



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF A LARGE BIOSYNTHETIC GENE CLUSTER FROM
Streptomyces sp. BY *in vitro* CAS9 ENDONUCLEASE MEANS CODING FOR AN
ANTIFUNGAL COMPOUND APPLIED TO AGRICULTURAL PATHOGEN CONTROL

Tesis para optar al grado de doctor en ciencias de la ingeniería,
mención ingeniería química y biotecnología

DIEGO IGNACIO LAGOS SUSAETA

Profesores Guía

MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE
JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

Miembros de la comisión

BARBARA ANDREWS FARROW
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM
BERNARDO GONZÁLEZ OJEDA

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por Beca Nacional de Doctorado ANID

SANTIAGO DE CHILE
2023

Resumen

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UN CLUSTER DE GENES BIOSINTÉTICOS DE *Streptomyces* sp. MEDIANTE ENDONUCLEASA CAS9 *in vitro* CODIFICANTE PARA UN COMPUESTO ANTIFÚNGICO APLICADO AL CONTROL DE PATÓGENOS AGRÍCOLAS

El objetivo principal de este trabajo es identificar, aislar y expresar heterológamente mediante CAS9 *in vitro* un cluster de genes biosintéticos de un policétido con actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos de importancia científica/económica en la agricultura chilena y mundial, entre ellos, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*.

En el primer capítulo (Capítulo 1) se busca establecer una colección tanto de potenciales biocontroladores del filo Actinomycetota (*Streptomyces*, *Micromonospora*) como de fito-patógenos fúngicos de importancia agrícola, con la finalidad de detectar nuevos metabolitos secundarios para biocontrol. Se cuenta con aislados de ambos filos de microorganismos procedentes de muestras de suelo capturadas en el desierto de Atacama y aislados de campo, respectivamente. Ambas colecciones cuentan solo con una caracterización fenotípica, por lo que se aplica una caracterización molecular mediante secuenciación para realizar una clasificación taxonómica de mayor precisión a través de *DNA barcodes*. Se obtiene como resultado 15 aislados de *Streptomyces*, con alta actividad antifúngica, y 10 aislados de fito-patógenos fúngicos de diversos géneros clasificados taxonómicamente a nivel molecular. Como segundo objetivo, se aplican diversas metodologías controlador-patógeno en ensayos de actividad antifúngica para definir los aislados de *Streptomyces* candidatos a análisis subsecuentes. Experimentos de cromatografía líquida asociado a espectrometría de masas (LC-MS/MS) revelan dos resultados de interés: por un lado la cepa *Streptomyces* sp. S29 es productor de una sorprendente diversidad de desferrioxaminas, mecanismo por el cual produce su actividad antifúngica. Por otro lado, *Streptomyces* sp. G35A muestra – mediante análisis de redes moleculares (GNPS) – la producción de análogos de anfotericina, potenciales responsables de su actividad antifúngica.

Contar con las secuencias genómicas de las dos cepas de interés – S29 y G35A – resulta muy útil para avanzar en la comprensión de la producción de sus respectivos compuestos de interés. Es por esto que, según se detalla en el segundo capítulo (Capítulo 2), se aplica una combinación de secuenciación de lecturas largas / baja calidad por Nanopore y lecturas cortas / alta calidad por Illumina para – tras aplicar *pipelines* bioinformáticos – generar ensamblajes de estos genomas. Se obtienen contigs de alta cobertura para ambas cepas que permiten realizar los estudios a nivel genético. Con esto se determina la secuencia de DesC, una de las enzimas de la ruta de síntesis de desferrioxamina que podría ser la responsable de la diversidad molecular que muestra S29. Por otro lado, se propone, en base al análisis de predicción de clústers biosintéticos, un cluster de una PKS tipo I posiblemente responsable de la producción de los compuestos relacionados a anfotericina.

En el tercer capítulo (Capítulo 3) se centra en la expresión heteróloga de clusters mediante Cas9 *in vitro*. Se clona, expresa heterológamente en *Escherichia coli* y purifica mediante cromatografía de afinidad la proteína Cas9 procedente de *Streptococcus pyogenes*. Se propone la utilización del cluster de actinorodina de *Streptomyces coelicolor* A3(2) como control para el establecimiento de la técnica, por su reducido tamaño y pigmentación del producto. Se valida la actividad de la *in vitro* Cas9 preparada utilizando amplicones de los extremos del cluster. Luego, se prepara y valida la extracción de gDNA íntegro en agarosa de *S. coelicolor* A3(2) mediante electroforesis de campo pulsado utilizando un equipo desarrollado en el contexto de este trabajo: openPFGE. Esta extracción es sometida, sin éxito, a digestión *in vitro* mediante Cas9.

Agradecimientos

A Paulina y Alfonso por su alegría y soporte.

A Vale y Jean por su amistad, apoyo y guía.

A los profesores guías por su acompañamiento y gestión.

A Mervyn por su desinteresada y cordial mentoría y motivación.

A Scott por su interés en el desarrollo de experimentos conjuntos.

A todos en CeBiB y el departamento quienes participaron de este trabajo a través de una discusión, una idea, una compañía o una gestión.

A la Universidad y ANID por la infraestructura y financiamiento.

Publicaciones generadas en este trabajo

Scott A. Jarmusch, **Diego Lagos-Susaeta**, Emtinan Diab, Oriana Salazar, Juan A. Asenjo, Rainer Ebel, and Marcel Jaspars (2021). “Iron-mediated fungal starvation by lupine rhizosphere-associated and extremotolerant *Streptomyces* sp. S29 desferrioxamine production”. In: *Molecular Omics* 17.1, pp. 95–107. issn: 2515-4184. doi: 10.1039/D0MO00084A. URL: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0MO00084A>

Diego Lagos-Susaeta, Oriana Salazar, and Juan A. Asenjo (2020). “openPFGE: An open source and low cost pulsed-field gel electrophoresis equipment”. In: *HardwareX* 8, e00128. issn: 24680672. doi: 10.1016/j.ohx.2020.e00128. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468067220300377>

Tabla de Contenido

Resumen.....	i
Agradecimientos.....	ii
Publicaciones generadas en este trabajo.....	iii
Introducción.....	1
Relevancia de los fito-patógenos fúngicos en la industria: necesidad de control.....	1
Búsqueda de nuevos antifúngicos: Actinomycetota, productoras de compuestos bioactivos.....	2
Extremófilos y el ambiente del desierto de Atacama.....	2
Características generales del filo Actinomycetota.....	3
Fuente de compuestos bioactivos.....	4
Bacterias como agentes de control biológico.....	6
Metabolitos secundarios del género <i>Streptomyces</i>	6
Policétidos en <i>Streptomyces</i>	7
NGS y genome mining como herramientas para ampliar el potencial de Actinomycetota.....	8
Características y estrategias de la expresión heteróloga de clusters de genes biosintéticos de metabolitos secundarios.....	9
Aplicaciones <i>in vitro</i> de la endonucleasa CAS9.....	10
Motivación y justificación de este trabajo.....	11
Objetivos.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
Diseño experimental.....	13
Capítulo 1 Colección de fito-patógenos fúngicos y <i>Streptomyces</i> . Ensayos de actividad antifúngica.....	15
1.1 Introducción.....	15
1.1.1 Colección de fitopatógenos y bacterias del filo Actinomycetota.....	15
1.1.2 Determinación taxonómica mediante <i>DNA barcodes</i>	15
1.2 Colección de patógenos fúngicos de plantas.....	16
1.2.1 Fitopatógenos UTEM.....	17
1.2.1.1 Origen y caracterización bioquímica.....	17
1.2.1.2 Identificación molecular.....	18
1.2.2 Fitopatógenos CER.....	20
1.2.2.1 Identificación molecular.....	20
1.2.2.2 Selección de aislado para experimentos detección actividad antifúngica.....	20
1.3 Colección de <i>Streptomyces</i>	22
1.3.1 Origen, aislamiento e identificación molecular.....	22
1.3.2 Determinación taxonómica mediante secuenciación de 16S y BoxPCR.....	22
1.4 Ensayos de actividad antifúngica.....	24
1.4.1 Determinación de la actividad antifúngica de aislados.....	24

1.4.1.1	Screening inicial de actividad antifúngica.....	24
1.4.1.2	Ensayo Botrytis CER.....	26
Cepario completo Lupino.....	27	
Selección de cepario Lupino en PDA.....	27	
Sobrenadante de cultivo de selección de cepario Lupino en PDA.....	27	
1.4.2	Determinación de la actividad antifúngica de extractos fraccionados.....	31
1.4.3	Actividad antifúngica mediada por agotamiento de hierro debido a la producción de desferrioxaminas en S29.....	33
1.4.4	Análisis de redes moleculares revelan compuestos de interés en G35A.....	34
Capítulo 2	Identificación de clústers biosintéticos.....	36
2.1	Introducción.....	36
2.1.1	Ensamblaje <i>de novo</i> de genomas combinando Illumina y Nanopore.....	36
2.1.2	Predicción bioinformática de cluster de genes biosintéticos y anotación de genomas	37
2.1.3	CRISPR en <i>Streptomyces</i>	38
2.2	Secuenciación genómica de <i>Streptomyces</i> sp. G35A y S29.....	39
2.2.1	Secuenciación Nanopore.....	39
2.2.2	Secuenciación Illumina.....	41
2.2.3	Ensamble genómico.....	42
2.2.4	Anotación de genomas.....	44
2.3	Predicción de clusters de genes biosintéticos.....	46
2.3.1	Predicción de clusters de genes biosintéticos en <i>Streptomyces</i> sp. G35A.....	46
2.3.2	Predicción de clusters de genes biosintéticos de desferrioxaminas en <i>Streptomyces</i> sp. S29.....	52
2.3.2.1	Knockout desC.....	54
Capítulo 3	Expresión heteróloga de Cas9 y digestión <i>in vitro</i> de gDNA.....	55
3.1	Introducción.....	55
3.1.1	Sistemas de expresión bacterianos.....	55
3.1.2	El cluster de actinorodina.....	55
3.1.3	Sistemas CRISPR/Cas9 <i>in vitro</i> para manipulación de DNA.....	56
3.1.4	PFGE y desarrollo <i>open-source</i>	57
3.2	Expresión heteróloga de Cas9.....	58
3.2.1	Plasmidio para la expresión de spCas9.....	58
3.2.2	Inducción y purificación de spCas9.....	59
3.3	Digestión <i>in vitro</i> de cluster Actinorodina.....	61
3.3.1	Selección de sitios de corte de cluster biosintético de Actinorodina.....	61
3.3.2	<i>in vitro</i> transcription (IVT) for sgRNA synthesis.....	61
3.3.3	Digestión <i>in vitro</i> de regiones flanqueadores del clúster de Actinorodina.....	62
3.4	Extracción de DNA genómico íntegro en plugs de agarosa y digestión <i>in vitro</i>	64
3.5	Selección de plasmidios para clonamiento BAC.....	66
3.6	openPFGE: Electroforesis de campo pulsado.....	67
3.6.1	Descripción general del hardware.....	68
3.6.2	Descripción general del software.....	70

3.6.3 Implementación del equipo en otros laboratorios.....	70
Conclusiones generales, discusión y perspectivas de este trabajo.....	72
3.7 Establecimiento de colección de patógenos y controladores.....	72
3.8 Ensayos de actividad antifúngica.....	73
3.9 Secuenciación de cepas de interés y predicción de BGC.....	73
3.10 Aplicación <i>in vitro</i> de endonucleasa Cas9.....	74
3.11 Perspectivas.....	75
Bibliografía.....	76
Anexos.....	83
Anexo A. Listado de Plasmidios.....	83
Anexo B. Listado de Oligonucleótidos.....	84
i. PCR primers.....	84
ii. sgRNA secuencias.....	85
iii. Oligonucleotidos para la generación de plantados de DNA para IVT.....	85
Anexo C. Listado de cepas bacterianas.....	85
Anexo D. Recetas de medios, soluciones y buffers.....	86
i. Recetas relacionadas a enzimas.....	86
ii. Medios líquidos.....	87
iii. Medios sólidos.....	87
iv. Small RNA urea denaturing PAGE.....	87
v. NiNTA and PD10 purification.....	88
Anexo E. Protocolos.....	89
i. Protocolos para la síntesis, purificación y visualización de gRNA.....	89
Oligonucleotide joining for DNA template generation for IVT.....	89
<i>in vitro</i> transcription (IVT).....	89
<i>in vitro</i> transcription (IVT) purification.....	90
Small RNA Urea denaturing PAGE.....	90
ii. Protocolos asociados con CAS9.....	91
CAS9 <i>in vitro</i> digestion.....	91
iii. Protocolos asociados a digestión <i>in vitro</i> de DNA genómico.....	92
Preparación de gDNA plugs.....	92
Digestión de plugs de agarosa de gDNA mediante enzimas de restricción.....	92
iv. Protocolos para la manipulación de <i>Streptomyces</i>	93
Aislamiento de <i>Streptomyces</i>	93
Preparación de stock de esporas.....	93
Aislamiento de DNA genómico de <i>Streptomyces</i>	94
BoxPCR.....	95
v. Protocolos para la manipulación de hongos.....	95
Extracción de DNA genómico para plantado PCR mediante liticosa e incubación a alta temperatura.....	95
vi. Protocolos bioensayos.....	96
Bioensayo selección aislado <i>Botrytis</i> CER.....	96

Screening inicial de actividad antifúngica.....	96
Cepario completo Lupino.....	96
Selección de cepario Lupino en PDA.....	96
Sobrenadante de cultivo de selección de cepario Lupino en PDA.....	97
vii. Protocolos generales.....	97
Gibson assembly.....	97
Protocolo de células competentes de cloruro de calcio de <i>E. coli</i>	97
Protocolo de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	98
Transformación química de <i>E. coli</i>	98
Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación.....	99
Anexo F. Información suplementaria del Capítulo 1: Colección de fito-patógenos fúngicos y <i>Streptomyces</i> . Ensayos de actividad anti-fúngica.....	99
i. Fitopatógenos / Secuencias de concenso ITS.....	99
ii. PCR y secuenciación <i>Botrytis</i> CER.....	101
iii. Screening inicial de actividad antifúngica.....	102
iv. Árboles filogenéticos.....	103
Anexo G. Información suplementaria del Capítulo 2: Identificación de clústers biosintéticos.....	105
i. Output Nanopore.....	105
ii. Secuenciación Illumina.....	106
iii. Resultados Antismash <i>Streptomyces</i> sp. G35A.....	107
iv. Resultados Antismash <i>Streptomyces</i> sp. S29.....	107
v. Mapa plasmidio pCRISPomyces-2-ko-acylt-S29.....	108

Índice de Tablas

Tabla 1: Pesticidas bioquímicos seleccionados aislados de actinomicetos utilizados para el control de fitopatógenos.....	5
Tabla 2: Resultados de identificación bioquímica de patógenos fúngicos de plantas.....	17
Tabla 3: Resultados de la identificación molecular de las especies de fitopatógenos en la colección.....	19
Tabla 4: Identificación de aislados de interés basado en secuenciación de 16S usando la base de datos EzBioCloud.....	23
Tabla 5: Resumen bioensayo sobrenadante de cultivo selección cepario Lupino como controlador de <i>Botrytis cinerea</i> aislado 1 (colección CER).....	31
Tabla 6: Cluster de genes biosintéticos para productos naturales en el genoma de <i>Streptomyces</i> sp. G35A.....	46
Tabla 7: Cluster de genes biosintéticos para productos naturales en el genoma de <i>Streptomyces</i> sp. S29.....	52
Tabla 8: Spacers candidatos para la exsición del clúster de Actinorodina.....	61
Tabla 9: Listado de plasmidios.....	83
Tabla 10: PCR primers.....	84
Tabla 11: sgRNA secuencias.....	85
Tabla 12: Oligonucleotidos para la generación de templados de DNA para IVT.....	85

Tabla 13: Listado de cepas bacterianas.....	85
Tabla 14: Cas9 Nuclease Reaction Buffer.....	86
Tabla 15: CAS9 storage buffer.....	86
Tabla 16: Solución de liticasa.....	87
Tabla 17: ISP2 medium.....	87
Tabla 18: LB medium.....	87
Tabla 19: abouraud Agar.....	87
Tabla 20: 10XTBE.....	88
Tabla 21: Formamide buffer.....	88
Tabla 22: Binding buffer.....	88
Tabla 23: Elutie buffer.....	88
Tabla 24: Fitopatógenos / Secuencias de concenso ITS.....	99

Índice de Figuras

Figura 1: Árbol filogenético de Actinomycetota.....	4
Figura 2: Reacciones que tienen lugar durante una ronda de elongación de policétidos en un módulo cis-AT PKS de tipo I.....	8
Figura 3: Estructura esquemática de CAS9 y asociación con sgRNA y DNA.....	10
Figura 4: Relación entre la similitud del ARNr 16S y la similitud ADN:ADN para Actinomycetota.....	16
Figura 5: Morfología macroscópica fito-patógenos fúngicos en agar Sabouraud.....	18
Figura 6: Electroforésis de PCR de ITS de once fitopatógenos.....	19
Figura 7: Bioensayo Botrytis CER.....	21
Figura 8: BoxPCR G35A y <i>Streptomyces asenjonii</i>	23
Figura 9: Screening actividad antifúngica cepas seleccionadas frente a <i>Penicillium rubens</i>	25
Figura 10: Screening actividad antifúngica cepas seleccionadas frente a <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Fusarium Oxysporum</i> (colección UTEM).....	26
Figura 11: Bioensayo cepario Lupino como controlador de <i>Botrytis cinerea</i> aislado 1 (colección CER).....	28
Figura 12: Bioensayo selección cepario Lupino como controlador de <i>Botrytis cinerea</i> aislado 1 (colección CER).....	29
Figura 13: Bioensayo sobrenadante de cultivo selección cepario Lupino como controlador de <i>Botrytis cinerea</i> aislado 1 (colección CER).....	30
Figura 14: Kupchan-UPO partition.....	32
Figura 15: Ensayo antifúngico de fraccionamiento de sobrenadante de S29 y <i>S. noursei</i> (C+) mediante Kupchan UPO con <i>B. cinerea</i> como fito-patógeno.....	32
Figura 16: Redes moleculares revelan compuestos de interés en G35A.....	35

Figura 17: Plásmido pCRISPomyces-2 para la edición dirigida del genoma en especies de <i>Streptomyces</i>	39
Figura 18: Histograma secuenciación por Nanopore cepa G35A / Secuenciación 1.....	40
Figura 19: Histograma secuenciación por Nanopore cepa G35A / Secuenciación 2.....	40
Figura 20: Histograma secuenciación por Nanopore cepa S29 / Secuenciación 1.....	41
Figura 21: Distribución de CDS y contenido de GC para G35A (contig 1).....	43
Figura 22: Distribución de CDS y contenido de GC para S29 (contig 1).....	44
Figura 23: RAST G35A.....	45
Figura 24: RAST S29.....	45
Figura 25: Organización cluster biosintético anfotericina y estructura de la molécula.....	49
Figura 26: Organización cluster biosintético nistatina y estructura de la molécula.....	50
Figura 27: Organización de los dominios de los módulos del PKS tipo I presente en la región 3.2 de G35A.....	51
Figura 28: Organización de la region 1.6 - des gene cluster en <i>Streptomyces</i> sp. S29.....	54
Figura 29: Organización del BGC de actinorodina (Act) y estructura molecular.....	56
Figura 30: Clonación de cluster de genes grandes en un solo paso por CATCH.....	57
Figura 31: Fragmentos de CAS9 y pET22b amplificados mediante PCR.....	59
Figura 32: CAS9 induction and insoluble/soluble phase fractionation.....	60
Figura 33: CAS9 fractions after purification by nitrilotriacetic acid (NTA) agarose column.....	60
Figura 34: Organización del clúster de Actinorodina.....	61
Figura 35: Urea-PAGE of sgRNAs correctamente sintetizados mediante IVT.....	62
Figura 36: ~1 [kbp] Actinorhodin cluster regions digestion.....	63
Figura 37: ~1 [kbp] Actinorhodin cluster regions digestion.....	63
Figura 38: C34 gDNA plugs digeridos con EcoRI.....	65
Figura 39: Efecto de aplicación de protK luego de digestión con Cas9. Electroforesis de campo pulsado de gDNA de C34.....	65
Figura 40: Comparación de 250 kbp y ~2.2Mbp markers.....	68
Figura 41: Diagrama de equipo openPFGE. Componentes principales del hardware openPFGE.	69
Figura 42: Imagen del equipo openPFGE. Vista general del sistema RGE implementado, destacando sus principales componentes.....	70
Figura 43: Electroforesis PCR ITS CER.....	101
Figura 44: Screening aislados colección <i>Streptomyces</i> frente a <i>Penicillium rubens</i>	102
Figura 45: Árbol neighbour-joining sin corrección de distancias para 16S de G35A.....	103
Figura 46: Árbol neighbour-joining sin corrección de distancias para 16S de S29.....	104
Figura 47: Output acumulativo secuenciación por Nanopore cepa G35A / Secuenciación 1.....	105

