Araújo, W. Azevedo, J. van Overbeek, L. 2010. Effect of bacterial inoculation, plant developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie van Leeuwenhouek.* **97**: 389 – 399.

Andrews, M. Hodge, S. Raven, J. 2010. Positive plant microbial interactions. *Annals of Applied Biology.* **157**: 317 – 320.

Armanda, E. Probanza, A. Roldán, A. Azcón, R. 2016. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. *Journal of Plant Physiology.* **192**: 1 – 12.

Bais, H. Weir, T. Perry, L. Gilroy, S. Vivanco. J. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* **57**: 233 – 266.

Balouiri, M. Sadiki, M. Ibsouda, S. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* **6**: 71 – 79.

Balsanelli, E. Serrato, R. de Baura, V. Sasaki, G. Yates, M. Rigo, L. Pedrosa, F. de Souza, E. Monteiro, R. 2010. *Herbaspirillum seropedicae* *rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. *Environmental Microbiology.* **12** (8): 2233 – 2244.

Barakate, M. Ouhdouch, Y. Oufdou, K. Beaulieu, C. 2002. Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* **18**: 49 – 54.

Barka, E. Vatsa, P. Sanchez, L. Gaveau-Vaillant, N. Jacquard, C. Klenk, H. Clément, C. Ouhdouch, Y. van Wezel, G. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **80**: 1 – 43.

Barrow, J. Lucero, M. Reyes – Vera, I. Havstad, K. 2008. Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress?. *Com Integr Biol.* **1**: 69 – 73.

Baz, M. Lahbabi, D. Samri, S. Val, F. Hamelin, G. et al. 2012a. Control of potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* by Moroccan actinobacteria isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **28**: 303 – 311

Baz, M. Tran, D. Kettani-Halabi, M- Samri, S. Jamjari, A. Biligui, B. Meimoun, P. El-Maarouf-Bouteau, H. Garmier, M. Saindrenan, P. Ennaji, M. Barakate, M. Bouteau, F. 2012. Calcium- and ROS-mediated defence responses in BY2 tobacco cells by nonpathogenic *Streptomyces* sp. *Journal of Applied Microbiology*. **112**: 782 – 792.

Berdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. Review. *The Journal of Antibiotics*. **58** (1): 1 – 26.

Berendsen, R. Pieterse, C. Bakker, P. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. **17** (8): 478 – 486.

Berg, G. Grube, M. Schloter, M. Smalla, K. 2014. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*. **5** (148): 1 – 7.

Berlec, A. 2012. Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: search for plant probiotics. *Plant Science*. 193 – 194: 96 – 102.

Bhattacharyya, P. Jha, D. 2012. Plant growth – promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agricultura. *World J Microbiol Biotechnol*. **28**: 1327 – 1350.

Blaszezak, W. Chrzanowska, M. Fornal, J. Zimnoch – Guzowska, E. Palacios, M. Vacek, J. 2005. Scanning electron microscopic investigation of different types of necroses in potato tubers. *Food Control*. **16**: 747 – 752.

Böhm, M. Hurek, T. Reinhold – Hurek, B. 2007. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N<sub>2</sub> fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular Plant – Microbe Interactions*. **20** (5): 526 – 533.

Botta, A. Santacecilia, A. Ercole, C. Cacchio, P. Del Gallo, M. 2013. *In vitro* and *in vivo* inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. *New Biotechnology*. **30** (6): 666 – 674.

Bowden, S. Eyres, S. Chung, J. Monson, R. Thompson, A. Salmond, G. Spring, D. Welch, M. 2013. Virulence in *Pectobacterium atrosepticum* is regulated by a coincidence circuit involving quórum sensing and the stress alarmone, (p)ppGpp. *Molecular Microbiology*. **90** (3): 457 – 471.

Bulgarelli, D. Schlaeppi, K. Spaepen, S. van Themaat, E. Schulze – Lefert, P. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 64: 807 – 838.

Buschart, A. Sachs, S. Chen, X. Herglotz, J. Krause, A. Reinhold – Hurek, B. 2012. Flagella mediate endophytic competence rather than act as MAMPs in rice – *Azoarcus* sp. strain BH72 interactions. *Molecular Plant – Microbe Interactions*. **25** (2): 191 – 199.

Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. New York, USA. 2 pp.

Cardinale, M. 2014 Scanning a microhabitat: plant – microbe interactions revealed by confocal laser microscopy. *Frontiers in Microbiology*. **5** (94): 1 – 10.

Castiblanco, L. Sundin, G. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*. **58** (4): 362 – 372.

Castro, I. Contreras, A. 2011. Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa. Imprenta Austral, Valdivia – Chile. 72 p.

Cirou, A. Mondy, S. An, S. Charrier, A. Sarrazin, A. Thoison, O. Dubow, M. Faure, D. 2012. Efficient biostimulation of native and introduced quórum quenching *Rhodococcus erythropolis* populations is revealed by a combination of analytical

chemistry, microbiology and pyrosequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **78** (2): 481 – 492.

Cole, J. Chai, B. Farris, R. Wang, Q. Kulam, S. McGarell, D. Garrity, G. Tiedje, J. 2005. The ribosomal database Project (RDP – II): sequences and tools for high – throughput rRNA analysis. *Nucleic Acid Research.* **33**: 294 – 296.

Compant, S. Clément, C. Sessitsch, A. 2010. Plant growth – promoting bacteria in the rhizo – and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry.* **42**: 669 – 678.

Compant, S. Duffy, B. Nowak, J. Clément, C. Barka, E. 2005. Use of plant growth – promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanism of action and future prospects. Minireview. *Applied and Environmental Microbiology.* **71**(9): 4951 – 4959.

Compant, S. Mitter, B. Colli – Mull, J. Gangel, H. Sessitsch, A. 2011. Endophytes of grapevine flowers, berries and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts and visualization of niches of colonization. *Microb Ecol.* **62**: 188 – 197.

Compant, S. Muzammil, S. Lebrhi, A. Mathieu, F. 2013. Visualization of grapevine root colonization by the Saharan soil isolate *Saccharothrix algeriensis* NRRL B – 24137 using DOPE – FISH microscopy. *Plant Soil.* **370**: 583 – 591.

Coomb, J. Franco, C. 2003. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. *Applied and Environmental Microbiology.* **69** (7): 4260 – 4262.

Cubitt, M. Hedley, P. Williamson, N. Morris, J. Campbell, E. Toth, I. Salmond, P. 2013. A metabolic regulator modulates virulence and quórum sensing signal

production in *Pectobacterium atrosepticum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **26** (3): 356 – 366.

Czajkoswki, R. Pérombelon, M. van Veen, J. van der Wolf, J. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*. **60**(6): 999 – 1013.

Czajkowski, R. Grabe, G. van der Wolf, J. 2009. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *Eur J Plant Pathol*. **125**: 263 – 275.

Chankhamhamhaengdecha, S. Hongvijit, S. Srichaisupakit, A. Charnchai, P. Panbangred, W. 2013. Endophytic actinomycetes: a novel source of potential acyl homoserine lactone degrading enzymes. *BioMed Research International*. 2013: 1 – 8.

Charkowsky, A. 2008. The soft rot *Erwinia*. Gnanamanickam SS, ed. *Plant – Associated Bacteria*. Dordrecht, Netherlands. Springer. 423 – 505.

Danhorn, T. Fuqua, C. 2007. Biofilm formation by plant – associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*. **61**: 401 – 422.

Das, M. Royer, T. Leff, L. 2007. Diversity of Fungi, Bacteria, and Actinomycetes on Leaves Decomposing in a Stream. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(3): 756-767.

De Oliveira, M. Da Silva, M. Der Sand, S. 2010. Anti – phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18 (6), a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology*. **161**: 565 – 572.

Dejonghe, W. Boon, N. Seghers, D. Top, E. Verstraete, W. 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environmental Microbiology*. **3** (10): 649 – 657.

Dörr, J. Hurek, T. Reinhold – Hurek, B. 1998. Type IV pili are involved in plant – microbe and fungus – microbe interactions. *Molecular Microbiology*. **30** (1): 7 – 17.

Duijff, B. Gianinazzi – Pearson, V. Lemanceau, P. 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytologist*. **135**: 325 – 334.

El – Tarabily, K. 2003. An endophytic chitinase – producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. *Australian Journal of Botany*. **51**: 257 – 266.

El – Tarabily, K. Sivasithamparam, K. 2006. Non – Streptomyces actinomycetes as biocontrol agents of soil borne fungal pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology & Biochemistry*. **38**: 1505 – 1520.