Figura 48: Output acumulativo secuenciación por Nanopore cepa G35A / Secuenciación 2.....	105
Figura 49: Output acumulativo secuenciación por Nanopore cepa S29.....	105
Figura 50: Resultados Antismash Streptomyces sp. G35A.....	107
Figura 51: Resultados Antismash Streptomyces sp. S29.....	107
Figura 52: Mapa plasmidio pCRISPomyces-2-ko-acylt-S29.....	108

Introducción

Relevancia de los fito-patógenos fúngicos en la industria: necesidad de control

Las enfermedades de las plantas representan una seria amenaza para los cultivos de importancia económica en todo el mundo. Los principales patógenos que causan estas enfermedades incluyen virus, bacterias y hongos, siendo estos últimos uno de los factores más determinantes en las graves pérdidas en la producción agrícola cada año (Heydari & Pessaraki, 2010). Por ejemplo, la pérdida de cultivos debido a patógenos de plantas, especialmente hongos, se estima en veintiún mil millones de dólares por año tan solo en Estados Unidos. Además de existir una gran diversidad de hongos fitopatógenos, estos son difíciles de detectar e identificar (Rossman, 2009). Una lista los 10 hongos patógenos con mayor importancia científica/económica son: (1) *Magnaporthe oryzae* causante del *rice blast* que afecta a los cultivos de arroz; (2) *Botrytis cinerea* causante del *gray mold* que afecta a más de 200 dicotiledoneas y algunas monocotiledoneas y en forma muy particular a las uvas de mesa y vino; (3) *Puccinia* spp. causante del *leaf rust* que afecta al trigo, cebada y centeno; (4) *Fusarium graminearum* causante del *fusarium head blight* (FHB), una enfermedad devastadora en trigo y cebada; (5) *Fusarium oxysporum*; causante del *wilt* en una amplia gama de plantas, entre las que destacan: tomate, tabaco, legumbres, cucurbitáceas, boniato y plátano; (6) *Blumeria graminis* causante del *powdery mildew* en gramíneas con particular impacto en cereales; (7) *Mycosphaerella graminicola*; causante del *septoria leaf blotch* en trigo; (8) *Colletotrichum* spp. causante de *black or brown lesions* que provocan la caída de la semilla entre otros síntomas; (9) *Ustilago maydis* causante del *corn smut* en maíz; y (10) *Melampsora lini* causante del *flax rust* en lino (linaza) y trigo (Dean et al., 2012).

En las plantas, las enfermedades de origen microbiano se controlan principalmente mediante el uso de pesticidas de amplio espectro y sintetizados químicamente. Se han propuesto y/o demostrado efectos nocivos potenciales en el medio ambiente, efectos en organismos no objetivo y posible carcinogenicidad u otros problemas de salud humana para algunos de estos compuestos. Por ejemplo, Vinclozolin (CAS 50471-44-8), un fungicida sistémico que se ha utilizado ampliamente en frutas y verduras, y se ha demostrado que es un antiandrógeno que afecta a las crías macho en ratas en el útero (Moorman et al., 2000). Además, el desarrollo de cepas resistentes de patógenos, la eliminación total o gradual de algunos plaguicidas y la renuencia de las empresas químicas a desarrollar y probar nuevos productos químicos debido a los procesos de registro y el costo son inconvenientes importantes para su aplicación presente y futura (Heydari & Pessaraki, 2010).

El control biológico de las enfermedades de las plantas, incluidos los patógenos fúngicos, se ha considerado un método alternativo viable al control químico. El control biológico (BC, *biological control*) es la inhibición del crecimiento, infección o reproducción de un organismo utilizando

otro organismo. BC también se puede aplicar al uso de los productos naturales extraídos o fermentados de varias fuentes. Incluso, el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos considera también como CB el uso de organismos, genes o productos génicos naturales o modificados (Pessarakli, 2010).

Muchas especies de actinomicetos, en particular las pertenecientes al género *Streptomyces*, son bien conocidas como agentes antifúngicos de control biológico que inhiben varios hongos patógenos de plantas (El-Tarabily et al., 2000; Errakhi et al., 2007; Joo, 2005; Xiao et al., 2002). La actividad antagonista de *Streptomyces* a patógenos fúngicos suele estar relacionada con la producción de compuestos antifúngicos y/o enzimas hidrolíticas extracelulares (Fguira et al., 2005). Además, el 60% de los antibióticos que se han desarrollado para uso agrícola fueron aislados de especies de *Streptomyces* (Tanaka & Omura, 1993). Por último, buena parte de los compuestos antifúngicos de origen biológico son policétidos (Vicente et al., 2003).

Búsqueda de nuevos antifúngicos: Actinomycetota, productoras de compuestos bioactivos

Extremófilos y el ambiente del desierto de Atacama

Los ambientes extremos se definen como aquellos entornos naturales o artificiales que contienen condiciones en las que es difícil sobrevivir para la mayor parte de las formas de vida. Entre los naturales se encuentran desiertos hiperáridos, profundidades oceánicas o volcanes, entre muchos otros. Se denomina extremófilos a aquellos organismos capaces de sobrevivir en alguna de estas condiciones, quienes han evolucionado y desarrollado una infinidad de estrategias para adaptarse a las condiciones atípicas de temperatura, salinidad, pH, presión, radiación, fuentes de carbono, entre otras (Jorquera et al., 2019).

El entendimiento sobre los mecanismos y compuestos producidos por extremófilos ha permitido el desarrollo de muchas herramientas y aplicaciones en bioquímica y biotecnología, como son las clásicas polimerasas termofílicas, las enzimas criofílicas y diversos antibióticos. Las aplicaciones se extienden a diversas industrias como medicina (ej: antibióticos y antitumorales), tecnología de alimentos (ej: fitasas y fosfatasas), producción de biocombustibles (ej: proteasas y lipasas), industria cosmética (ej: carotenoides), biominería y remediación de suelos contaminados (ej: enzimas degradadoras de xenobióticos), agricultura (ej: plantas inductores de crecimiento) y reciclaje de residuos orgánicos (ej: celulosa y lignocelulosa) (Rampelotto, 2016).

El Desierto de Atacama se encuentra en el norte de Chile y está ubicado dentro de las divisiones administrativas Región de Antofagasta al norte y Región de Atacama al sur, abarcando una extensión longitudinal de 1000 km con alturas desde el mar hasta ~3.500 m.s.n.m. El particular interés sobre esta locación como ambiente extremo se debe a múltiples factores simultáneos: es el desierto no-polar más antiguo y continuamente seco, presenta una radiación UV particularmente alta, baja o nula concentración de carbono en el suelo y la presencia de condiciones oxidantes fuertes y/o elementos tóxicos (Bull et al., 2018). En el último tiempo, la búsqueda de nuevos

compuestos farmacológicamente activos y útiles para la agricultura se ha centrado en microorganismos de biomas extremos poco examinados bajo la premisa de que los factores abióticos extremos seleccionarán una diversidad rara con una química única. Entre ellos destacan con especial protagonismos aquellas del filo Actinomycetota, particularmente aquellas del género *Streptomyces* (Bull et al., 2016).

Características generales del filo Actinomycetota

Las bacterias del filo Actinomycetota represetan el filo más grande del reino de las bacterias (Figura 1) y han atraído una gran atención de la comunidad científica, principalmente, debido a su capacidad para producir una amplia gama de compuestos bioactivos con estructuras químicas novedosas (Lee et al., 2018). Este filo de bacterias gram positivas consiste en gran parte de bacterias ambientales y habitantes de muchos hábitats variados: suelos, la rizosfera, ambientes marinos y áridos extremos gracias a su amplia diversidad morfología, metabólica y fisiológica. Suelen tener contenidos elevados de guanosina-citosina (65-75% G + C) y el tamaño de su genoma varía desde el comensal de la piel *Micrococcus luteus* de 2,5 Mbp hasta la cepa ambiental *Rhodococcus jostii* de 9,7 Mbp (Miao & Davies, 2010).

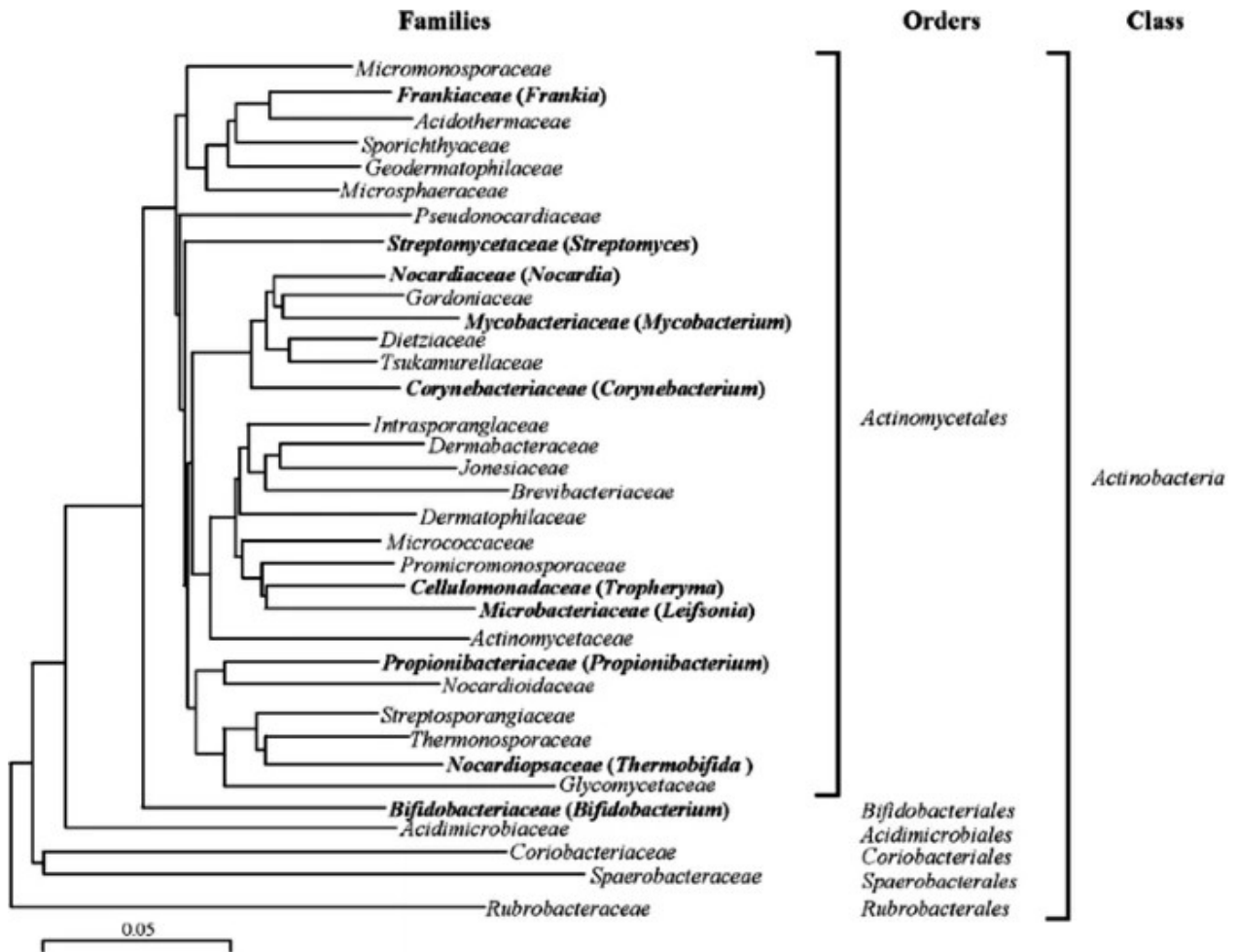


Figura 1: Árbol filogenético de Actinomycetota.

Está basado en los 1500 nt del 16S rRNA. Barra de escala, 5 nucleótidos.

Fuente de compuestos bioactivos

Hasta la fecha, las bacterias del filo Actinomycetota han aportado alrededor del 65% de los antibióticos utilizados en medicina; de los cuales más de 10.000 compuestos bioactivos fueron producidos por los miembros del género *Streptomyces*. Tras décadas de bioprospección e investigación, el género este género sigue siendo el centro de atención de para el desarrollo de productos microbianos, principalmente debido a su extensa capacidad para sintetizar una amplia gama de compuestos con diversas bioactividades (Lee et al., 2018).

La mayoría de estos antibióticos son inhibidores de la síntesis de proteínas o alteran la integridad de la membrana celular o la biosíntesis de la pared celular. Otros inducen las defensas del huésped de la planta. Algunos compuestos naturales bioactivos (BNP, bioactive natural products) tienen múltiples sitios de acción; por ejemplo, la ningnanmicina interfiere con el ensamblaje de la proteína de la cápside del virus del mosaico del tabaco y, también, puede inducir resistencia de la

planta al patógeno. La resistencia a los antibióticos puede desarrollarse lentamente, como en el caso de la niebla del peral y del manzano, donde hay poca resistencia a la estreptomina después de años de aplicación cuidadosa o puede ser rápida, como en el caso de *Xanthomonas perforans* donde la resistencia a kasugamicina desarrollado dentro de una temporada. Algunos BNP aislados de actinomicetos utilizados para el control de fitopatógenos se muestran en la Tabla 1. Los mecanismos utilizados por un agente de control biológico (BCA. *biological control agent*) se ven afectados por condiciones ambientales como el tipo de suelo, la temperatura, el pH, la humedad y la existencia de microorganismos circundantes (Gwinn, 2018).

Tabla 1: Pesticidas bioquímicos seleccionados aislados de actinomicetos utilizados para el control de fitopatógenos

Compuesto / Actinomiceto productor	Actividad (FRAC MOA Code) ¹	Organismos blanco
Blasticidin (1) <i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Protein synthesis (D2)—inhibits peptide bond formation and peptidyl-tRNA hydrolysis through deformed conformation of tRNA	Bacteria and fungi, particularly rice blast disease caused by <i>Magnaporthe grisea</i>
Mildiomicyn (2) <i>Streptovercillium rimofaciens</i>	Protein synthesis (D2)—blocks peptidyl-transferase	Fungi. Serine derivative of blasticin active against powdery mildew diseases. Primarily used in Japan
Gentamicin (3) <i>Micromonospora purpurea</i>	Protein synthesis—inhibits binding to prokaryotic 16S rRNA and disrupts cell membrane integrity	Bacteria (particularly Gram negative (G ⁻)). Fire blight of apple and pear—Mexico. Various bacteria diseases of vegetable crops (Mexico and Central America)
Kasugamicyn (4) <i>Streptomyces kasugaensis</i>	Protein synthesis (D3)—inhibits binding of aminoacyl-tRNA to mRNA-30S and mRNA-70S	Bacteria and fungi (systemic activity). Fire Blight and several species of <i>Pseudomonas</i> and <i>Xanthomonas</i> , several fungal plant pathogens and for rice blast caused by <i>Magnaporthe grisea</i>
Oxytetracycline (5) <i>Streptomyces rimosus</i>	Protein synthesis—inhibits binding of aminoacyl-tRNA to 30S and 50S ribosomal subunits	Bacteria. Several species of <i>Erwinia</i> , <i>Pseudomonas</i> , and <i>Xanthomonas</i> as well as mycoplasma-like organisms
Streptomycin (6) <i>Streptomyces griseus</i>		Fungi. Control various fungal diseases of plants and mushroom, but especially basal rots of ornamental bulbs caused by <i>Fusarium oxysporum</i> and dry bubble disease in mushrooms
Pimaricin (natamycin) (7) <i>Multiple soil actinomycetes</i>	Ergosterol-specific inhibition of membrane transport proteins	
Polyoxins (8) <i>Streptomyces cacaoi var. asoensis</i>	Cell wall biosynthesis (H4)—blocks chitin synthesis which leads to germ tube and hyphal tip swelling	Fungi. Control of various fungal diseases including those caused by <i>Alternaria</i> , <i>Rhizoctonia</i> , and <i>Magnaporthe grisea</i>
Validamycin (9) <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Cell wall biosynthesis (H4)—degradation of intracellular trehalose; may be host defense inducer	Fungi and Bacteria. Diseases caused by <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> . Various bacterial diseases
Ningnanmycin (10) <i>Streptomyces noursei var. xichangensis</i>	Multisite—inhibits the coat protein assembly of virus; may be host defense inducer	Fungi and viruses. Fungal diseases of turfgrasses. Tobacco mosaic and cowpea mosaic viruses. Available in China

1 Fungicide Resistance Action Committee Mode of Action Codes—Different letters are used to denote biochemical mode of action against plant pathogens. D = protein synthesis; H = cell wall synthesis.

Bacterias como agentes de control biológico

Numerosas especies bacterianas se utilizan ampliamente como agentes de control biológico para el control de varios hongos fitopatógenos. Estos BCA tienen además diversos efectos beneficiosos sobre las plantas tratadas. En este caso se utilizan miembros de muchos géneros bacterianos, epífitos y/o endófitos. Las bacterias más comunes utilizadas como agentes de control biológico incluyen algunas especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, entre muchos otros (Rashad & Moussa, 2020).

Streptomyces es un género que comprende más de 800 especies. Los miembros de este género tienen una amplia distribución y se encuentran en varios hábitats, como suelo, agua, vegetación en descomposición, endófitos o epífitos, e incluso en hábitats extremos como sedimentos de aguas profundas, suelos volcánicos, congelados o desérticos. Los antibióticos producidos por especies de este género representan la mayor parte, aproximadamente dos tercios, de los antibióticos conocidos hasta el momento, entre los que cuentan: estreptomina, pimamicina, neomicina, fenilolactonas, ciperomicina, warkmicina y griseomicina. Son fuente también de numerosas enzimas como: quitinasas, proteasas, peroxidasas, glucanasas, lacasas y tirosinasas de cerca de 8.000 BNP con actividades anticancerígenas, antivirales, antihipertensivos, inmunosupresores y antioxidantes también se informaron. Diferentes especies han sido utilizadas para investigación y desarrollo en biocontrol, como: *S. lydicus*, *S. vinaceusdrappus*, *S. griseoviridis*, *S. griseorubens*, *S. tsusimaensis*, *S. griseofuscus* o *S. spororaveus*, entre muchas otras (Rashad & Moussa, 2020).

Metabolitos secundarios del género *Streptomyces*

A pesar de las características extremadamente variadas de cada organismo vivo, estos comparten vías comunes para modificar las macromoléculas esenciales de la vida, como ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y grasas. Este proceso puede describirse como metabolismo primario. En cambio, el metabolismo secundario puede distinguirse de éste por tres criterios: 1. no es esencial en términos de crecimiento, desarrollo o reproducción normales, aunque puede tener un papel importante para el organismo, por ejemplo, en la tolerancia al estrés o en sus interacciones ecológicas con otros organismos; 2. a menudo es una característica de géneros, especies o cepas individuales; y 3. se forma a lo largo de vías especializadas, a partir de productos del metabolismo primario (Dewick, 2002; Herbert, 1989).

Muchos de estos metabolitos secundarios exhiben una variedad de actividades biológicas y son de interés para muchas áreas industriales, como agroquímica, alimentaria o farmacéutica. Según el origen bioquímico del metabolito secundario, se clasifican en cinco categorías: terpenoides y esteroides, derivados de ácidos grasos y policétidos, alcaloides, péptidos no ribosómicos y cofactores enzimáticos (McMurry, 2011). En las bacterias, los genes que codifican una ruta metabólica específica para cualquiera de estos compuestos generalmente se agrupan y se corregulan en lo que se denomina un cluster de genes biosintéticos (BGC, *biosynthetic gene cluster*). Estos grupos con frecuencia no se expresan en condiciones de laboratorio porque,

generalmente, estas condiciones no proporcionan el desencadenante ecológico apropiado (inductor/factor de activación) o los activadores específicos de la vía. Estos se denominan grupos de genes crípticos (Osbourn, 2010).