El Karkouri, A. El Hassani, Z. El Mzibri, M. Benlemlih, M. El Hassouni, M. 2010. Isolation and identification of an actinomycete strain with a biocontrol effect on the phytopathogenic *Erwinia chrysanthemi* 3937VIII responsible for soft rot disease. *Annals of Microbiology*. **60**: 263 – 268

Eljounaidi, K. Lee, S. Bae, H. 2016. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – review and future prospects. *Biological Control*. **103**: 62 – 68.

Errakhi, R. Lebrihi, A. Barakate, M. 2009. *In vitro* and *in vivo* antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium*

rolfsii: a causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Applied Microbiology*. **107**: 672 – 681.

Evangelista – Martínez, Z. 2013. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World J. Microbiol Biotechnol*. **30** (5): 1639 – 1647.

FAO. 2008. New light on a hidden treasure, International year of the potato 2008. Roma. 148 p.

FAO. 2015. Base de datos FAOSTAT

Fernández, K. Fernández, F. Rivera, R. Olalde, V. 2010. Micorrización *in vitro* e *in vivo* de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* var. Alfa). *Cultivos tropicales*. **31**(2): 21 – 33.

Filippova, S. Surgucheva, N. Gal'chenko, V. 2012. Long – term storage of collection cultures of actinobacteria. *Microbiology*. **81** (5): 630 – 637.

Firáková, S. Sturdíková, M. Múcková, M. 2007. Bioactives secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biología*. **62** (3): 251 – 257.

Flärdh, K. Buttner, M. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews* **7**: 36 – 49.

Franco-Correa, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetes e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Departamento de Microbiología de Suelo y Sistemas Simbióticos. Granada, España. 261 p.

Garbeva, P. van Overbeek, L. van Vuurde, J. van Elsas, J. 2001. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rRNA based PCR fragments. *Microb. Ecol.* **41**: 369 – 383.

Goodfellow, M. Kämpfer, P. Busse, H. Trujillo, M. Suzuki, K. Ludwig, W. Whitman, W. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 5: The Actinobacteria. 2th ed. Springer. 2106 p.

Gopalakrishnan, S. Humayun, P. Vadlamudi, S. Vijayabharathi, R. Bhimineni, R. Rupela, O. 2012. Plant growth – promoting traits of *Streptomyces* with biocontrol potential isolated from herbal vermicompost. *Biocontrol Science and Technology*. **22** (10): 1199 – 1210.

Gorshkov, V. Daminova, A. 1, Mikshina, P. Petrova, O. Ageeva, M. Salnikov, V. Gorshkova, T. Gogolev, Y. 2016. Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels – a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Biology*. **18**: 609 – 617.

Gouda, S. Das, G. Sen, S. Shin, H. Patra, J. 2016. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology*. **7** (1538): 1 – 8.

Grebeyohannes, G. Moges, F. Sahile, S. Raja, N. 2013. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **3** (6): 426 – 435.

Guo, L. Custers, J. Zhang, L. 2010. Characterization of calla lily soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ZT0505: bacterial growth and

péctate lyase activity under different conditions. *Journal of Plant Pathology*. **92** (2): 421 – 428.

Guttman, D. McHardy, A. Schulze-Lefert, P. 2014. Microbial genome-enabled insights into plant-microorganism interactions. *Nature Review Genetics*. **15** (12): 797 – 813.

Hallman, J. Berg, G. 2006. Spectrum and populations dynamics of bacterial root endophytes. *Soil Biology*. **9**: 15 – 31.

Hallmann, J. Quadt – Hallmann, A. Mahaffee, W. Kloeper, J. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Review. *Canadian Journal of Microbiology*. **43**: 895 – 914.

Hardoim, P. Overbeek, L. Berg, G. Pirttilä, A. Compant, S. Campisano, A. Döring, M. Sessitsch, A. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **79** (3): 293 – 320.

Hardoim, P. van Overbeek, L. van Elsas, J. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*. **16** (10): 463 – 471

Hauben, L. Moore, E. Vauterin, L. Steenackers, M. Mergaert, J. Verdonck, L. Swing, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogenes within the *Enterobacteriaceae*. *Systematic and Applied Microbiology*. **21**: 384 – 397.

Hayakawa, M. Nonomura, H. 1987. Humic Acid – Vitamin Agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65** (5): 501 – 509.

Heuer, H. Krsek, M. Baker, P. Smalla, K. Wellington, E. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8): 3233-3241.

Inceoglu, O. Al-Soud, W. Salles, J. Semenov, A. van Elsas, J. 2011. Comparative analysis of bacterial communities in a potato field as determined by pyrosequencing. *Plos One*. **6** (8): e23321.

Jafra, S. Przysowa, J. Czajkowski, R. Michta, A. Garbeva, P. van der Wolf, J. 2006. Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N – acyl – homoserine lactone. *Can J Microbiol*. **52**: 1006 – 1015.

Jones, J. Dangl, J. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444: 323 – 329.

Kado, C. 1992. Plant pathogenic bacteria. In: Balows, A. Balows, H. Truper, M. Dworkin, H. et al. *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, New York. 660–662 pp.

Kaewkla, O. Franco, C. 2013. Rational approaches to improve the isolation of endophytic actinobacteria from australian native trees. *Microbial Ecology*. **65**:384 – 393.

Kafur, A. Khan, A. 2011. Isolation of endophytic actinomycetes from *Catharanthes roseus* (L.) G. Don leaves and their antimicrobial activity. *Iranian Journal of Biotechnology*. **9** (4): 302 – 306.

Kamilova, F. Leveau, J. Lugtenberg, B. 2007. *Collimonas fungivorans*, an unpredicted in vitro but efficient in vivo biocontrol agent for the suppression of tomato foot and root rot. *Environmental Microbiology*. **9** (6): 1597 – 1603.

Kamilova, F. Validov, S. Azarova, T. Mulders, I. Lugtenberg, B. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental Microbiology*. **7** (11): 1809 – 1817.

Kaur, T. Sharma, D. Kaur, A. Manhas, K. 2013. Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. **46** (14): 1756 – 1768.

Kobayashi, A. Kobayashi, Y. Someya, N. Ikeda, S. 2015. Community analysis of root – and tuber – associated bacteria in field – grown potato plants harboring different resistance levels against common scab. *Microbes Environ*. **30** (4): 301 – 309.

Köberl, M. Ramadan, E. Adam, M. Cardinale, M. Hallmann, J. Heuer, H. Smalla, K. Berg, G. 2013. *Bacillus* and *Streptomyces* were selected as broad – spectrum antagonists against soilborne pathogens from arid areas in Egypt. *FEMS Microbiol Letter* **342** (2): 168 – 178.

Kogel, K. Franken, P. Hüchelhoven, R. 2006. Endophyte or parasite – what decides?. *Current Opinion in Plant Biology*. **9**: 358 – 363.

Koiv, V. Roosaare, M. Vedler, E. Kivistik, P. Toppi, K. Schryer, D. Remm, M. Tenson, T. Mäe, A. 2015. Microbial population dynamics in response to *Pectobacterium atrosepticum* infection in potato tubers. *Nature. Sci Rep*. **5**: 11606

Krechel, A. Faupel, A. Hallmann, J. Ulrich, A. Berg, G. 2002. Potato – associated bacteria and their antagonistic potential towards plant – pathogenic fungi and the plant – parasitic nematode *Meleiodogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Can J. Microbiol*. **48**: 772 – 786.

Krzyzanowska, D. Potrykus, M. Golanowska, M. Polonis, K. Gwizdek – Wisniewska, A. Lojkowska, E. Jafra, S. 2012. Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. Strains. *Journal of Plant Pathology*. **94** (2): 367 – 378.

Kubheka, G. Coutinho, T. Moleleki, N. Moleleki, L. 2013. Colonization patterns of an mCherry-tagged *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain in potato plants. *Genetic and Resistance*. **103** (12): 1268 – 1279.

Kumar, D. Shivay, S. Dhar, S. Kumar, C. Prasad, R. 2013. Rhizospheric flora and the influence of agronomic practices on them: a review. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: *Biological Sciences*. **81**(1): 1 – 14.

Kumar, V. Bharti, A. Gusain, O. Bisht, G. 2010. An improved method for isolation of genomic DNA from filamentous actinomycetes. *Journal of Sci. Engg. & Tech. Mgt*. **2** (2): 10 – 15.