Policétidos en *Streptomyces*

Un grupo importante de metabolitos secundarios son los policétidos (PK, *polyketide*). Tienen una gran diversidad de actividades biológicas y propiedades farmacológicas, tales como propiedades antibióticas, anticancerígenas, antifúngicas, antiparasitarias, citostáticas e inmunosupresoras (Shimizu et al., n.d.). Gran parte de la investigación actual sobre la biosíntesis de PKs está impulsada por las actividades biológicas incomparables y el enorme valor comercial de estos productos naturales, que siguen siendo los candidatos más exitosos para el descubrimiento de nuevos fármacos (Shen, 2003). Estos compuestos se biosintetizan a partir de precursores de grupo acil simples como acetil CoA, propionil CoA y metilmalonil CoA, de una manera similar a la de los ácidos grasos, pero, en contraste con estos últimos, los PKs a menudo tienen muchos sustitutos de oxígeno remanentes.

Una molécula de PK es una cadena poli- β -ceto que se sintetiza mediante enzimas multidominio o complejos enzimáticos denominados policétido sintasas (PKS, *polyketide synthase*) (McMurry, 2011). Los BGC que codifican estos PKS generalmente se agrupan en construcciones grandes, con un tamaño promedio de 30 [kbp] (Cobb et al., 2014). Hay tres PKS bacterianas arquetípicas principales conocidas hasta la fecha: Tipo I, II y III. Las PKS de tipo I son enzimas multifuncionales que se organizan en módulos, cada uno de los cuales alberga un conjunto de actividades distintas y de acción no iterativa responsables de la catálisis de un ciclo de elongación de la cadena de policétidos. Las PKS de tipo II son complejos multienzimáticos que llevan un solo conjunto de actividades de acción iterativa. Las PKS de tipo III son enzimas homodiméricas que actúan iterativamente como enzimas de condensación (Shen, 2003). El progreso reciente en la biosíntesis de PKs sugiere claramente que las PKS tienen una diversidad mucho mayor tanto en el mecanismo como en la estructura (Shen et al., 2007). Junto con los hongos, las bacterias del filo Actinomycetota, y especialmente el género *Streptomyces*, son los principales productores de PKs. La genética y la bioquímica de la biosíntesis de PKs en estos organismos están relativamente bien caracterizadas (Keiser et al., 2000).

Cada módulo del PKS contiene tres dominios esenciales; aciltransferasa (AT, *acyltransferase*), KS y proteína acilportadora (ACP, *acylcarrier protein*). Además, otros dominios podrían estar presentes en los módulos como cetorreductasa (KR, *ketoreductase*), enoil reductasa (ER, *enoiil reductase*), deshidratasa (DH, *dehydratase*), metiltransferasa (MT, *methyl-transferase*), entre otros. A partir de la conformación del dominio es posible predecir el producto del BGC. El dominio AT reconoce y transfiere los acilo que se incorporarían al PK mientras que el KS realiza la reacción de condensación de Claisen entre la cadena y la unidad extensora. El dominio DH cataliza la deshidratación de un intermedio de PK para producir un doble enlace entre los carbonos α y β y eliminando un grupo hidroxilo (Figura 2, (Nguyen et al., 2008)).

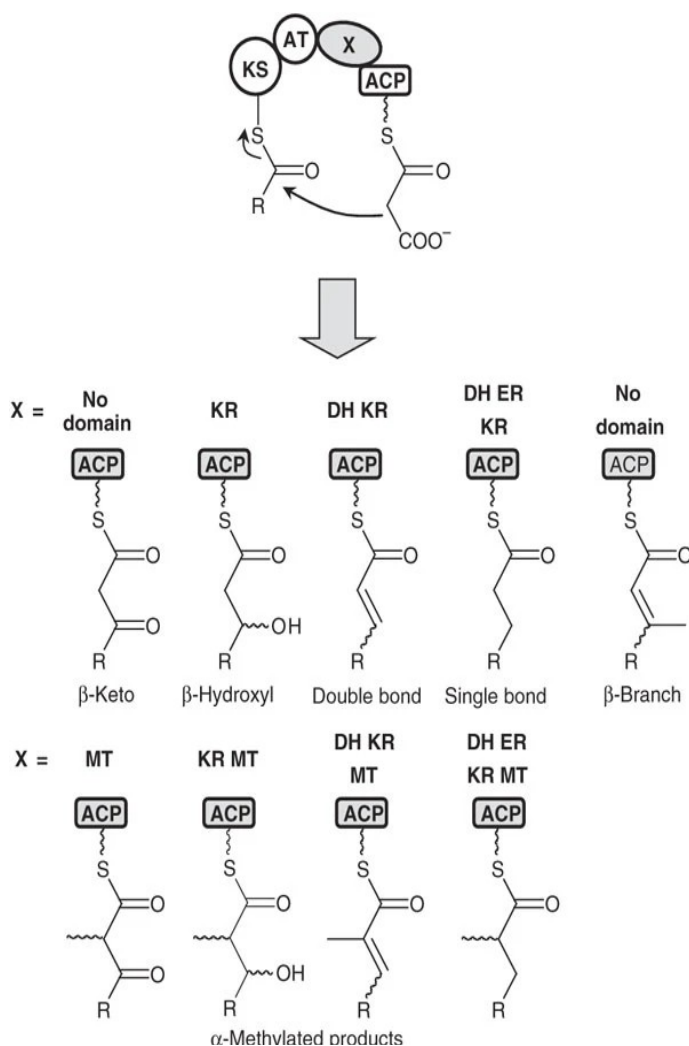


Figura 2: Reacciones que tienen lugar durante una ronda de elongación de policétidos en un módulo cis-AT PKS de tipo I.

X es un dominio variable o un conjunto de dominios. En las PKS trans-AT, generalmente faltan los dominios AT y ER. En la mayoría de los casos, las enzimas que generan ramas β no están integradas en los módulos PKS. Las PKS Cis-AT también pueden introducir grupos metilo mediante la incorporación dirigida por AT de bloques de construcción de metilmalonilo. DH, deshidratasa; ER, enoilreductasa; KR, ceto-reductasa; MT, metiltransferasa. Los productos biosintéticos para conjuntos de dominios individuales se muestran debajo de la flecha.

NGS y genome mining como herramientas para ampliar el potencial de Actinomycetota

Los genomas bacterianos, y especialmente los de las bacterias del filo Actinomycetota, albergan rutas metabólicas dedicadas a la biosíntesis de metabolitos secundarios, muchos de los cuales son probablemente productores de nuevos compuestos con actividades biológicas útiles. La

secuenciación de genomas se ha convertido en una estrategia útil para la identificación de cluster de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios.

Gracias al avance de la secuenciación de próxima generación (NGS, *next generation sequencing*) ha aumentado significativamente la disponibilidad de secuencias genómicas. Esto, junto al progreso en recursos computacionales y herramientas bioinformáticas como antiSMASH (identificación, anotación y análisis rápidos de grupos de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios en secuencias genómicas bacterianas y fúngicas) (Blin et al., 2021) o PRISM (predicción de estructuras químicas de productos naturales a partir de genomas microbianos) (Skinnider et al., 2017) ha desbloqueado la expansión del potencial de las bacterias del filo Actinomycetota, particularmente, debido a la presencia de grupos de genes biosintéticos "crípticos" o silenciosos. Gracias a estos resultados se ha podido implementar edición genética para realizar *knock-in* que permita activar grupos de genes biosintéticos silenciosos (kasO*, ermE*) o *knock-out* de genes represores o competidores de ciertas vías. Junto con las herramientas analíticas y moleculares de vanguardia, el descubrimiento de grupos de genes biosintéticos posiblemente podría aumentar la diversidad química de las Actinomycetota de diferentes fuentes naturales, lo que amplificaría el potencial farmacéutico de estos microbios beneficiosos (Lee et al., 2018).

Características y estrategias de la expresión heteróloga de clusters de genes biosintéticos de metabolitos secundarios

Gran parte del potencial biosintético, no exclusivamente, pero de manera crítica para los intereses de este trabajo, de los organismos *Streptomyces* no se observa en condiciones de laboratorio debido al hecho de que muchos grupos de genes son crípticos, lo que significa que pueden o no transcribirse. Por otro lado, al igual que en el ejemplo anterior, con el uso de *genome mining* es posible predecir los genes involucrados en la síntesis de un metabolito en particular, una propuesta que debe ser luego confirmada. En ambos casos, la expresión heteróloga de los BGC, con o sin modificaciones, puede ayudar a resolver el problema.

La expresión heteróloga de BGC también puede ser útil para la caracterización o producción del metabolito, por ejemplo, utilizando un huésped relacionado adaptado a condiciones de laboratorio y, usualmente, libre de otros BGC, como es el caso de *Streptomyces coelicolor* M145 para los BGC de origen en *Streptomyces*. Finalmente, también puede emplearse para generar un organismo modificado para diversos fines, como por ejemplo, un BCA mejorado.

Los BGC de bacterias PKS o NRPS tienen un promedio de 32 kbp (Cobb et al., 2014). La clonación de secuencias largas de DNA se realiza mediante diversas técnicas. Una opción son los métodos tradicionales de clonación basados en PCR. Estos tienen un tamaño restringido debido a la limitada procesividad de la polimerasa. Los fragmentos que se pueden obtener son, aproximadamente, entre 10 kbp y 35 kbp en condiciones muy ideales y casos especiales (Barnes, 1994). Otra opción es el uso del ensamblaje de múltiples fragmentos cortos, como productos de PCR superpuestos, pero tienden a consumir mucho tiempo y ser costosos, particularmente para

obtener secuencias de más de 50 kbp. Además, se puede usar el uso de enzimas de restricción para la digestión del DNA genómico pero, como estas endonucleasas no son específicas, seleccionar una secuencia específica de interés de una gran cantidad de productos de digestión de restricción es un gran desafío en la detección del fragmento deseado, en términos de tiempo, trabajo y/o dinero. Se han desarrollado otros métodos como TAR o *single-strand overlapping annealing*, pero la utilidad de estas técnicas sigue siendo limitada porque se basan en la disponibilidad de sitios de restricción únicos que flanquean la región genómica objetivo y, a menudo, en la presencia de marcadores de selección en la secuencia objetivo (Jiang et al., 2015).

Aplicaciones *in vitro* de la endonucleasa CAS9

spCAS9, una proteína asociada a CRISPR proveniente de *Streptococcus pyogenes*, es una endonucleasa guiada por RNA que escinde objetivos de DNA específicos realizando cortes de doble hebra (DSB, *double strand breaks*). Tiene dos dominios importantes, el dominio de la nucleasa HNH que escinde la cadena complementaria y el dominio similar a RuvC que escinde la cadena no complementaria (Figura 3). spCAS9 ha sido optimizada para utilizar un sgRNA (*single guide RNA*), en lugar de dos RNA pareados (crRNA y tracrRNA), que cuenta con una región de reconocimiento CAS9 que permite la formación de un complejo CAS9/sgRNA y una región complementaria al DNA objetivo – de alrededor de 20 [pb], llamada *protospacer* – que permite el reconocimiento de la región específica donde realizar el DSB. La ubicación del DSB realizado por CAS9 también está determinada por un motivo corto, típicamente un NGG, denominado PAM (*protospacer adjacent motif*), yuxtapuesto a la región complementaria en el DNA diana (Jinek et al., 2012).

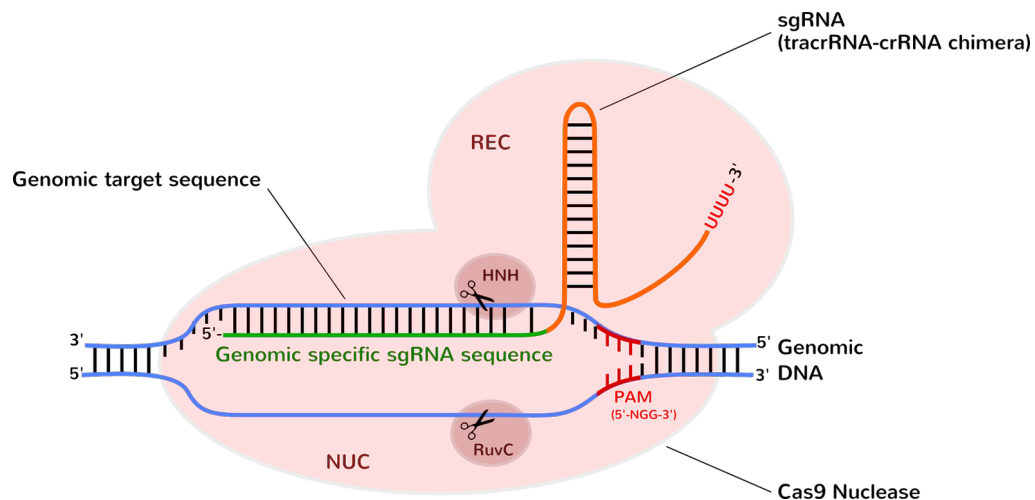


Figura 3: Estructura esquemática de CAS9 y asociación con sgRNA y DNA

Las aplicaciones *in vivo* de endonucleasas para la edición de genes, hasta hace unos años, se basaban principalmente en nucleasas de dedos de zinc dirigidas al sitio (ZFN) y nucleasas efectoras TAL (TALEN). Sin embargo, las dificultades de diseño, síntesis y validación de proteínas siguen siendo una barrera para la adopción generalizada de estas nucleasas diseñadas para uso rutinario. La simplicidad de la programación CRISPR-Cas9 – mediante la definición de la secuencia del protospacer – junto con un mecanismo único de corte de DNA más la capacidad para el reconocimiento de objetivos multiplexados y la existencia de muchas variantes naturales del sistema CRISPR-CAS de tipo II, ha permitido desarrollos notables utilizando esta tecnología costo-efectiva y fácil de usar para dirigir, editar, modificar, regular y marcar de manera precisa y eficiente loci genómicos en amplia gama de células y organismos (Doudna & Charpentier, 2014).

Las aplicaciones *in vitro* de CAS9 actualmente incluyen pocas alternativas. Algunos autores han propuesto su uso en la detección de SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) (Courtney et al., 2016). Otra aplicación está relacionada con la prueba de guías de sgRNA antes de las aplicaciones *in vivo* para la edición del genoma. La aplicación principal de CAS9 *in vitro* es para la clonación de grandes fragmentos de DNA, cuando el PCR comienza a fallar, lo cual es un paso imperativo en la ingeniería de organismos con el fin de producir biomoléculas de alto valor agregado. El desarrollo actual ha llevado a la clonación de grupos de hasta 100 [kbp] de fuentes de *E. coli* y 36 [kbp] de *Streptomyces venezuelae* sin conjugación a un huésped final de *Streptomyces* ni validación de la expresión del BGC (Jiang et al., 2015).

Motivación y justificación de este trabajo

Las enfermedades fúngicas de las plantas son una preocupación importante para la producción agrícola mundial, se estima que las pérdidas alcanzan casi el 50 % en los países en desarrollo (Evangelista-Martínez, 2014). Debido a los efectos nocivos sobre el medio ambiente, los efectos sobre organismos no objetivo, la resistencia y la posible carcinogenicidad u otros problemas de salud humana de los compuestos sintetizados químicamente que se utilizan actualmente para el control de hongos fitopatógenos, parece ser necesario el desarrollo de soluciones respetuosas con el medio ambiente y específicas. De esta manera, el control de las enfermedades fúngicas de las plantas utilizando microorganismos no patógenos de origen natural representa un enfoque prometedor para el control de las enfermedades de las plantas y una alternativa atractiva a los fungicidas químicos. Debido a la experiencia del CeBiB y su grupo de bioprospección actinomicetos (GBA) en la manipulación, metabolómica y genética de *Streptomyces* junto con la colección de cultivos disponible y los antecedentes mostrados anteriormente, parece importante desarrollar este trabajo de investigación con el fin de contribuir al avance de la ciencia y al mejoramiento de la agricultura nacional y la salud humana.

Objetivos

Objetivo general

Identificar, aislar y expresar heterológamente mediante CAS9 *in vitro* el cluster de genes biosintético de un policétido con actividad antifúngica contra un hongo fitopatógeno de importancia científica/económica en la agricultura chilena y mundial.

Objetivos específicos

1. Examinar cepas de *Streptomyces* para determinar la producción de policétidos y seleccionar una con alta actividad antifúngica
2. Identificar el cluster de genes biosintéticos de PKS que codifica el policétido
3. Implementar la escisión de clusters de genes biosintéticos a partir de DNA genómico usando un método CAS9 *in vitro*
4. Expresar heterológamente el cluster de genes biosintético del PKS en una cepa adecuada para la producción industrial

Diseño experimental

De acuerdo al contexto y objetivos descritos, el diseño experimental considera los siguientes pasos principales relacionados con cada objetivo específico:

[objetivo 1] Examinar cepas de *Streptomyces* para determinar la producción de policétidos y seleccionar una con alta actividad antifúngica

1. Selección de patógenos fúngicos de plantas objetivo para la detección de actividad antifúngica en función de las cepas fúngicas disponibles y la importancia científica/económica de cada una
2. Establecimiento de ensayos de actividad antifúngica utilizando cultivos de *Streptomyces*, extractos crudos, metabolitos extracelulares purificados o fracciones de metabolitos extracelulares de procesos cromatográficos. Se evaluarán métodos ampliamente utilizados de difusión en disco, difusión en pozo y dilución en caldo o agar y menos frecuentes citofluorométricos y bioluminiscentes de flujo para determinar la actividad antifúngica
3. Selección de la(s) cepa(s) de *Streptomyces* productora de antifúngicos basada en ensayos de actividad antifúngica
4. Determinación del metabolito policétido con actividad antifúngica de la cepa de *Streptomyces* seleccionada mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas

[objetivo 2] Identificar el cluster de genes biosintéticos de PKS que codifica el policétido

1. Con base en el cromatograma de espectrometría de masas y, posiblemente, la espectroscopia de NMR de la molécula, identificar el cluster de genes biosintéticos de PKS que codifica la molécula se determinará mediante herramientas de *genome mining*

[objetivo 3] Implementar la escisión de clusters de genes biosintéticos a partir de DNA genómico usando un método CAS9 in vitro

1. Producción de CAS9
 - a) Clonación del gen *wt* spCAS9 de *Streptococcus pyogenes* en un plásmido de expresión compatible para su producción en *Escherichia coli*
 - b) Optimización de la expresión de CAS9 en el huésped *Escherichia coli* mediante el ajuste de los variables del proceso
 - c) Purificación de CAS9 por cromatografía de afinidad
 - d) Validación de la actividad enzimática
2. Validación de la escisión del cluster y ligación: Para este propósito, el cluster codificante para Actinorhodin (*act*) de *Streptomyces coelicolor* M145 de ~20 [kb] se expresará heterológamente en una cepa Δ *act* *S. coelicolor* (M1152)

- a) Extracción de DNA genómico íntegro de M145 por lisis celular en agarosa
- b) Escisión del cluster por digestión CAS9 *in vitro*
- c) Purificación de cluster mediante extracción en gel y purificación
- d) Ligación de cluster a plásmido ESAC (*Escherichia-Streptomyces-artificial-chromosome*)
- e) Conjugación y expresión del cluster de genes act en M1152

[objetivo 4] Expresar heterológamente el cluster de genes biosintético del PKS en una cepa adecuada para la producción industrial

1. Expresión heteróloga del grupo del gen PKS con actividad antifúngica identificada en el objetivo 2 usando la misma estrategia definida en el objetivo 3.

Capítulo 1

Colección de fito-patógenos fúngicos y *Streptomyces*. Ensayos de actividad anti-fúngica

1.1 Introducción

1.1.1 Colección de fitopatógenos y bacterias del filo Actinomycetota

En CeBiB, el trabajo con fito-patógenos es un área que recién se está iniciando. Por esto, resulta de particular importancia contar con una colección propia de hongos de relevancia industrial y académica contra la que poder testear compuestos activos. Se busca en este capítulo lograr formar este cepario a partir de diversas muestras de campo. Adicionalmente realizar la determinación molecular sobre identidad de las cepas.