Lai, K. Chen, S. Hu, M. Hu, Q. Geng, P. Weng, Q. Jia, J. 2012. Control of postharvest green mold of citrus fruit by application of endophytic *Paenibacillus polymyxa* strain SG – 6. *Postharvest Biology and Technology*. **69**: 40 – 48.

Lambers, H. Mougel, C. Jaillard, B. Hinsinger, P. 2009. Plant – microbe – soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant Soil* **321**: 83 – 115.

Lee, D. Lim, J. Lee, J. Roh, E. Jung, K. Choi, M. Oh, C. Ryu, S. Yun, J. Heu, S. 2013. Characterization of genes required for the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 in Chinese cabbage. *Microbiology*. **159**: 1487 – 1496.

Li, Q. Chen, X. Jiang, Y. Jiang, C. 2016. In: Actinobacteria – Basics and Biotechnological Applications. Chapter: Morphological Identification of Actinobacteria. 28 p.

Lin, L. Ge, H. Yan, T. Qin, Y. Tan, R. 2012. Thaxtomin A – deficient endophytic *Streptomyces* sp. enhances plant disease resistance to pathogenic *Streptomyces scabies*. *Planta* **236**: 1849 – 1861.

Lugtenberg, B. Kamilova, F. 2009. Plant growth promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 541 – 556.

Lundberg, D. Lebeis, S. Paredes, S. Yourstone, S. Gehring, J. Malfatti, S. Tremblay, J. Engelbrekton, A. Kunin, V. del Rio, T. Edgar, R. Eickhorst, T. Ley, R. Hugenholtz, P. Tringe, S. Dangl, J. 2012. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*. **488**: 86 – 94.

Manter, K. Delgado, J. Holm, D. Stong, R. 2010. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar – specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microb Ecol.* **60**: 157 – 166.

Mantsebo, C. Mazarura, U. Goss, M. Ngadze, E. 2014. The epidemiology of *Pectobacterium* and *Dickeya* species and the role of calcium in postharvest soft rot infection of potato (*Solanum tuberosum*) caused by the pathogens: A review. *African Journal of Agricultural Research.* **9** (19): 1509 – 1515.

Marques, J. da Silva, T. Vollu, R. Blank, A. Ding, G. Seldin, L. Smalla, K. 2014. Plant age and genotype affect the bacterial community composition in the tuber rhizosphere of field – grown sweet potato plants. *FEMS Microbiol Ecol.* **88**: 424 – 435.

Martínez – Hidalgo, P. García, J. Pozo, J. 2015. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. *Frontiers in Microbiology*. **922** (6): 1 – 11.

Marzorati, M. Wittebolle, L. Boon, N. Daffonchio, D. Verstraete, W. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*. **10** (6): 1571 – 1581.

Medina, M. Morales, G. Castillo, F. Fuente, Y. Olivas, A. 2013. Antagonistic actinomycetes against phytopathogenic fungi of agricultural importance. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* **4** (8): 1187 – 1196.

Mercado – Blanco, J. Prieto, P. 2012. Bacterial endophytes and root hairs. *Plant soil*. **321**: 301 – 306.

Mingma, R. Pathom – Aree, W. Trakulnaleamsai, S. Thamchaipenet, A. Duangmal, K. 2014. Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from *Leguminosae* plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *glycine*. *World J Microbiol Biotechnol* **3**: 271 – 280.

Misk, A. Franco, C. 2011. Biocontrol of chickpea root rot using endophytic actinobacteria. *Biocontrol*. **56**: 811 – 822.

Muyzer, G. de Waal, E. Uitterlinden, A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(3): 695-700.

Muyzer, G. Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 127–141.

Necha, R. Siddiqui, Z. 2013. Interactions of *Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovorum*, *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, and *Meloidogyne javanica* on the disease complex of carrot. *International Journal of Vegetable Science*. **19**: 403 – 411.

Newton, A. Fitt, B. Atkins, S. Walters, D. Daniell, T. 2010. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe – plant interactions. *Trends in Microbiology* **18**: 365 – 373.

Nimnoi, P. Pongsilp, N. Lumyong, S. 2010. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World J Microbiol Biotechnol*. **26**: 193 – 203.

Núñez – Colín, C. Escobedo – López, D. 2011. Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*. **22**(2): 415 – 427.

ODEPA, 2014. Cultivos anuales, superficie, producción y rendimientos.

Onkendi, E. Moleleki, L. 2014. Characterization of *Pectobacterium* subsp. *carotovorum* and *brasiliense* from diseased potatoes in Kenya. *Eur J Plant Pathology*. **139**: 557 – 566.

Oskay, M. 2009. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *African Journal of Biotechnology*. **8** (13): 3007 – 3017.

Oskay, M. Tamer, A. Azeri, C. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*. **3** (9): 441 – 446.

Overbeek, L. van Elsas, J. 2007. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiol Ecol.* **64**: 283 – 296.

Pageni, B. Lupwayi, N. Larney, F. Kawchuk, L. Gan, Y. 2013. Populations, diversity and identities of bacterial endophytes in potato (*Solanum tuberosum* L.) cropping systems. *Can. J. Plant Sci.* **93**: 1125 – 1142.

Pang, Y. Liu, X. Ma, Y. Chernin, L. Berg, G. Gao, K. 2009. Induction of systemic resistance, root colonization and biocontrol activities of the rhizospheric strain *Serratia plymuthica* are dependent on N-acyl homoserine lactones. *Eur J Plant Pathol.* **124**: 261 – 268.

Pérombelon, M. 2002. Potato disease caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology.* **51**: 1- 12.

Perombelon, M. van der Wolf, J. 2002. Methods for detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. Scottish Crop Research Institute. Scotland, UK. 82 p.

Pfeaur, J. 2015. El mercado de la papa en la temporada 2014/2015. ODEPA. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile. 17 p.

Podolich, O. Ardanov, P. Zaets, I. Pirttilä, A. Kozyrovska, N. 2015. Reviving of the endophytic bacterial community as a putative mechanism of plant resistance. *Plant Soil.* **388**: 367 – 377.

Pollumaa, L. Alamäe, T. Mäe, A. 2012. Quorum sensing and expression of virulence in *Pectobacteria*. *Sensors.* **12**: 3327 – 3349.

Poovarasan, S. Mohandas, S. Paneerselvam, P. Saritha, B. Ajay, K. 2013. Mycorrhizae colonizing actinomycetes promote plant growth and control bacterial blight disease of pomegranate (*Punica granatum* L. cv Bhagwa). *Crop Protection*. **53**: 175 – 181.

Qin, S. Li, J. Chen, H. Zhao, G. Zhu, W. Jiang, C. Xu, L. Li, W. 2009. Isolation, diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forest in Xishuangbanna, China. *Applied and Environmental Microbiology*. **75** (19): 6176 – 6186.

Qin, S. Xing, K. Jiang, J. Xu, L. Li, W. 2011. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant – associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. **89**: 457 – 473.

Raaijmakers, J. Paulitz, T. Steinberg, C. Alabouvette, C. Moëgne – Loccoz, Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*. **321**: 341 – 361.

Rastogi, G. Leveau, C. Leveu, J. 2013. New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiol Lett*. **348** (1): 1 – 10.

Rastogi, G. Sani, R. 2011. Molecular techniques to assess microbial community structure, function and dynamics in the environment. En: *Microbes and microbial technology, agricultural and environmental applications*. Ahmad, I. Ahmad, F. Pichtel, J. (eds). Springer Science+Business Media. USA. 57 p.

Reinhold – Hurek, B. Hurek, T. 2011. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*. **14**: 435 – 443

Reinhold – Hurek, B. Maes, T. Gemmer, S. Montagu, M. Hurek, T. 2006. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not cellulose metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular Plant – Microbe Interactions*. **19** (2): 181 – 188.

Ridout, M. Newcombe, G. 2016. Disease suppression in Winter wheat from novel symbiosis with forest fungi. *Fungal Ecology*. **20**: 40 – 48.

Roller, C. Wagner, M. Amann, R. Ludwing, W. Schleifer, K. 1994. In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*. **140**: 2849 – 2858.

Rosenblueth, M. Martínez – Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Review. *Molecular Plant – Microbe Interactions*. **19** (8): 827 – 837.

Santoyo, G. Moreno – Hagelsieb, G. Orozco – Mosqueda, M. Glick, B. 2016. Plant growth – promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*. **183**: 92 – 99.

Schindelin, J. Ruede, C. Hiner, M. Eliceiri, K. 2015. The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Dvelopment*. **82**: 518 – 529.