Se cuenta con una nueva colección de bacterias del filo Actinomycetota en CeBiB, recientemente aisladas desde muestras de suelo rizósfera de lupino en el desierto de Atacama. Una vez establecida esta colección y validada la identidad de las cepas mediante métodos moleculares, el propósito de este capítulo se centra en la realización de ensayos de actividad anti-fúngica para la selección de aislados de interés para caracterización química de sus componentes activos y estudio de rutas biosintéticas.

1.1.2 Determinación taxonómica mediante *DNA barcodes*

Los hongos denotan la mayor diversidad de eucariotas en la tierra. La identificación de hongos se ha basado, hasta hace poco tiempo, principalmente en sus características fenotípicas y fisiológicas. Un enfoque de identificación rápido, preciso e independiente de criterio de experto resulta indispensable para lidiar con este problema. Se han desarrollado muchos métodos moleculares para identificar especies de hongos, incluida la hibridación in situ fluorescente (FISH), hibridación y secuenciación de DNA, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), la longitud del fragmento de restricción terminal polimorfismo (T-RFLP), entre algunos otros, siendo la secuenciación la técnica más utilizada. El *código de barras* de DNA es un método preciso, rápido, universalmente accesible y estandarizado para identificar especies mediante el uso de secuencias de DNA. El concepto fue propuesto por primera vez en 2003 utilizando la citocromo c oxidasa I (COX1) como código de barras estándar para animales. La región ITS (*Internal transcribed spacer*) es la región normalmente secuenciada para identificar la taxonomía fúngica a nivel de especie, e incluso dentro de las especies. La región ITS muestra un mayor grado de variaciones en comparación con las otras regiones de rDNA (SSU y LSU). Por lo tanto, la región ITS se ha designado recientemente como el código de barras de ADN para el reino fúngico, contando con extensas bases de datos de referencia (Fajarningsih, 2016).

Por otro lado, de forma análoga, el gen 16S rRNA se usa para estudios filogenéticos ya que está altamente conservado entre diferentes especies de bacterias y arqueas (Figura 4, (Ward & Bora, 2006)).

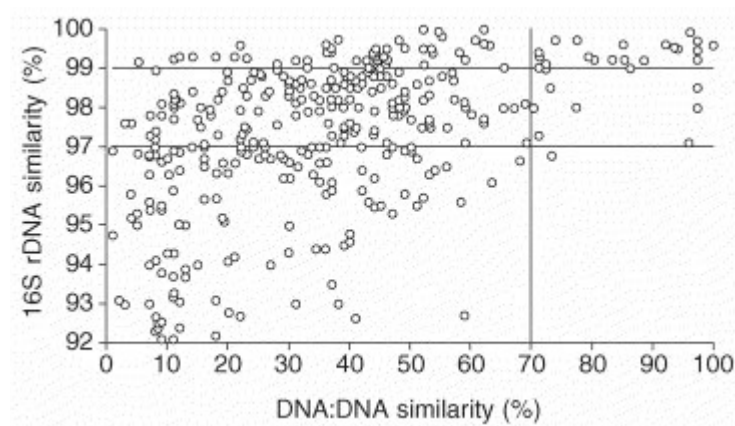


Figura 4: Relación entre la similitud del ARNr 16S y la similitud ADN:ADN para Actinomycetota

(datos de JEM Stach). Usando una similitud de DNA conservadora del 70 % como umbral para la definición de especie, está claro que cualquier secuencia de rRNA 16S que se desvíe en un 97 % o más es invariablemente una especie diferente, pero una similitud superior al 97 % o incluso superior al 99 % es un indicador deficiente de similitud genómica.

Finalmente, el código de barras del PCR de secuencia de elementos repetitivos (rep-PCR) ha demostrado ser una herramienta valiosa para clasificar y tipificar una variedad de géneros Gram-negativos y varios Gram-positivos. Se utilizan tres categorías de secuencias repetitivas conservadas para la tipificación bacteriana: la secuencia consenso intergénica repetitiva enterobacteriana (ERIC), la secuencia palindrómica extragénica repetitiva (REP) y el elemento BOX. A menudo, las tres categorías se usan en combinación para lograr una mejor discriminación (Tacão et al., 2005).

1.2 Colección de patógenos fúngicos de plantas

Los ensayos de determinación de actividad antifúngica requerían de una colección de patógenos fúngicos de plantas. Se determinó que esta colección debía contar con especies seleccionadas por su alto interés académico y/o su alto impacto económico en la industria agrícola. Para esto se contaba con un repositorio de fito-patógenos aislados desde muestras de campo, escogidas por su alta agresividad, provenientes, por un lado, del Laboratorio de microbiología, Facultad de ciencias naturales, matemática y medio ambiente, Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM)² (en adelante ‘muestras UTEM’) y, por otro lado, del centro de investigación y desarrollo agrícola CER³ (en adelante ‘muestras CER’).

2 Santiago, Chile

En esta sección se busca establecer una colección de patógenos fúngicos de plantas a partir de estas muestras de campo y definir su identidad mediante métodos de secuenciación.

1.2.1 Fitopatógenos UTEM

1.2.1.1 Origen y caracterización bioquímica

El primer grupo de muestras UTEM se recibió con un análisis fenotípico y bioquímico realizado en este laboratorio. Diversos generos conforman el material de partida: *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Botrytis* spp. and *Fusarium* spp. La caracterización bioquímica de 11 patógenos se muestra en la Tabla 2. Su morfología macroscópica de muestra en la Figura 5.

Tabla 2: Resultados de identificación bioquímica de patógenos fúngicos de plantas

Internal code	Proposed pathogen fungi genus/species
2	<i>Alternaria</i> sp
13	<i>Aspergillus niger</i>
14	<i>Penicillium</i> sp
16	<i>Penicillium</i> sp
31	<i>Aspergillus niger</i>
35	<i>Aspergillus niger</i>
CC4A	<i>Penicillium italicum</i> o <i>brevicompactum</i>
CC17A	<i>Aspergillus oryzae</i> o <i>flavus</i>
CC18G	<i>Aspergillus versicolor</i>
BOT	<i>Botrytis</i> sp
FUS	<i>Fusarium oxisporum</i>

3 <http://www.ceresearch.com/>. Fundo Santa Paulina S/N°, Rosario. Rengo CP 2940000, VI Región del General Libertador Bernardo O'Higgins

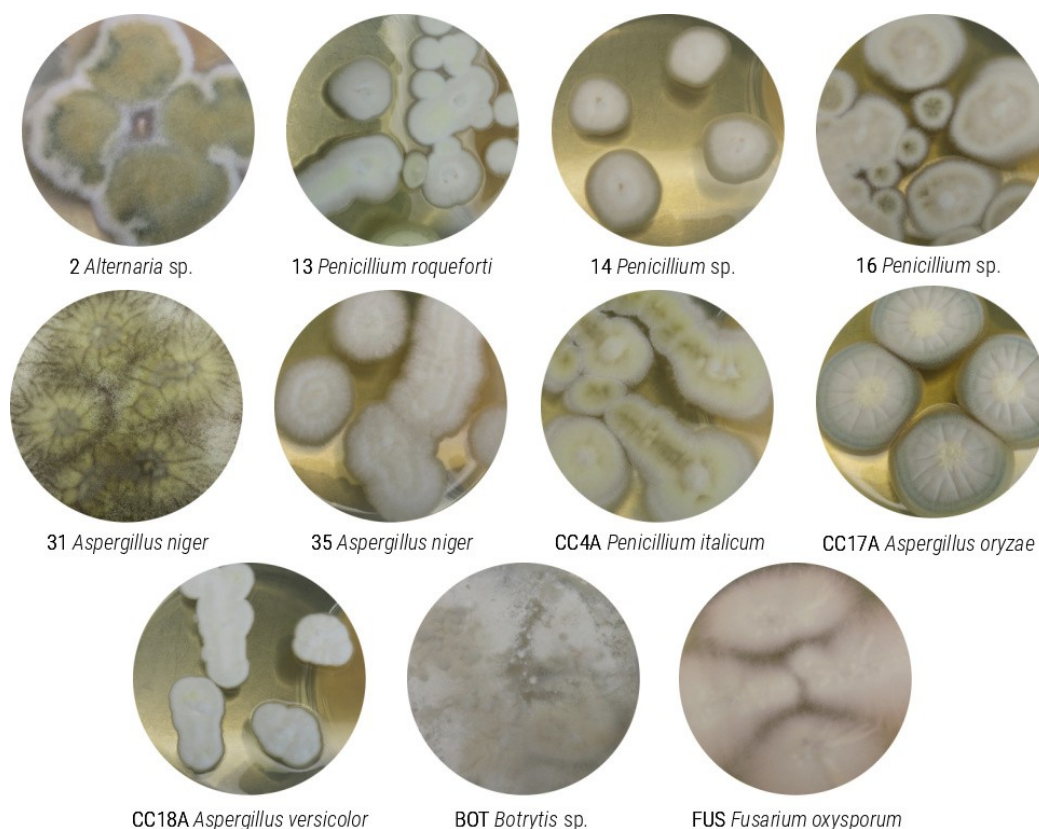


Figura 5: Morfología macroscópica fito-patógenos fúngicos en agar Sabouraud

1.2.1.2 Identificación molecular

El análisis bioquímico previamente realizado no cuenta con más detalle respecto de su resultado de clasificación ni con más datos que permitan discriminar con certeza las especies pertenecientes a esta colección. Dadas las ventajas de las regiones ITS (*nternal transcribed spacer*) como *DNA barcode*, se determina realizar una identificación molecular por medio de secuenciación de regiones ITS.

Para este propósito se estableció y optimizó un protocolo de extracción de DNA genómico. La utilización de liticasa junto a incubación con temperatura resultó en un protocolo rápido y simple para la generación de DNA templado para PCR (ver E: Protocolos > v Protocolos para la manipulación de hongos). La amplificación de las regiones ITS mediante PCR usando los primers ITS1 (FWD) e ITS4 (REV) sobre los once patógenos entrega amplicones únicos en el tamaño esperado de ~500 bp, como muestra la Figura 6. Tras la purificación de cada PCR, cada amplicón fue secuenciado mediante Sanger y la secuencia de consenso fue generada mediante alineamiento de los reads. Usando estas secuencias de consenso (Tabla 24) se realizó alineamientos contra la ISHAM barcoding database⁴. Las especies fúngicas fueron identificadas

⁴ Molecular Mycology Research Laboratory, Centre for Infectious Diseases and Microbiology, Westmead Institute for Medical Research, Sydney, Australia. ISHAM Barcoding database.

con alta identidad de secuencia, > 99% para todas las muestras, tal como muestra la Tabla 3. Dado que la identificación bioquímica fue realizada en UTEM y no se cuenta con más detalles respecto de su ejecución, resulta inconducente una discusión sobre las diferencias encontradas en ambos análisis, molecular y bioquímico, respecto de la identificación de los géneros de algunas muestras, como es el caso de (código interno) 13, 15 CC17A y CC18G. En cualquier caso, la identificación molecular suele tener alto grado de certeza y ser más confiable que la bioquímica debido a las similitudes fenotípicas entre algunos géneros / especies.

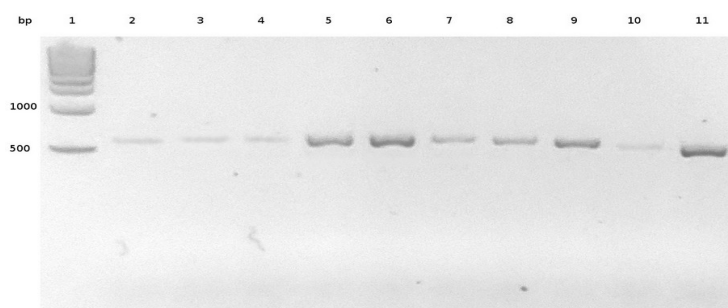


Figura 6: Electroforesis de PCR de ITS de once fitopatógenos

Agarose (2%). COL 1: 1 kb DNA Ladder (NEB). COL 2-12: Fungi internal code: 2, 13, 14, 16, 31, 35, CC4A, CC17A, CC18G, BOT, FUS

Tabla 3: Resultados de la identificación molecular de las especies de fitopatógenos en la colección

Internal code	Proposed pathogen fungi genus/species	Sequence identity (%)
2	<i>Alternaria alternata</i>	100
13	<i>Penicillium rubens</i>	100
14	<i>Penicillium rubens</i>	100
16	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100
31	<i>Aspergillus niger</i>	100
35	<i>Penicillium griseofulvum</i>	100
CC4A	<i>Penicillium rubens</i>	100
CC17A	<i>Penicillium glabrum</i>	99
CC18G	<i>Aspergillus creber</i>	100
BOT	<i>Botrytis cinerea</i>	99
FUS	<i>Fusarium oxysporum</i>	100

1.2.2 Fitopatógenos CER

1.2.2.1 Identificación molecular

En forma análoga a la identificación molecular para los fitopatógenos UTEM (pág. 18), se trabajó con las muestras CER pertenecientes al género *Botrytis* se amplificaron las regiones ITS de estos aislados mediante PCR para luego secuenciar y validar su identidad. Todos los aislados confirman su identidad con *Botrytis cinerea* (PCR y data de secuenciación en Información suplementaria del Capítulo 1: Colección de fito-patógenos fúngicos y Streptomyces. Ensayos de actividad anti-fúngica > Fitopatógenos / Secuencias de concenso ITS, pág 99).

1.2.2.2 Selección de aislado para experimentos detección actividad antifúngica

De acuerdo a la información entregada por CER y a un análisis preliminar realizado (tests con nistatina, data no mostrada), se observa que los distintos aislados presentan distinta resistencia frente a antifúngicos. Los posteriores ensayos de actividad antifúngica requerirán contar con un aislado caracterizado. La detección de actividad antifúngica depende de diversos factores ambientales que determinan el tipo y concentración de moléculas con dicha actividad. Por tanto, un halo de inhibición da cuenta tanto del tipo como de la concentración de uno o más compuestos antifúngicos. Es por esto que halos de distinto tamaño no determinan que necesariamente una cepa produzca un compuesto más bioactivo que otro ya que un halo pequeño puede estar determinado exclusivamente por una baja producción de cierto metabolito en esas condiciones. Con la finalidad de detectar la gama más amplia de compuestos, se busca seleccionar el aislado de botritis con mayor sensibilidad a antifúngicos. Al mismo tiempo se define el más resistente (menor sensibilidad) para futuros ensayos con compuestos purificados. Para esto se monta un experimento utilizando *S. noursei* y *S. sp G23* como biocontroladores contra los 10 aislados de *Botrytis* según el protocolo Protocolos bioensayos, pág 96. Los resultados se muestran en la Figura 7. A partir de estos resultados se selecciona el aislado 1 como el más resistente y el 6 como el más sensible.

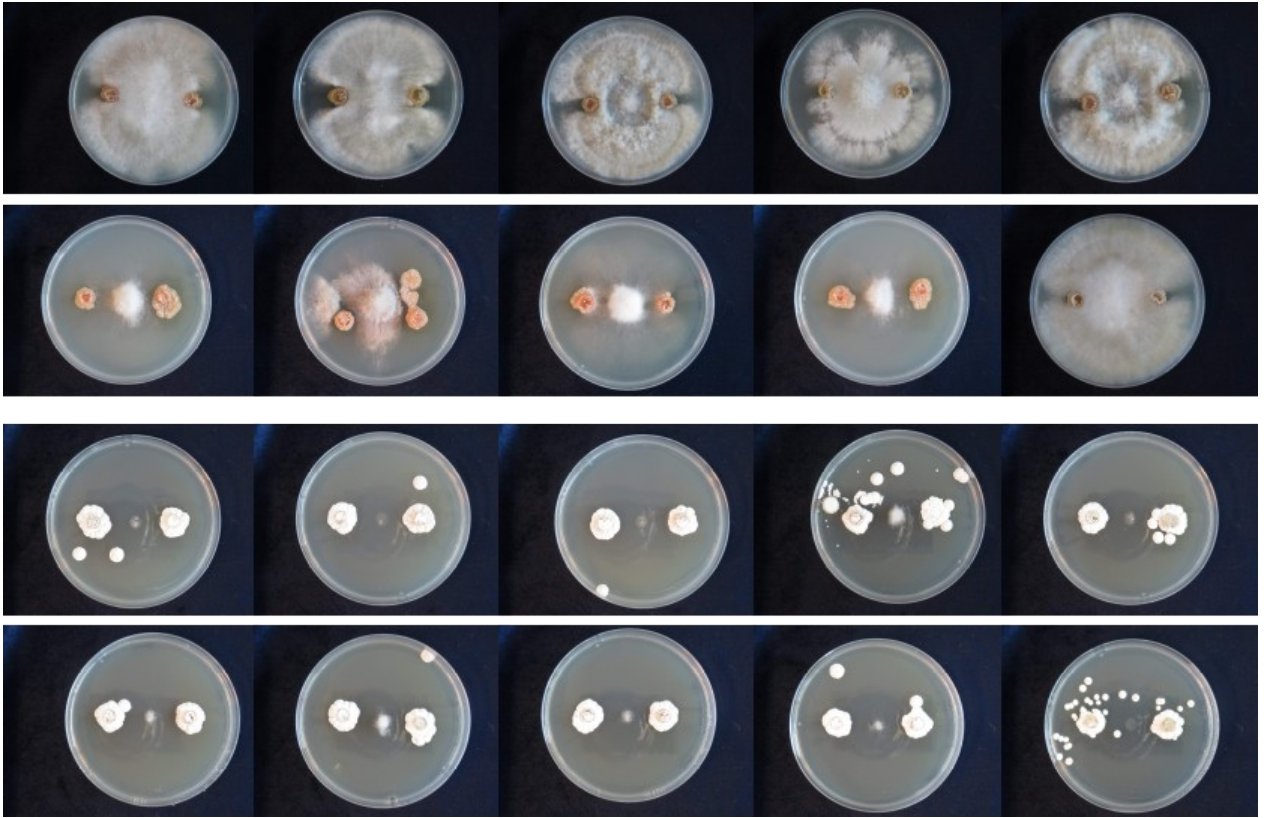


Figura 7: Bioensayo Botrytis CER

FIL 1 y 2 : *S. sp G23*. Fil 3 y 4: *S. noursei*. COL 1 – 5 en FIL 1 y 3: *B. cinerea sp.* 1-5. COL 1 – 5 en FIL 2 y 4: *B. cinerea sp.* 6-10.

1.3 Colección de *Streptomyces*

El grupo de bioprospección de actinomicetos (GBA) del Centro de Bioingeniería y Biotecnología (CeBiB) de la Universidad de Chile cuenta con una colección de aislados que – dada la metodología de aislamiento y sus características fenotípicas – deberían pertenecer al filo de Actinomycetota, particularmente *Micromonospora* y *Streptomyces*.

En esta sección se persigue generar una sub-colección definida por la actividad antifúngica de estos extractos mediante ensayos (Sección 1.4, pág 24) y una caracterización taxonómica de estos aislados basados en secuenciación de *DNA barcodes*.

1.3.1 Origen, aislamiento e identificación molecular

Streptomyces spp. fueron aisladas desde una muestra de suelo colectada desde rizósfera de una planta de Lupino (*Lupinus oreophilus*) ubicada en el ambiente poliextremo de Quebrada Nacimiento, Socaire, San Pedro de Atacama, Desierto de Atacama (2313700600S;6715005600W – 3.646 m.s.n.m.). El aislamiento fue realizado por el GBA del CeBiB siguiendo el protocolo detallado en Protocolos para la manipulación de *Streptomyces*, página 93.

1.3.2 Determinación taxonómica mediante secuenciación de 16S y BoxPCR

La taxonomía de los distintos aislados de interés originados de los ensayos de actividad antifúngica – sección 1.4, Ensayos de actividad antifúngica – fue determinada mediante secuenciación de 16S rRNA. El PCR fue realizado utilizando DNA genómico del aislado de interés obtenido utilizando el protocolo detallado en Protocolos para la manipulación de *Streptomyces*, página 93, con los partidores 27F y 1492R. El alineamiento de consenso fue utilizado para determinar su taxonomía a través de EzBioCloud database (Yoon et al., 2017). La identificación de cada aislado basado en secuenciación de 16S se muestra en la Tabla 4.

Uno de los aislados de alto interés basado en los resultados de actividad antifúngica es G35A. De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 4, esta cepa comparte alta identidad con *Streptomyces asenjonii*, basado en secuenciación de 16S (un árbol filogenético para este alineamiento se muestra en la Figura 45, pág. 104). Sin embargo, es común que entre especies distintas pueda existir alta identidad de 16S dentro de este género. Como medida previa a la secuenciación, se decide realizar un BoxPCR para discriminar si G35A y *Streptomyces asenjonii* corresponden o no a la misma especie. Para esto se utiliza el protocolo detallado en la sección Protocolos para la manipulación de *Streptomyces*, página 93. La electroforesis resultante – ver Figura 8 – muestra que la cepa G35A genera un patrón distinto a *Streptomyces asenjonii* por lo que es posible que se trate de otra cepa.

Otro de los aislados de alto interés basado en los resultados de actividad antifúngica es S29. De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 4, esta cepa comparte alta identidad con *Streptomyces colombiensis*, basado en secuenciación de 16S (un árbol filogenético para este

alineamiento se muestra en la Figura 46, pág. 105). Sin embargo, este porcentaje de similaridad es común incluso entre especies distintas de este género.

Tabla 4: Identificación de aislados de interés basado en secuenciación de 16S usando la base de datos EzBioCloud

Name	Top-hit taxon	Top-hit strain	Similarity (%)	Completeness (%)
G22	<i>Streptomyces plumbiresistens</i>	CCNWHX 13-160	96.46	98.5
G23	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	DSM 40212	96.97	98.4
G26	<i>Streptomyces asenjonii</i>	KNN 35.1b	99.78	94.1
G35A	<i>Streptomyces asenjonii</i>	KNN 35.1b	99.84	91.5
G40_A	<i>Methylobacterium phyllostachyos</i>	BL47	99.01	94.1
S17	<i>Streptomyces colombiensis</i>	NRRL B-1990	96.68	96.5
S20	<i>Streptomyces colombiensis</i>	NRRL B-1990	96.68	96.7
S24	<i>Streptomyces cremeus</i>	NBRC 12760	96.39	95.4
S25	<i>Streptomyces longwoodensis</i>	DSM 41677	99.5	99.7
S29	<i>Streptomyces colombiensis</i>	NRRL B-1990	96.68	96.5
S34	<i>Streptomyces asenjonii</i>	KNN 35.1b	99.93	97.6
S5	<i>Streptomyces hundungensis</i>	MBRL 251	96.54	96.7
ST2S_12	<i>Streptomyces sparsus</i>	YIM 90018	99.82	78.8

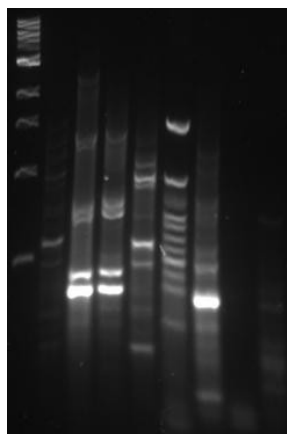


Figura 8: BoxPCR G35A y Streptomyces asenjonii

Col 1: 1kb ladder. Col 2: asenjonii 1. Col 3: asenjonii 2. Col 4: asenjonii 3. Col 5: asenjonii 4.
Col 6: 50pb ladder. Col 7: G35A. Col 8: S17. Col 9: S29

1.4 Ensayos de actividad antifúngica

El GBA del CeBiB cuenta con una colección de aislados que – dada la metodología de aislamiento y sus características fenotípicas – deberían pertenecer al filo de Actinomycetota, particularmente *Micromonospora* y *Streptomyces*.

En esta sección se persigue determinar la actividad antifúngica de estos extractos mediante diversos ensayos con el fin de acotar los aislados a estudiar mediante otras metodologías.

1.4.1 Determinación de la actividad antifúngica de aislados

1.4.1.1 Screening inicial de actividad antifúngica

A partir de la colección de *Streptomyces* colectada desde rizósfera de una planta de Lupino (*Lupinus oreophilus*), 80 aislados⁵ - más 4 controles positivos (*Streptomyces nodosus*, *Streptomyces natalensis*, *Streptomyces noursei* y cliclohexamida) y un control negativo (*Streptomyces coelicolor* M1152) -fueron testeados frente a 3 patógenos de importancia agronómica e industrial – *Penicillium rubens*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium Oxysporum*, todos de la colección UTEM – para determinar aislados con actividad antifúngica frente a estos patógenos de acuerdo a protocolo detallado en Protocolos bioensayos > Screening inicial de actividad antifúngica, página 96. El screening inicial de los aislados frente a *Penicillium rubens* (resultados en Figura 44, pág 103) arrojó los siguientes aislados positivos: G22 | G23 | S5 | S17 | S20 | S29. Una comprobación de esta actividad fue llevada a cabo utilizando placas individuales. Con estos resultados se pudo comprobar que las cepas S17 | S20 | S29 presentan un significativo halo de inhibición (Figura 9). Adicionalmente, se testeó los mismos aislados frente a *Botrytis cinerea* y *Fusarium Oxysporum*, resultando positivos G23 | S17 | S20 | S29 y S17 | S20 | S29, respectivamente (Figura 10).

5 Códigos de los aislados: G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | G7 | G8 | G9 | G10 | G11 | G12 | G13 | G14 | G15 | G16 | G17 | G18 | G19 | G20 | G21 | G22 | G23 | G24 | G25 | G26 | G27 | G28 | G29 | G30 | G31 | G32 | G33 | G34 | G35 | G36 | G37 | G38 | G39 | G40 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 | S21 | S22 | S23 | S24 | S25 | S26 | S27 | S28 | S29 | S30 | S31 | S32 | S33 | S34 | S35 | S36 | S37 | S38 | S39 | S40

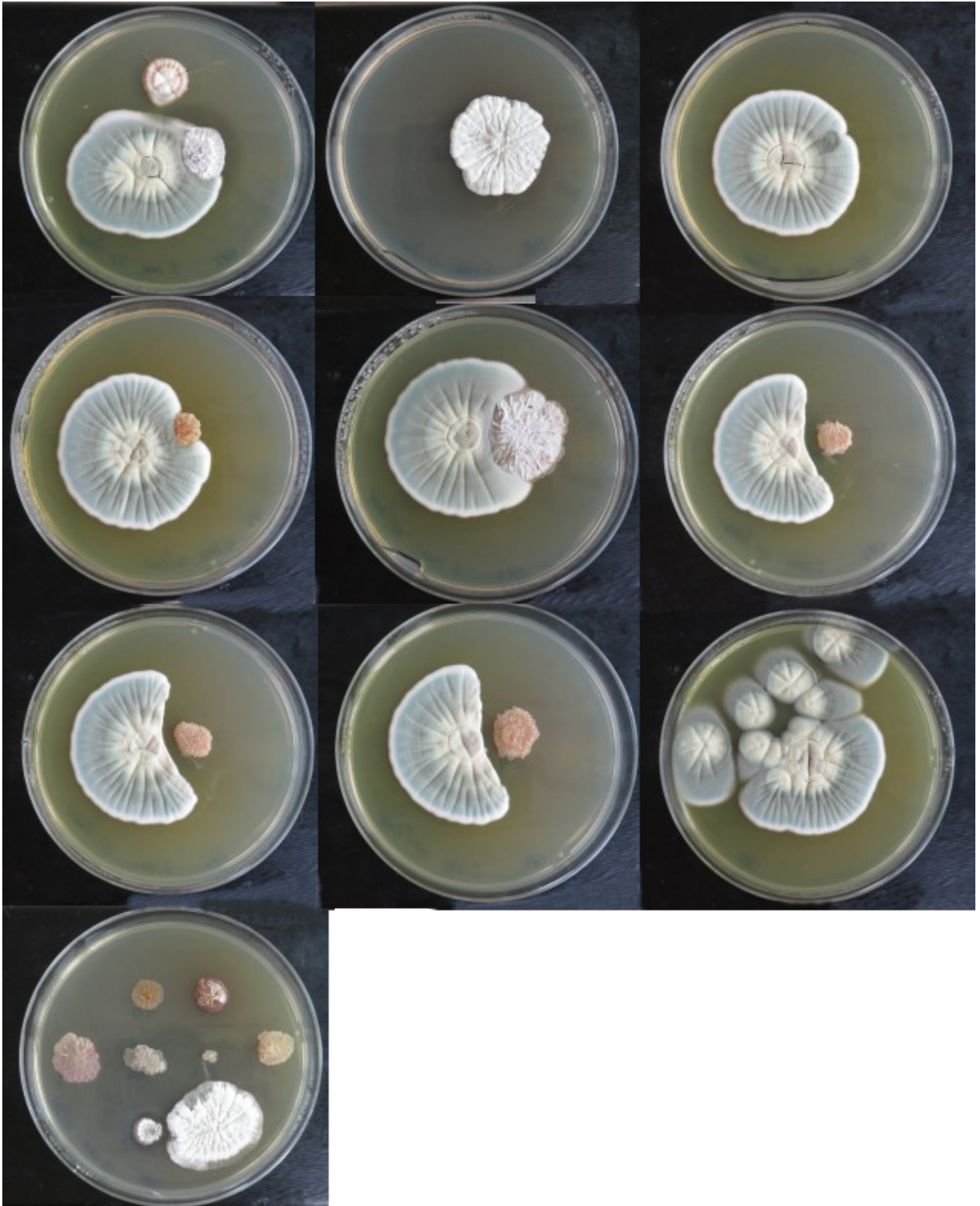


Figura 9: Screening actividad antifúngica cepas seleccionadas frente a Penicillium rubens

Izq-Der / Arriba-Abajo: M1152 | B1714 | G22 | G23 | S5 | S17 | S20 | S29 | C- (solo *Penicillium rubens*) | Todos los controladores en una misma placa (Control de crecimiento): G22 | G23 | S5 | S17 | S20 | S29 | M1152 | B1714

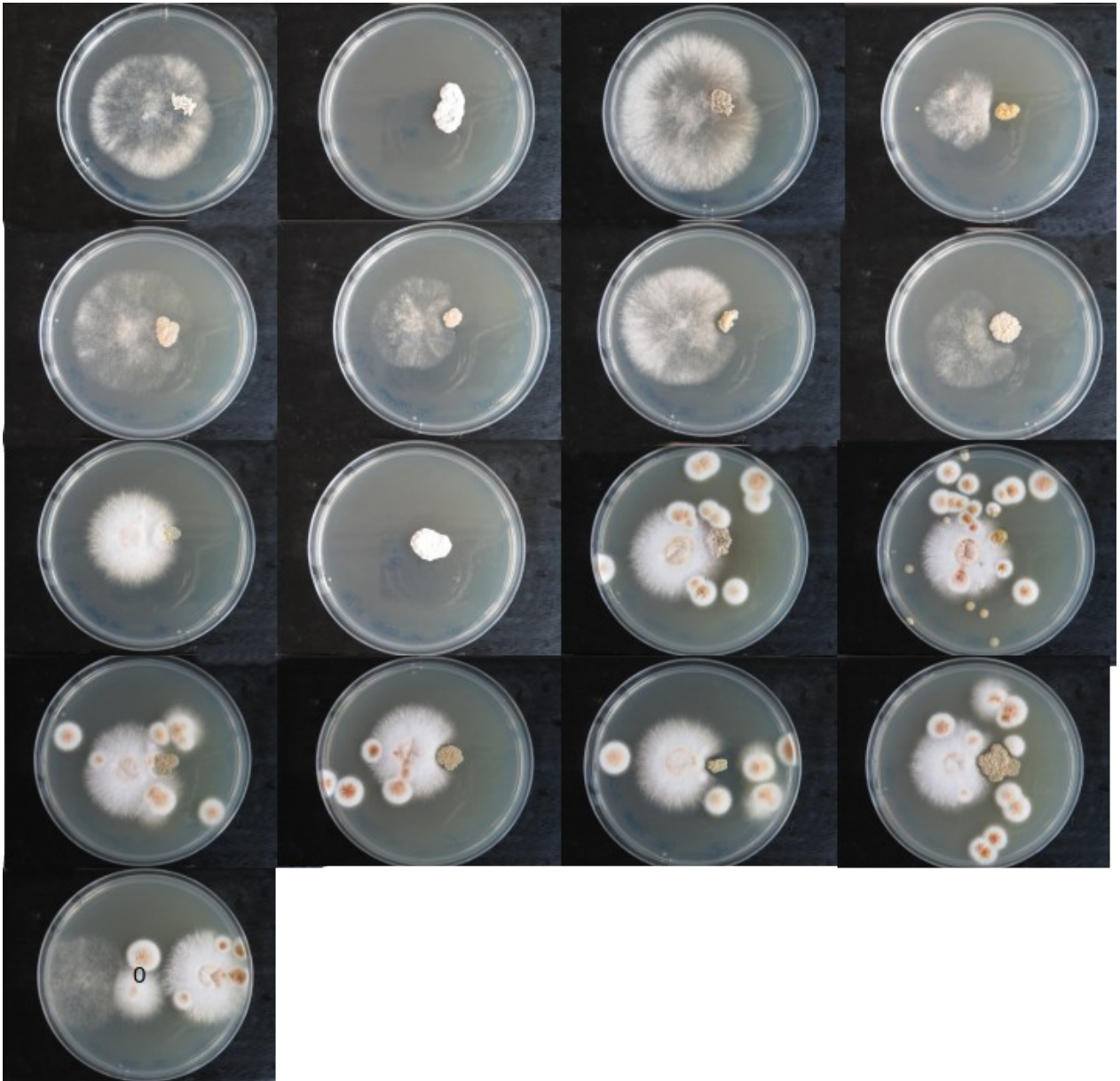


Figura 10: Screening actividad antifúngica cepas seleccionadas frente a *Botrytis cinerea* y *Fusarium Oxysporum* (colección UTEM)

Izq-Der / Arriba-Abajo / Fila 1 y 2: Patógeno: *Botrytis cinerea*. M1152 | B1714 | G22 | G23 | S5 | S17 | S20 | S29 Izq-Der / Arriba-Abajo / Fila 3 y 4: Patógeno: *Fusarium Oxysporum*. M1152 | B1714 | G22 | G23 | S5 | S17 | S20 | S29. Fila 5: Solo los patógenos: *Botrytis cinerea* y *Fusarium Oxysporum* (Control crecimiento)

1.4.1.2 Ensayo *Botrytis* CER

Cepario completo Lupino

De acuerdo al protocolo detallado en Protocolos bioensayos > Cepario completo Lupino, página 96, el cepario completo de Lupino (88 *Streptomyces*, 62 *Micromonosporas*) fue testado por su posible capacidad controladora del patógeno *Botrytis cinerea* aislado 1 (seleccionado previamente como el de mayor resistencia a nistatina) de la colección CER. Los resultados de las placas en que se detecta actividad se muestran en la Figura 11. Las placas sin actividad no se muestran.

Selección de cepario Lupino en PDA

De acuerdo al protocolo detallado en Protocolos bioensayos > Selección de cepario Lupino en PDA, página 96. Algunos aislados seleccionados son testados por su posible capacidad controladora del patógeno *Botrytis cinerea* aislado 1 (seleccionado previamente como el de mayor resistencia a nistatina) de la colección CER. Con el fin de favorecer crecimiento del patógeno, el experimento se realiza en medio PDA. Los resultados de las placas en que se detecta actividad se muestran en la Figura 12. Las placas sin actividad no se muestran.

Sobrenadante de cultivo de selección de cepario Lupino en PDA

De acuerdo al protocolo detallado en Protocolos bioensayos > Sobrenadante de cultivo de selección de cepario Lupino en PDA, página 97. Algunos aislados seleccionados son testados por su posible capacidad controladora del patógeno *Botrytis cinerea* aislado 1 (seleccionado previamente como el de mayor resistencia a nistatina) de la colección CER. Con el fin de favorecer crecimiento del patógeno, el experimento se realiza en medio PDA. En este experimento se analiza la presencia de compuestos biocontroladores en el sobrenadante de cultivo líquido de los aislados. Los resultados de las placas en que se detecta actividad se muestran en la Figura 13. Las placas sin actividad no se muestran.

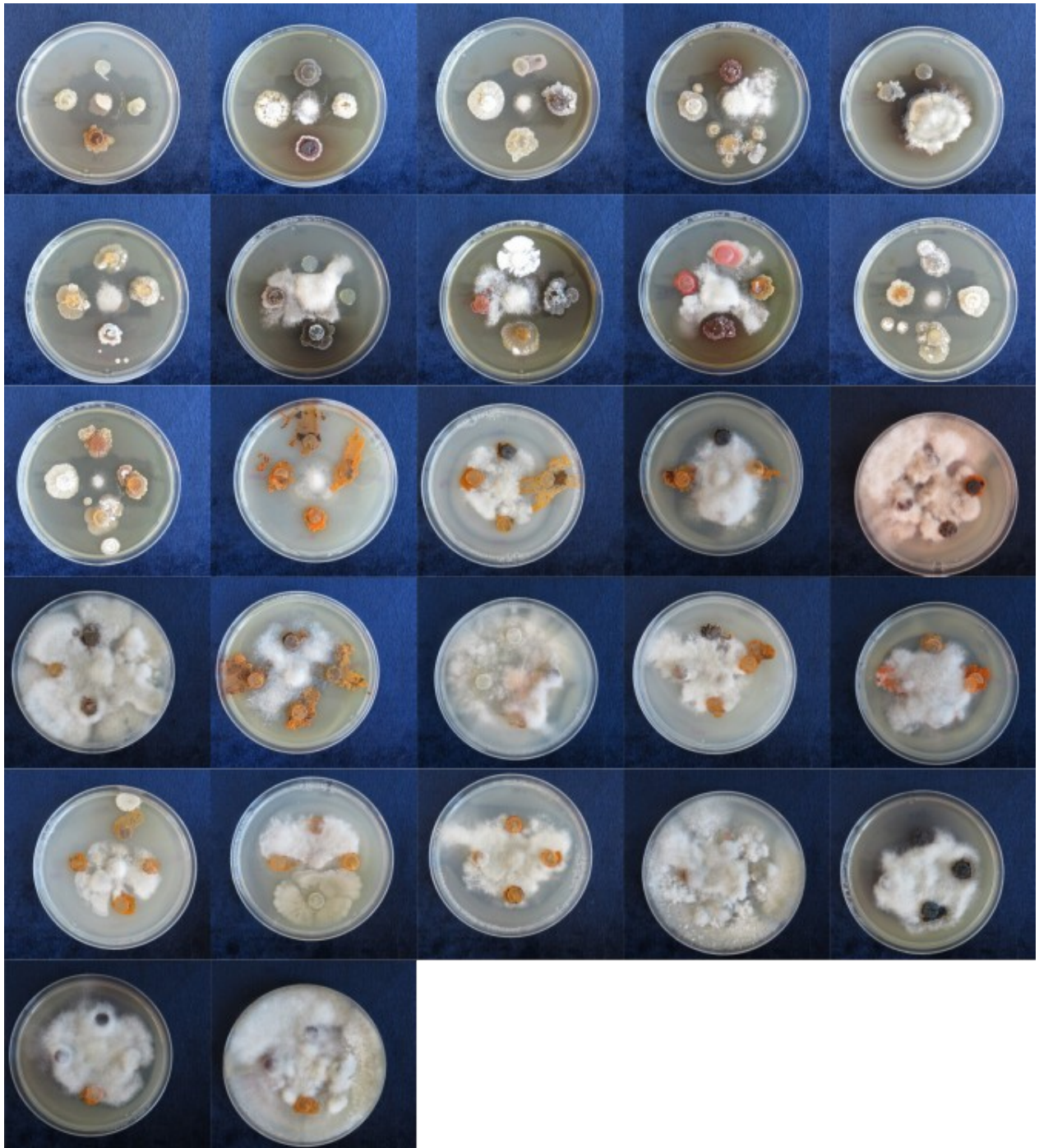


Figura 11: Bioensayo cepario Lupino como controlador de *Botrytis cinerea* aislado 1 (colección CER)