Sessitsch, A. Hardoim, S. Döring, J. Weilharter, A. Krause, A. Woyke, T. Mitter, B. Hauberg-Lotte, L. Friedrich, F. Rahalkar, M. Hurek, T. Sarkar, A. Bodrossy, L. van Overbeek, L. Brar, D. van Elsas, D. Reinhold-Hurek, B. 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant – Microbe Interactions*. **25** (1): 28 – 36.

Sessitsch, A. Reiter, B. Berg, G. 2004. Endophytic bacterial communities of field – grown potato plants and their plant – growth – promoting and antagonistic abilities. *Can. J. Microbiol.* **50**: 239 – 249.

Sessitsch, A. Reiter, B. Pfeifer, U. Wilhelm, E. 2002. Cultivation – independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and actinomycetes – specific PCR of 16S Rrna genes. *FEMS Microbiology Ecology*. **39**: 23 – 32.

Shade, A. Peter, H. Allison, S. Baho, D. Berga, M. Bürgmann, H. Huber, D. Langenheder, S. Lennon, J. Martiny, J. Matulich, K. Schmidt, T. Handelsman, J. 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology* **3** (417): 1 – 19.

Shewry, P. 2003. Tuber storage proteins, invited review. *Annals of Botany*. 91: 755 – 769.

Shiau, Y. Nalawade, S. Hsia, C. Mulabagal, V. Tsay, H. 2005. *In vitro* propagation of the chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl, from axenic nodal segments. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. **41**: 666 – 670.

Shimizu, M. 2011. In: Maheswari, D. (ed.) *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses Chapter 10; Endophytic actinomycetes: biocontrol agents and growth promoters*. Springer – Verlag. Berlin. 201 – 220 pp.

Shirling, E. Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces species*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **16** (3): 313 – 340.

Shrestha, A. Kim, E. Lim, C. Cho, S. Hur, J. Park, D. 2009. Biological control of soft rot on chinese cabbage using beneficial bacterial agents in greenhouse and field. *The Korean Journal of Pesticide Science*. **13** (4): 325 – 331.

Shutsrirung, A. Chromkaew, Y. Pathom-Aree, W. Choonluchanon, S. Boonkerd, N. 2013. Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern

Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity. *Soil Science and Plant Nutrition*. **59**: 322 – 330.

Singh y Gaur. 2016. Evaluation of antagonistic and plant growth promoting activities of chitinolytic endophytic actinomycetes associated with medicinal plants against *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Applied Microbiology*. **121**: 506 – 518.

Singh, B. Millard, P. Whiteley, A. Murrel, J. 2004. Unravelling rhizosphere – microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in Microbiology*. **12**(8): 386 – 393

Someya, N. Kobayashi, Y. Tsuda, S. Ikeda, S. 2013. Molecular characterization of the bacterial community in a potato phytosphere. *Microbes Environ*. **28** (3): 295 – 305.

Strobel, G. Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology reviews*. **6** (4): 491 – 502.

Sturtz, A. Christie, B. Matheson, B. 1998. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Can. J. Microbiol*. **44** : 162 – 167.

Sugathan, S. Manilal, A. Selvin, J. Idhayadhulla, A. Kumar, R. Panikkar, M. 2012. Evaluating the antagonistic potential of seaweed – associated marine bacteria collected from the southwest coast of India. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. **7** (7): 578 – 587.

Tan, H. Deng, Z. Cao, L. 2009. Isolation and characterization of actinomycetes from healthy goat faeces. *Letters in Applied Microbiology* **49**: 248-253.

Tapia, B. 2014. Boletín de la papa. ODEPA. 15 p.

Tarasova, N. Gorshkov, V. Petrova, O. Gogolev, Y. 2013. Potato signal molecules that activate pectate lyase synthesis in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043. *World J Microbiol Biotechnol* **29**: 1189 – 1196.

Tein, B. Kauer, K. Runno-Paurson, E. Eremeev, V. Luik, A. Selge, A. Loit, E. 2015. The potato tuber disease occurrence as affected by conventional and organic farming systems. *Am. J. Potato Res.* **92**: 662 – 672.

Tiwari, K. Gupta, R. 2012. Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. *Critical Reviews in Microbiology.* **39** (3): 1 – 39.