Selección de cepas con bioactividad significativa. De arriba a abajo, de izquierda a derecha, en sentido levógiro a partir del plug superior de cada placa, entre paréntesis el medio de la placa: (19) S17 | S18 | S19 | S20, (ISP2) S24 | S25 | S26B | S27B, (ISP2) S26C | S28 | S29 | S31, (ISP2) S33 | S34 | S36, (19) 19 | G40B, (ISP2) S13 | S14 | S15 | S16, (ISP2) S17 | S18 | S19 | S20, (ISP2) S3 | S6 | S7 | S9, (ISP2) G8-2 | G8-3 | G9 | G10, (ISP2) G28 | G29 | G30 | G31, (ISP2) G36 | G37 | G38 | G39, (333) - | - | -, (333) M5 | M6 | M7 | M8, (GYM) M5 | M6 | M7 | M8, (333) MS1 | MS3 | MS4 | MS5, (333) - | - | -, (GYM) - | - | -, (333) M9 | M10 | M11 | M12, (333) M13 | M14 | M15 | M17, (GYM) M20 | M21 | M22 | M23, (333) M20 | M21 | M22 | M23, (333) M24 | M25 | M27 | M29, (333) M30 | M31 | M32 | M33, (333) M39 | M44 | M45 | M46, (GYM) MS1 | MS3 | MS4 | MS5, (GYM) M47 | M48 | M49 | M50, (333) M34 | M48 | M49 | M50

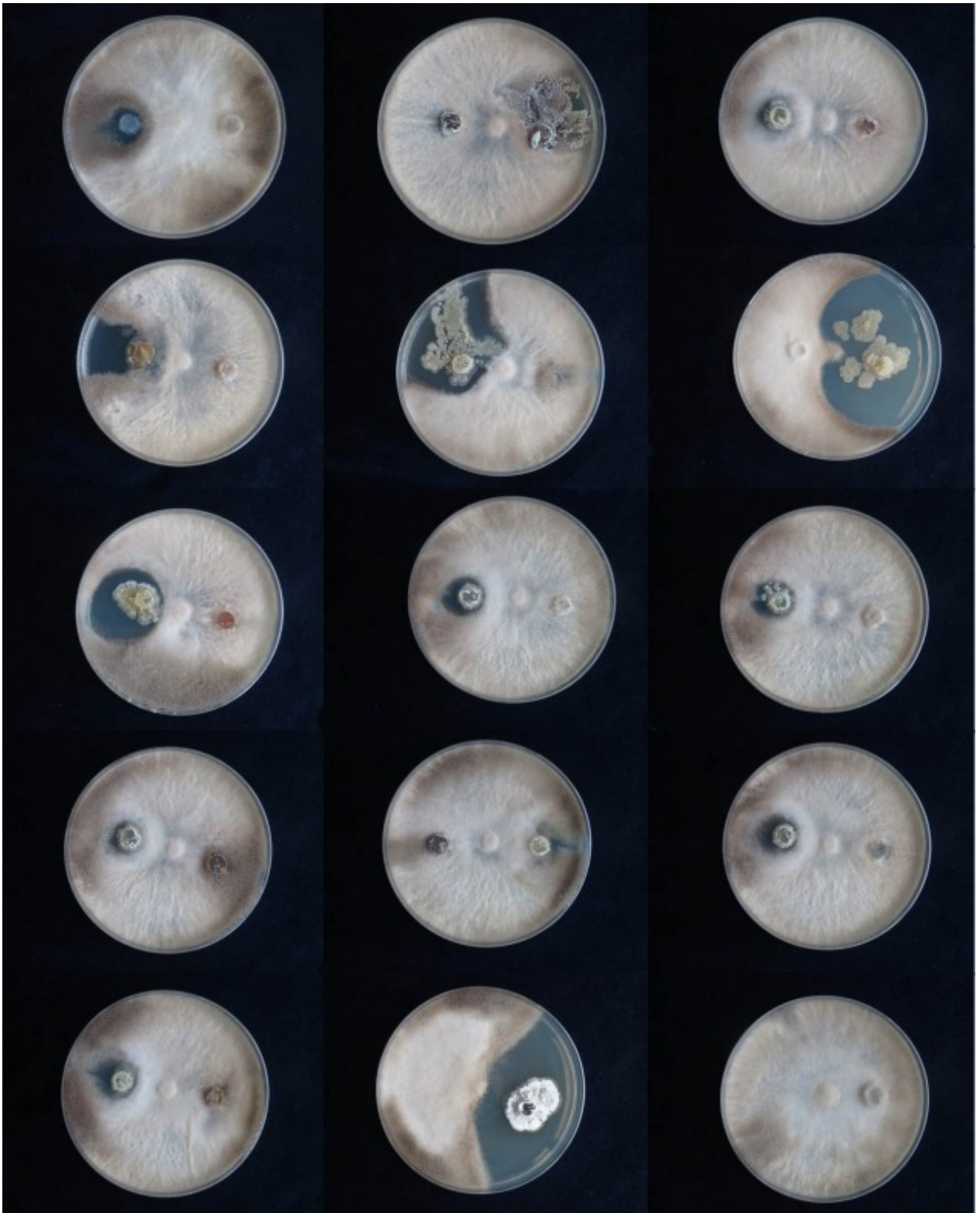


Figura 12: Bioensayo selección cepario Lupino como controlador de Botrytis cinerea aislado 1 (colección CER)

Botrytis cinerea aislado 1 (colección CER). Controladores (izq-der, arriba-abajo): S19 | S23A | S26B | S25 | G28 | G29 | S29 | S34 | G24 | G25 | G26 | G30 | G33 | G35A | G36 | G37 | S. noursei | C (-)

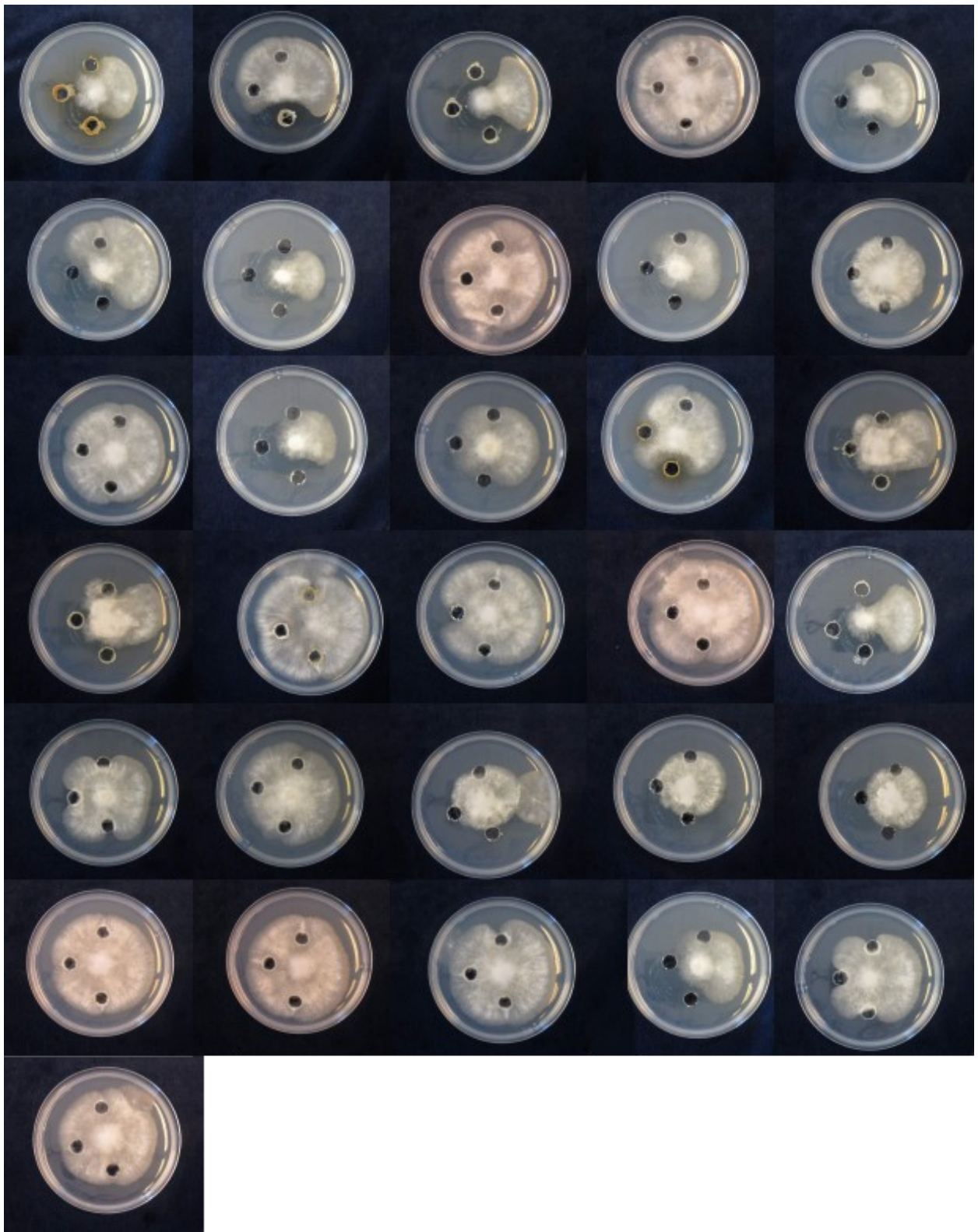


Figura 13: Bioensayo sobrenadante de cultivo selección cepario Lupino como controlador de Botrytis cinerea aislado 1 (colección CER)

(400) S1 | S24 | S28 | S29 (OM) ST25_12 | S34 | S29 | S28 | S26_B | S27 | S24 | S20 | S17 | S1 (400) G35A | G34 | G32 | G31 | G26_B | G24 (OM) G8_3 | G1 | G40_A | G35A | G34 | G32 | G31 | G26_B | G24 | G8_3 | G1

Tabla 5: Resumen bioensayo sobrenadante de cultivo selección cepario Lupino como controlador de *Botrytis cinerea* aislado 1 (colección CER)

Cepa / Dias	ISP2			M400			OM		
	3	5	10	3	5	7	3	5	7
Noursei	-	+++	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
G1	-	+++	++	-	-	-	-	-	-
G8-3	-	+	-	-	-	-	-	-	-
G24	-	++	-	+++	+++	+++	-	+	++
G26	-	+	-	-	-	-	-	-	-
G31	++	++	+	-	+	-	-	-	-
G32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G34	-	+	++	-	+	+	-	-	+
G35A	-	++	++	-	-	+	-	-	+
G37	-	-	-	-	++	+++	-	-	-
G40A	+	++	-	-	+	+	-	-	+
S1	+	-	-	-	+	++	-	+	+
S17	+	+	-	+++	+++	+++	-	-	+
S20	++	+++	++	+++	+++	+++	-	++	+++
S24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S25	++	++	++	-	+	-	-	-	-
S26b	-	-	-	+++	++	+++	-	+	++
S28	++	++	+++	-	-	+++	-	-	-
S29	+	-	-	+++	++	+++	+	++	+++
S34	+	+	++	-	++	+++	-	+	++
ST2S-12	++	+	-	++	+++	+++	-	++	+++

1.4.2 Determinación de la actividad antifúngica de extractos fraccionados

Cultivos de S29 y de *Streptomyces noursei* – utilizada como control positivo por producción de nistatina – con 7 días de crecimiento en ISP2 a 30°C fueron utilizados para fraccionamiento con solvente utilizando el método de Kupchan UPO (Figura 14) (*The Art and Science of Natural Products Purification: Basic Preparative Phytochemistry for Plant Scientists Participants' handbook*, 2016). Para esto se utilizó 50 ml de cultivo inicial combinado con 10 mL de metanol. Las fracciones obtenidas fueron utilizadas para un ensayo de determinación de actividad antifúngica con *Botrytis cinerea* como patógeno, según protocolo en sección Protocolos para la manipulación de Streptomyces, página 93. Los resultados (Figura 15) no muestran actividad significativa en ninguna fracción. Correcciones a la metodología podrían permitir detectar la fracción de interés.

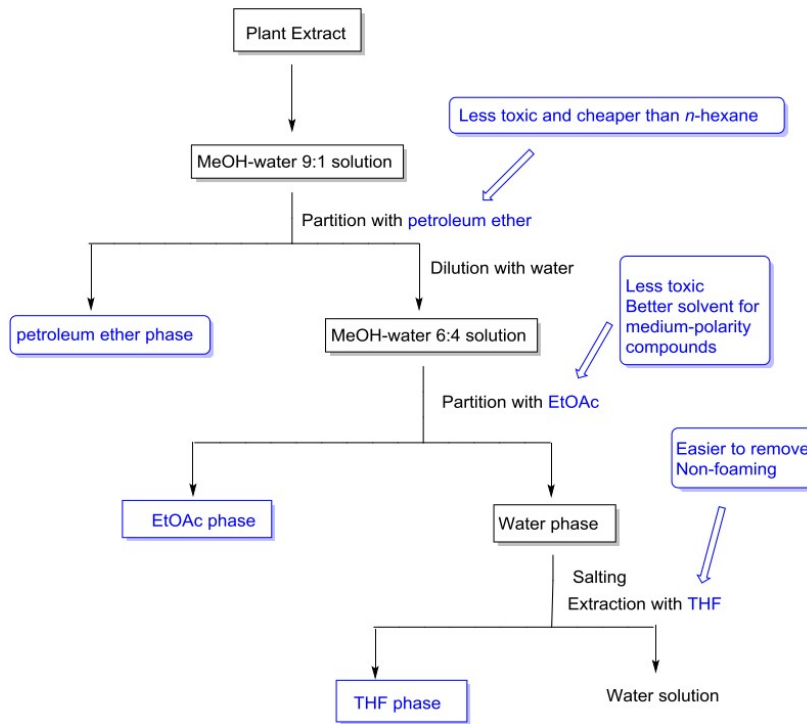


Figura 14: Kupchan-UPO partition

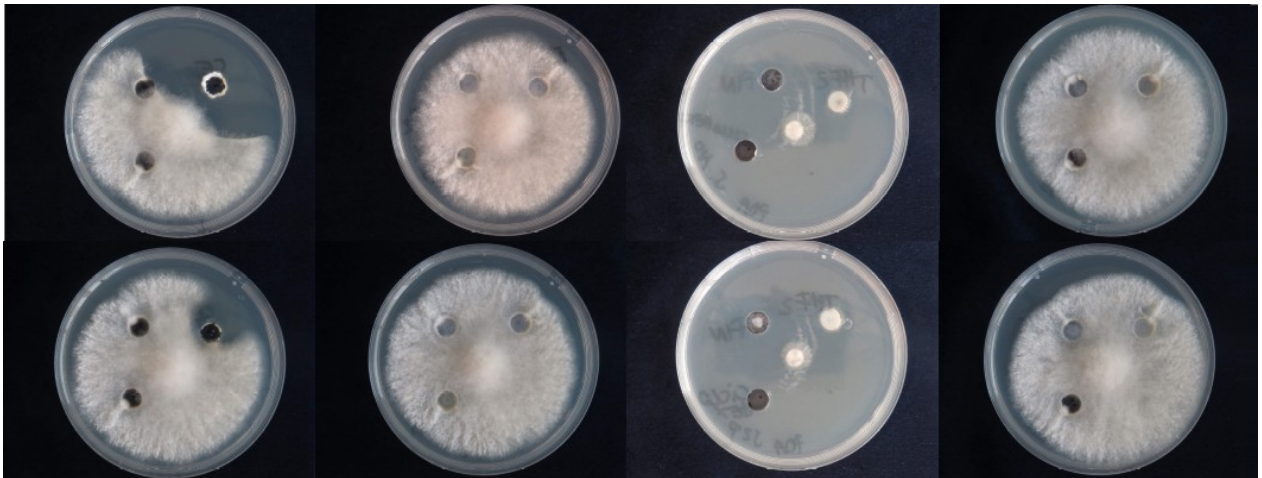


Figura 15: Ensayo antifúngico de fraccionamiento de sobrenadante de S29 y *S. noursei* (C+) mediante Kupchan UPO con *B. cinerea* como fito-patógeno

Arriba: *S. noursei*. Abajo: S29. Por columna / por pocillo desde el superior izquierdo en sentido dextrógiro: Placa 1: Extracto crudo / PE1 / PE 2. Placa 2: EtOAc 1 / EtOAc 2 / THF 1. Placa 3: THF 2 / Sobrenadante final / Ciclohexamida (control). PE: Petroleum Ether. EtOAc: Ethyl acetate. THF: Tetrahydrofuran.

1.4.3 Actividad antifúngica mediada por agotamiento de hierro debido a la producción de desferrioxaminas en S29

Como la mayoría de los organismos, prácticamente todas las bacterias necesitan hierro como cofactor en enzimas para catalizar reacciones redox involucradas en procesos celulares fundamentales como la respiración, la síntesis de DNA y la protección contra especies reactivas de oxígeno (ROS). Aunque el hierro es abundante en la corteza terrestre, su biodisponibilidad es generalmente baja debido a que el hierro existe principalmente en su estado férrico oxidado (Fe³(III)), que es en gran parte insoluble a niveles de pH básicos y neutros, condiciones que prevalecen en muchos hábitats naturales. Para hacer frente a la escasez de hierro, las bacterias han desarrollado una serie de mecanismos para adquirir este elemento del medio ambiente. Estos mecanismos incluyen la captación de hierro ligado a moléculas orgánicas como el citrato o el hemo, la absorción de hierro por sistemas de captación ligados a la membrana y la secreción de sideróforos. Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro que ayudan a la incorporación de este metal en condiciones de baja concentración en el medio. Corresponden a metabolitos secundarios que son producidos por prácticamente todas las bacterias y que eliminan el hierro de las reservas ambientales mediante la formación de complejos solubles de Fe(III) que luego son capturados activamente a través de receptores específicos (Kramer et al., 2020).

Las desferrioxaminas (DFO) son el grupo de sideróforos más común producido por *Streptomyces* spp. y se utiliza principalmente para la eliminación de Fe(III) así como algunos otros metales pesados. Dado que la mayoría de los organismos requieren Fe(III) para mantener diversas funciones vitales, a medida que un organismo captura hierro del medio para si mismo simultáneamente agota este recurso para otros organismos, haciéndolos potencialmente inviables (Sandy & Butler, 2009).

La maquinaria biosintética de las desferroxaminas ha sido bien estudiada y, como consecuencia, el potencial químico continúa expandiéndose. La especificidad de sustrato de las proteínas similares a DesC, similar a las transferasas dependientes de acil CoA, parece ser el factor clave en la producción de diversos patrones estructurales de las desferroxaminas. Se ha demostrado que DesC puede adaptarse a acetil, succinil y miristol-CoA. Además, las arildesferrioxaminas, aisladas primero de *Micrococcus luteus* KLE101122 y luego de *Streptomyces* sp. MA37 mostró una mayor flexibilidad de sustrato. La publicación describió un nuevo grupo de genes biosintéticos (BGC) que contenía un homólogo de DesC (LgoC) (Maglangit et al., 2019).

Con esto presente, se propuso explorar la producción de metabolitos secundarios que explicaran el alto nivel de control de *Streptomyces* sp. S29 sobre el crecimiento de diversos hongos, particularmente de *Botrytis cinerea*, observado en bioensayos en placa. El cocultivo de S29 con *Aspergillus niger* y *Botrytis cinerea* se llevó a cabo de manera que permitiera que S29 dominara el cultivo, provocando así una respuesta química en respuesta a la presencia de cada hongo. El fraccionamiento guiado por bioensayo no produjo compuestos característicos/principales como posibles agentes antifúngicos. Sin embargo, el plaqueo del cultivo posterior a la fermentación no mostrará crecimiento fúngico. Se utilizó luego LC-MS/MS de alta resolución – cromatografía en

fase reversa con fase móvil de acetonitrilo (5% → 100%) - seguido por análisis redes moleculares GNPS para estudiar la diversidad molecular con más detalle. Los resultados indicaron que *Streptomyces* sp. S29 es extraordinario en la producción de sideróforos de hidroxamato, con un total de 24 nuevos análogos y 8 identificados previamente – confirmados a través de la elucidación de la estructura de MS/MS – y que además utiliza la producción de sideróforos como un medio para "matar de hambre" por agotamiento de hierro a los hongos presentes en el cultivo. Cuando se cultivaron en co-cultivo con los hongos se identificaron 22 nuevos análogos adicionales y 17 adicionales descritos anteriormente. Esto es una clara muestra de una respuesta química frente a los hongos en el cultivo. Usando MS2LDA para explorar más a fondo el espacio químico de la desferroxamina, se observó que este es potencialmente 2,5 veces más grande de lo previsto anteriormente. Estos resultados apuntan al potencial de *Streptomyces* sp. S29 como agente de control biológico para prevenir infecciones fúngicas y el potencial de una nueva química de desferroxamina.

Este trabajo dio origen a una publicación (Jarmusch et al., 2021).

1.4.4 Análisis de redes moleculares revelan compuestos de interés en G35A

La anfotericina B es un compuesto antifúngico – producido por *Streptomyces nodosus* – utilizado para el tratamiento de diversas infecciones fúngicas. En particular, la anfotericina B es capaz de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* (MIC 2 mg/L)⁶.

El análisis de redes moleculares permite que a partir de las características estructurales de un compuesto – determinadas a partir de patrones de fragmentación de espectrometría de masas – este pueda ser vinculado a compuestos similares. A través de una colaboración con el Jaspars Lab, Marine Biodiscovery Centre, Aberdeen University, algunos de los aislados de interés fueron analizados mediante LC-MS/MS. A partir de un análisis de redes moleculares obtenido con estos datos para la cepa G35A, se pudo determinar que los nodos en verde (compuestos producidos por G35A) que se observan en la Figura 16 están estructuralmente relacionados con un derivado de anfotericina B. A partir de esta información es posible rastrear las masas responsables de los nodos y usar la espectrometría de masas para guiar el aislamiento de los compuestos. Toda la red (>1000 compuestos) muestra una gran variedad de nuevos compuestos químicos que no se han identificado en la biblioteca de GNPS, por lo que es de esperar que haya algunos compuestos antifúngicos que no tengan relación con la nistatina presente en los extractos. A partir de estos datos es posible determinar que G35A puede tener un potencial de particular interés de estudio.

6 <http://antibiotics.toku-e.com/>

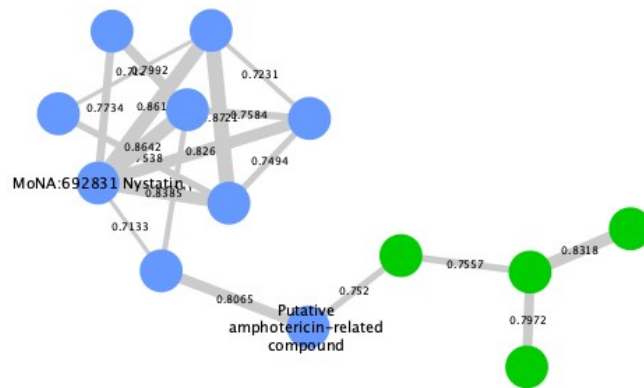


Figura 16: Redes moleculares revelan compuestos de interés en G35A

Capítulo 2

Identificación de clústers biosintéticos

2.1 Introducción

2.1.1 Ensamblaje *de novo* de genomas combinando Illumina y Nanopore

Entre las plataformas más populares de NGS destacan dos tecnologías. Por un lado, los instrumentos Oxford Nanopore son ideales para secuenciar fragmentos cortos a ultralargos de DNA o RNA nativo para diversas aplicaciones. La principal limitación de esta secuenciación es la precisión de lectura, comparativamente más baja en comparación con la secuenciación de lectura corta. Las tasas de error de inserción y elección relativamente más altas hacen que la secuenciación menos óptima para la detección de variaciones/polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), sin embargo, esto puede ser compensado con alta cobertura. Oxford Nanopore ha mejorado esta limitación con la última química R10.3, que permite un mayor rendimiento y captura y una *raw accuracy* mejorada para admitir *basecalling* de variantes mejoradas. Flongle es el más pequeño de los dispositivos, cuenta con un adaptador para las plataformas MinION /GridION y es mejor para la secuenciación de amplicones, un panel pequeño/secuenciación dirigida, pruebas de calidad para una ejecución piloto antes de un experimento de secuenciación más grande o ejecución de muestras individuales a pedido en lugar de multiplexación. El MinION es un instrumento también portátil pero más grande y se utiliza mejor para genomas completos, exomas completos, metagenomas, transcriptomas completos (cDNA), transcriptomas pequeños, secuenciación dirigida y multiplexación para muestras. GridION es un instrumento de mesón diseñado para ejecutar hasta cinco celdas de flujo MinION o Flongle, cada una de las cuales se puede controlar de forma independiente en tiempo real. El PromethION es el instrumento más grande y se utiliza para la secuenciación de alta cobertura. En este nivel, cada celda de flujo ofrece el precio más bajo por Gb para la secuenciación de nanoporos, lo que la hace ideal para genomas más grandes, experimentos a escala de población, genomas pequeños altamente multiplexados o regiones específicas y transcriptomas completos. Por otro lado, los instrumentos de Illumina son versátiles e ideales para una variedad de aplicaciones de secuenciación, incluido el ensamblaje, transcriptoma, detección de SNP y estudios metagenómicos. Los instrumentos HiSeq, Nextseq y GAIIX son adecuados para analizar genomas de animales o plantas de gran tamaño. Illumina MiSeq produce significativamente menos lecturas que HiSeq X, pero sus longitudes de lectura son significativamente más largas, lo que lo hace ideal para genomas pequeños, secuenciación de dominios variables largos o regiones específicas dentro de un genoma. De todos los instrumentos de Illumina, MiSeq es el más adecuado para amplicon-seq, 16S y otras aplicaciones basadas en lectura de baja diversidad. La única otra limitación

importante de los instrumentos Illumina son sus lecturas relativamente cortas (2x300 es actualmente la longitud de lectura final emparejada más larga de MiSeq)⁷.

Dado que en general lecturas más largas están asociadas a mayor tasa de errores, un ensamblaje *de novo* basado solo en lecturas largas necesitaría una mayor profundidad de lectura. Entonces, es posible combinar tecnologías de secuenciación y obtener un genoma de la más alta calidad. El ensamblaje híbrido puede combinar lecturas más cortas de alta calidad de Illumina con lecturas largas de Nanopore que son ideales para llenar los espacios entre contigs. La otra posibilidad es el ensamblaje basado en lecturas largas de Nanopore y mejorado con las lecturas cortas de alta calidad de Illumina, mediante un proceso llamado pulido (*polish*)⁸.

2.1.2 Predicción bioinformática de cluster de genes biosintéticos y anotación de genomas

El número de secuencias de genoma procariotas disponibles está creciendo de manera constante y más rápido que nuestra capacidad para anotarlas con precisión. RAST es un servicio automatizado para anotar genomas bacterianos y arqueales. El servicio identifica genes que codifican proteínas, rRNA y tRNA, asigna funciones a los genes, predice qué subsistemas están representados en el genoma. Luego utiliza esta información para reconstruir la red metabólica y genera archivos descargables con esta información (Aziz et al., 2008).

El *genome mining* ampliado sus aplicaciones en la identificación y caracterización de nuevos compuestos, así como en la ingeniería metabólica. AntiSMASH⁹ (antibiotics and secondary metabolite analysis shell) (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) es una herramienta – con acceso web e instalación local – que apoya este proceso. Se ha establecido como una de las la herramienta más utilizada para identificar y analizar clusters de genes biosintéticos (BGC) en secuencias genómicas bacterianas y fúngicas. Entre los clusters que es capaz de detectar, se encuentran¹⁰: Aminoglycoside/aminocyclitol cluster, Aryl polyene cluster, beta-lactone containing protease inhibitor, β -lactam cluster, Butyrolactone cluster, Ectoine cluster, D-amino-acid containing RiPPs, Fatty acid cluster, Furan cluster, Fungal RiPP, Cluster containing a halogenase and thus potentially generating a halogenated product, Homoserine lactone cluster, Indole cluster, Class I, II III, IV lanthipeptides, Lasso peptide cluster, Linear arid peptide, Lanthipeptide class containing N-terminal fatty acids, Melanin cluster, , Non-ribosomal peptide synthetase cluster, NRPS-like fragment, Oligosaccharide cluster, PKS cluster, Type I, II, III PKS, Terpene, Trans-AT PKS fragment, entre muchos otros (Blin et al., 2021).

7 <https://genohub.com/ngs-instrument-guide/>

8 <https://www.seqme.eu/en/magazine/combining-illumina-and-ont-reads-makes-your-de-novo-assembly-successful>

9 <https://antismash.secondarymetabolites.org/>

10 Entre muchos otros: <https://docs.antismash.secondarymetabolites.org/glossary/#clustertypes>

2.1.3 CRISPR en *Streptomyces*

Si bien las últimas décadas de estudio podrían sugerir que la disponibilidad de productos naturales de *Streptomyces* se está agotando, los esfuerzos de secuenciación genómica han revelado existe aún una tremenda disponibilidad, incluso en las cepas más estudiadas. El acceso a esta los BGC crípticos de productos naturales no caracterizados se beneficiarían enormemente del desarrollo de nuevas herramientas de manipulación genética que aprovechan la información genómica para ayudar al descubrimiento, la caracterización, la ingeniería y la producción de productos naturales. En las cepas de producción heteróloga, dichas técnicas permitirían facilitar la remodelación genómica para dirigir el flujo metabólico hacia una vía de interés y eliminar las vías alternativas, así como la ingeniería de vías para la diversificación de productos. No obstante, el actual conjunto de herramientas genéticas de *Streptomyces*, aunque bien desarrollado y ampliamente empleado, normalmente exige una inversión significativa de tiempo y esfuerzo en su aplicación. Para la interrupción de genes en *Streptomyces*, se suele emplear la integración por recombinación de un plásmido suicida, lo que da como resultado la interrupción del gen de interés con un marcador de selección. Sin embargo, el número limitado de marcadores seleccionables limita la reutilización de esta alternativa. La incorporación de sitios *target* flanqueantes de recombinasa y la expresión de la recombinasa correspondiente pueden permitir el reciclaje de marcadores y mejorar la estabilidad de la mutación, pero esto exige pasos adicionales y deja una secuencia con cicatriz en el *target*. Como alternativa, se pueden realizar deleciones genómicas limpias a través de la integración de cruce doble. Sin embargo, este proceso de varios pasos suele requerir mucho trabajo y tiempo. Los sistemas de edición de genomas mediada por DSB (*double strand break*) a sido lograda en el último tiempo a través del sistema CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) / Cas (CRISPR associated proteins) tipo II – inicialmente caracterizado en *Streptococcus pyogenes*. Para lograr edición mediante DSB con CRISPR/Cas en *Streptomyces* se construyó el sistema de expresión pCRISPomyces (Figura 17). Se construyeron dos versiones del plásmido pCRISPomyces. pCRISPomyces-2 incluye un casete de expresión de sgRNA y la endonucleasa Cas9 con optimización de codones bajo promotores fuertes (Cobb et al., 2014).

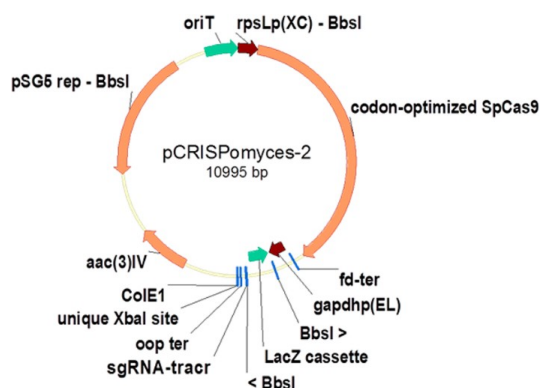


Figura 17: Plásmido *pCRISPomyces-2* para la edición dirigida del genoma en especies de *Streptomyces*.

Las características notables incluyen un cas9 optimizado por codón de *Streptococcus pyogenes*, un casete lacZ flanqueado por BbsI para el ensamblaje Golden Gate de secuencias espaciadoras, un sitio XbaI para agregar plantillas de edición y un origen pSG5 sensible a la temperatura.

2.2 Secuenciación genómica de *Streptomyces* sp. G35A y S29

En esta sección se documenta el proceso de secuenciación de dos cepas de interés mediante tecnologías Illumina y Nanopore.

2.2.1 Secuenciación Nanopore

Con el fin de realizar la secuenciación mediante Nanopore, DNA genómico de alto peso molecular fue obtenido mediante MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen)¹¹ a partir de cultivo líquido de las cepas en medio ISP2. La concentración y pureza del DNA genómico fue cuantificado mediante fluorometría (Qubit) y espectrometría (Nanodrop). Se seleccionó el Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109) de Nanopore¹² para la preparación de librería, dado que permite obtener gran cantidad de datos con largos de reads del tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos en la purificación. Se utilizó la celda Flowcell (r9.4.1). Para aumentar la cantidad de datos adquirida en el caso de la secuenciación de la cepa G35A, la Flowcell fue lavada (según protocolo Nanopore) y una segunda secuenciación fue realizada, utilizando la misma extracción de gDNA.

El histograma de los reads obtenidos se muestra para la secuenciación 1 de G35A en la Figura 18; para la secuenciación 2 de G35A en la Figura 19; y para la secuenciación de S29 en la Figura 20. El volumen de datos de salida se muestra para la secuenciación 1 de G35A en la Figura 47; para la secuenciación 2 de G35A en la Figura 48; y para la secuenciación de S29 en la Figura 49 en la

11 <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/magattract-hmw-dna-kit-48/>

12 <https://store.nanoporetech.com/ligation-sequencing-kit.html>

sección Anexos / Anexo G - Información suplementaria del Capítulo 2: Identificación de clústers biosintéticos (página 106).

El basecalling fue realizado por el software de control de dispositivos de Nanopore – MinKnow – mediante Guppy con workflow de calidad normal (no *high accuracy [hac]*).

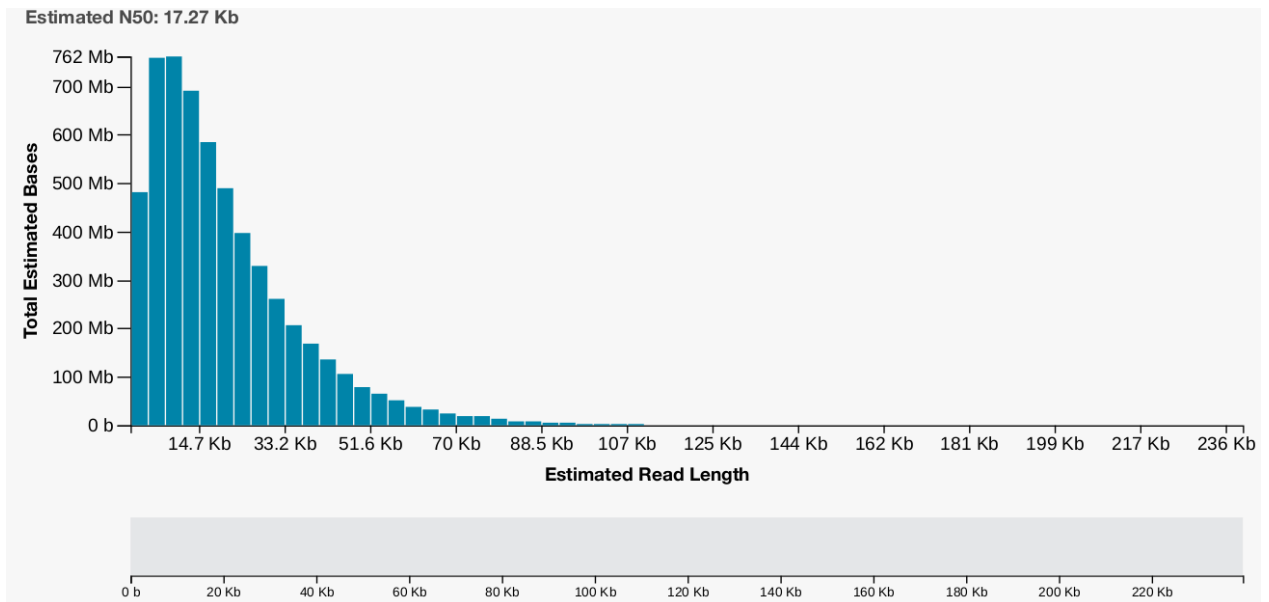


Figura 18: Histograma secuenciación por Nanopore cepa G35A / Secuenciación 1

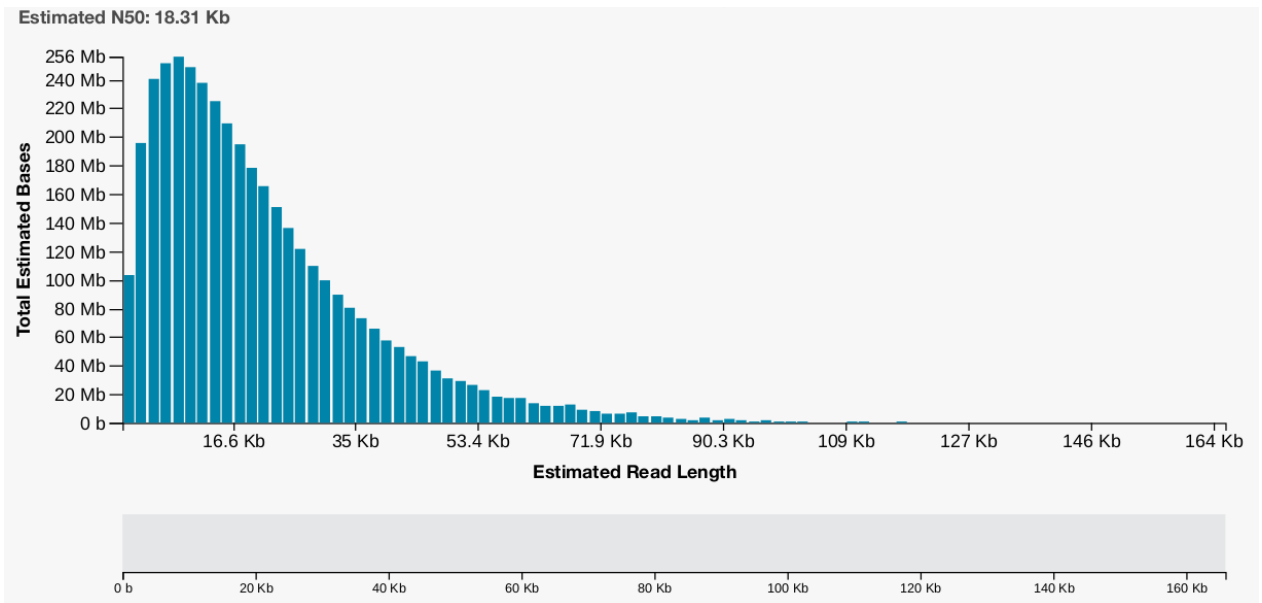


Figura 19: Histograma secuenciación por Nanopore cepa G35A / Secuenciación 2

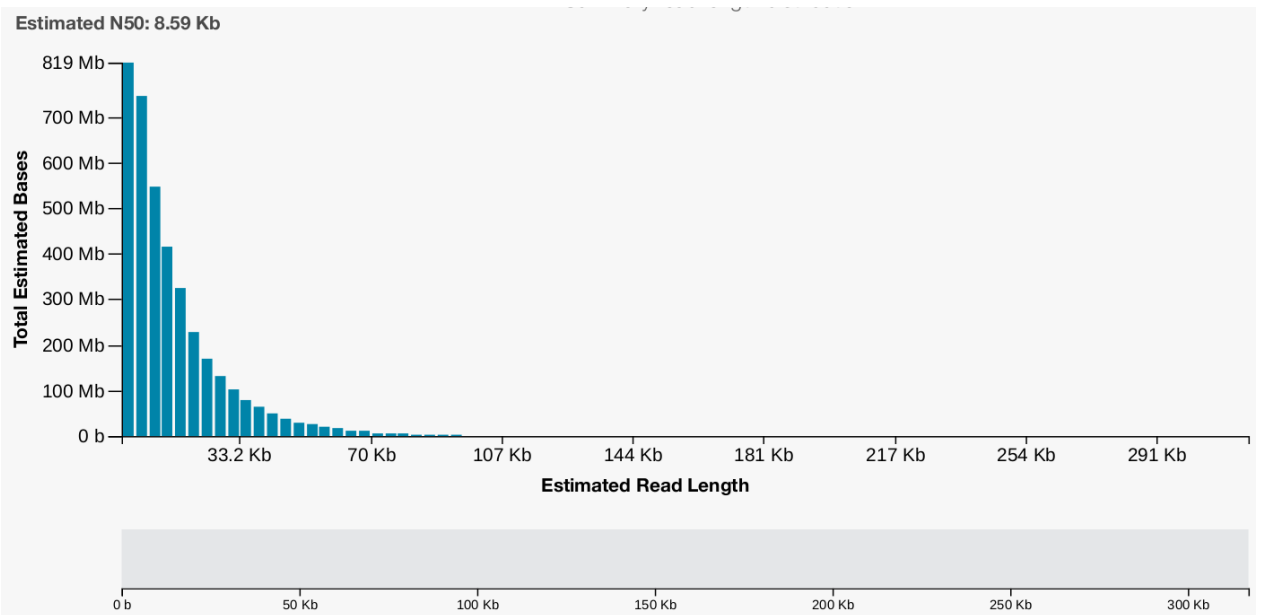


Figura 20: Histograma secuenciación por Nanopore cepa S29 / Secuenciación 1

2.2.2 Secuenciación Illumina

Con el fin de realizar la secuenciación mediante Illumina, DNA genómico fue obtenido mediante DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen)¹³ a partir de cultivo líquido de las cepas en medio ISP2. La concentración y pureza del DNA genómico fue cuantificado mediante fluorometría (Qubit) y espectrometría (Nanodrop). La secuenciación Illumina fue ejecutada por Genoma Mayor¹⁴, Universidad Mayor, Chile utilizando el TruSeq Nano DNA LT Kit¹⁵ en un Illumina MiSeq System.