Toth, I. Bell, K. Holeva, M. Birch, P. 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology.* **4** (1): 17 – 30.

Turner, T. James, E. Poole, P. 2013. The plant microbiome. *Genome Biology.* **14** (209): 1 – 10.

Upreti, R. Thomas, P. 2015. Root – associated bacterial endophytes from *Ralstonia solanacearum* and susceptible tomato cultivars and their pathogen antagonistic effects. *Frontiers in Microbiology.* **6**: 255.

Vacheron, J. Desbrosses, G. Bouffaud, M. Touraine, B. Moënne – Lopez, Y. Muller, D. Legendre, L. Wisniewski – Dyé, F. Prigent – Combaret, C. 2013. Plant growth – promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science* **4** (356): 1 – 19.

Van Hannen, E. Zwart, G. Van Agterveld, M. Gons, H. Ebert, J. Laanbroek, H. 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(2):795-801.

Van Overbeek y van Elsas. 2008. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiol Ecol.* **64**: 238 – 296.

Ventura, M. Canchaya, C. Tauch, A. Chandra, G. Fitzgerald, G. et al. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Reviews.* **71** (3): 495 – 548

Verma, V. Singh, S. Prakash, S. 2011. Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of Basic Microbiology.* **51**: 550 – 556.

Volkova, L. Urmantseva, V. Burgutin, A. 2014. Stress – protective effect of phenylpropanoid complexo on potato plants in vitro. *Russian Journal of Plant Physiology.* **61** (2): 255 – 261.

Vreugdenhil, D. 2007. Potato biology and biotechnology, advances and perspectives. Oxford. Elsevier, 595 – 619 pp.

Walker, T. Bais, H. Grotewold, E. Vivanco, J. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* **132**: 44 – 51.

Wani, Z. Ashraf, N. Mohiuddin, T. Riyaz-UI-Hassan, S. 2015. Plant – endophyte symbiosis, and ecological perspective. *Appl Microbiol Biotechnol.* **99**: 2955 – 2965.

Wanner, L. Kirk, W. 2015. *Streptomyces* – from basic microbiology to role as a plant pathogen. *Am. J. Potato Res.* **92**: 236 – 242.

Wardecki, T. Brötz, E. De Ford, C. von Loewenich, F. Rebets, Y. Tokovenko, B. Luzhetskyy, A. Merfort, I. 2015. Endophytic *Streptomyces* in the traditional

medicinal plant *Arnica montana* L.: secondary metabolites and biological activity. *Antonie van Leeuwenhoek*. **108**: 391 – 402.

Weinert, N. Meincke, R. Gottwald, C. Heuer, H. Schloter, M. Berg, G. Smalla, K. 2010. Bacterial diversity on the surface of potato tubers in soil and the influence of plant genotype. *FEMS Microbio Ecol*. **74**: 114 – 123.

Weisburg, W. Barns, S. Pelletier, A. Lane, D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol*. **173**: 697 – 703.

Welbaum, G. Sturz, A. Dong, Z. Nowak, J. 2004. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **23** (2): 175 – 193.

Wu, C. Zacchetti, B. Ram, A. van Wezel, G. Claessen, D. Choi, Y. 2015. Expanding the chemical space for natural products by *Aspergillus* – *Streptomyces* co-cultivation and biotransformation. *Nature, Scientific Reports* **5** (10868): 1 – 10.

Xiao, Y. Zeng, G. Yang, Z. Ma, Y. Huang, C. Xu, Z. Huang, J. Fan, C. 2011. Changes in the actinomycetal communities during continuous thermophilic composting as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative PCR. *Bioresource Technology* **102**: 1383-1388.

Zamani, M. Behboudi, K. Ahmadzadeh, M. 2013. Quorum quenching by *Bacillus cereus* U92: a double – edge sword in biological control of plant diseases. *Biocontrol Science and Technology*. **23** (5): 555 – 573.

Zhao, K. Penttinen, P. Guan, T. Xiao, J. Chen, Q. Xu, J. Lindström, K. Zhang, L. Zhang, X. Strobel, G. 2011. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. *Curr. Microbiol*. **62**: 182 – 190.

Zwietering, M. Cuppers, A. Wit, J. Riet, K. 1994. Evaluation data transformations and validation of a model for the effect of temperatura on bacterial growth. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 195 – 203.