A continuación se detallan algunos parámetros de la preparación de librería y output de secuenciación. Más detalles se muestran en Anexos / Anexo G - Información suplementaria del Capítulo 2: Identificación de clústers biosintéticos / ii - Secuenciación Illumina (página 106).

Cepa G35A.

- Concentración: 27,20 nM
- Tamaño promedio genoteca: 642 bp
- Index: CAGATC
- Reads por muestra: 3.911.303
- Gb obtenidos: 0,548
- %Q30: 86,87

Cepa S29.

- Concentración: 20,24 nM
- Tamaño promedio genoteca: 663 bp
- Index: GATCAG
- Reads por muestra: 4.088.180
- Gb obtenidos: 0,585
- %Q30: 86,83

2.2.3 Ensamble genómico

El ensamble genómico *de novo* fue realizado utilizando el software Canu¹⁶, el pulido de contigs mediante Racon, el alineamiento de reads de Illumina usando BWA mem y la corrección de

13 <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powersoil-pro-kit/>

14 <https://genomamayor.com/>

15 <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/truseq-nano-dna.html>

16 <https://github.com/marbl/canu>. Documentación: <https://canu.readthedocs.io/en/latest/>

contigs con Pilon. Este pipeline se encuentra integrado en el ONT assembly and Illumina polishing pipeline¹⁷.

El ensamble mediante Canu arrojó 5 contigs (8.448.631 bp en total) y 2 burbujas (10.468 bp en total) a partir de 152.756 reads (1.600.003.571 bases; 200X coverage para un genoma de 8M) para G35A. Para S29 arrojó 17 contigs (7.203.751 bp en total) y 0 burbujas a partir de 376.602 reads (1.600.009.914 bases; 200X coverage para un genoma de 8M). Las figuras 21 y 22 muestran la distribución de los CDS y la desviación respecto del promedio de los contenidos de GC (gráficos realizados con DNA-plotter (Carver et al., 2009)).

¹⁷ <https://github.com/nanoporetech/ont-assembly-polish>

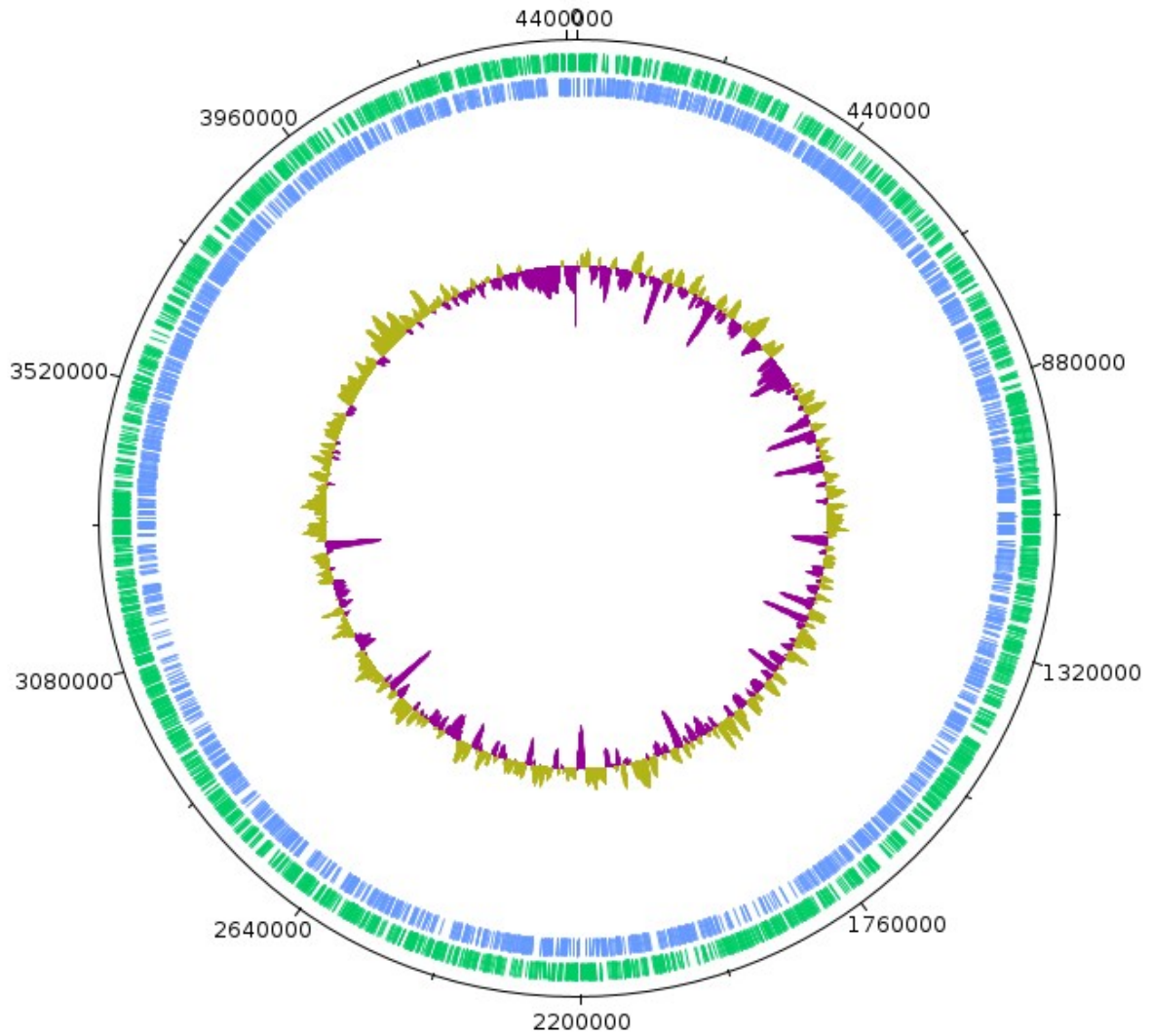


Figura 21: Distribución de CDS y contenido de GC para G35A (contig 1)

De afuera hacia adentro: CDS hebra positiva, CDS hebra negativa y contenido de GC (desviación respecto de la media)

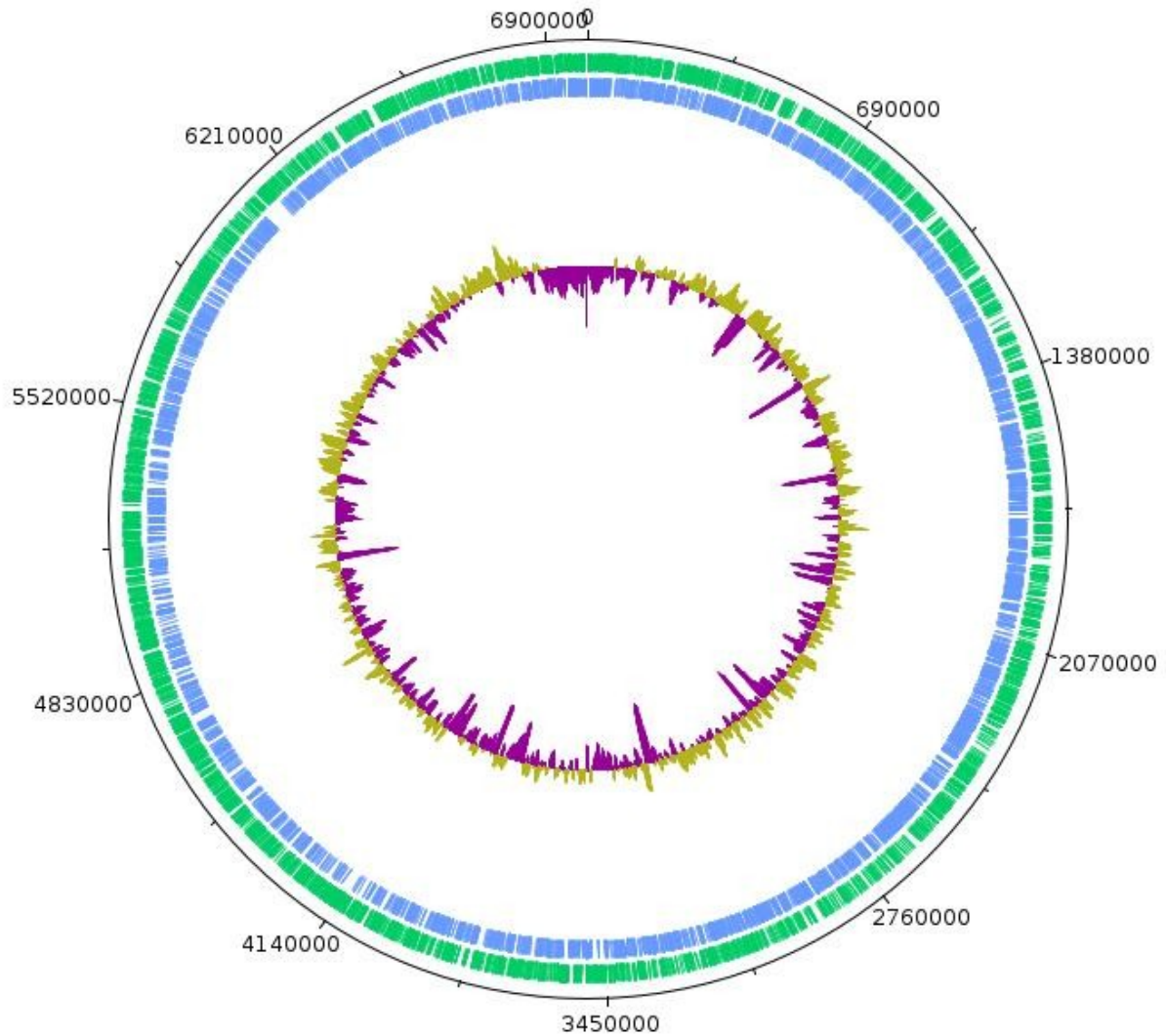


Figura 22: Distribución de CDS y contenido de GC para S29 (contig 1)

De afuera hacia adentro: CDS hebra positiva, CDS hebra negativa y contenido de GC (desviación respecto de la media)

Tanto los datos de secuenciación como ensamblajes están disponibles mediante solicitud vía correo electrónico¹⁸.

2.2.4 Anotación de genomas

Herramientas bioinformáticas disponibles en la web permiten la anotación de genomas completos en poco tiempo, lo que permite tener una visión general de la función de los genes codificados en

¹⁸ Diego Lagos <diego.lagos.s@ug.uchile.cl>

un genoma. Ejemplos de tales herramientas son la anotación rápida usando tecnología de subsistema (RAST) (Aziz et al., 2008). La aplicación de este software sobre el ensamblaje de los genomas entrega los resultados que muestra la para Figura 23 G35A y la Figura 24 para S29, dado cuenta del panorama general de clases funcionales. De acuerdo a esta distribución, los vecinos más cercanos de G35A serían *Streptomyces coelicolor* A3(2) y *Streptomyces avermitilis* MA-4680 con scores de 584 y 484, respectivamente. Para S29 son *Streptomyces avermitilis* MA-4680 y *Streptomyces scabiei* 87.22 con 547 y 529 de score, respectivamente.

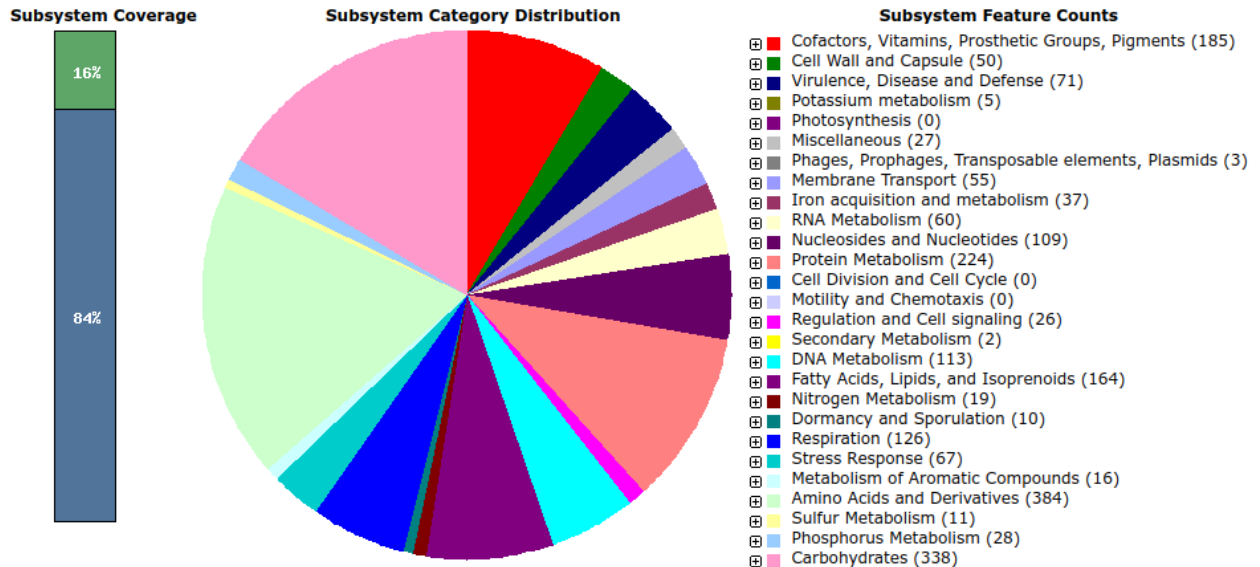


Figura 23: RAST G35A

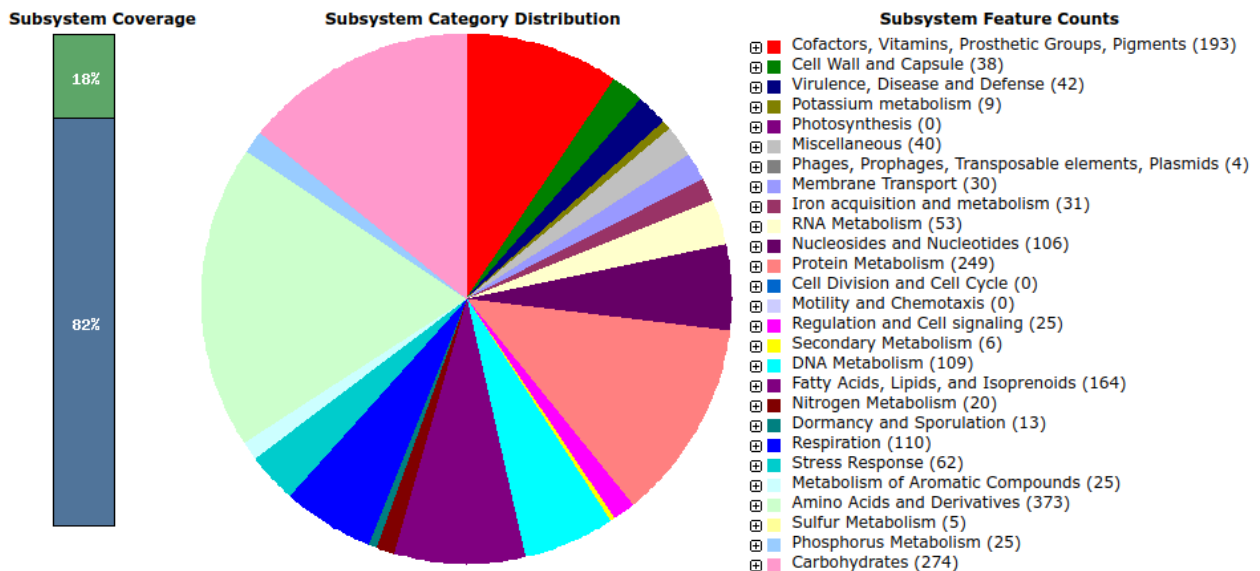


Figura 24: RAST S29

2.3 Predicción de clusters de genes biosintéticos

En esta sección se documenta el proceso de ensamblaje y anotación genómico junto a la predicción bioinformática de sus BGC.

2.3.1 Predicción de clusters de genes biosintéticos en *Streptomyces* sp. G35A

El ensamblaje genómico obtenido a partir de la secuenciación de *Streptomyces* sp. G35A mediante Nanopore e Illumina fue minado para identificar los cluster de genes biosintéticos responsables de la producción de metabolitos secundarios. Veintiseis clusters fueron identificados inicialmente mediante Antismash (Tabla 6) (Blin et al., 2021). Estos incluyen seis PKS, cinco NRPS y un RiPP, junto a otros clusters capaces de sintetizar otros compuestos como ectoína, caniferolide o desferrioxamina B.

Tabla 6: Cluster de genes biosintéticos para productos naturales en el genoma de *Streptomyces* sp. G35A.

Los clústeres fueron identificados por AntiSMASH2 y se enumeran en orden de aparición en la secuencia

Region	Tipo	Desde	Hasta	Cluster conocido más similar	Similitud
1.1	linaridin	191374	211973	pentostatine / vidarabine	9%
1.2	siderophore	1632674	1644446	desferrioxamin B / desferrioxamine E	83%
1.3	melanin	1738001	1745793	melanin	100%
1.4	ectoine	2699243	2709641	ectoine	100%
1.5	NRPS,T1PKS	3251999	3299107	antimycin	100%
1.6	terpene	3448283	3467091	daptomycin	6%
1.7	T2PKS	3587635	3660147	spore pigment	83%
1.8	melanin	3730049	3740210	melanin	42%
1.9	terpene	3886789	3907982	carotenoid	54%
1.10	NRPS	3953363	3997322	linfuranone B / linfuranone C	23%
1.11	lanthipeptide-class-iii	4036079	4058721	SapB	100%
1.12	T3PKS	4185849	4226937	alkylresorcinol	100%
1.13	NRPS,NRPS-like	4347841	4409822	vioprolide A	25%
2.1	terpene	601103	621901	albaflavenone	100%
2.2	siderophore	1165461	1175895		0%
2.3	RiPP-like	1380160	1390722		0%
2.4	terpene	1408260	1428537		0%
2.5	siderophore	1557066	1570170	grincamycin	8%
2.6	lassopeptide	1595652	1617271	citrulassin D	80%
2.7	terpene	1985355	2012123	hopene	92%
2.8	ectoine	2143683	2154096	ectoine	100%
2.9	hgIE-KS,PKS-like,T1PKS,NRPS	2181578	2280723	nataxazole	81%

2.10	RiPP-like	2436112	2446252	informatipeptin	42%
2.11	T1PKS,PKS-like,oligosaccharide	2673047	2829931	caniferolide A / caniferolide B / caniferolide C / caniferolide D	48%
3.1	terpene	251615	272658	phenalinolactone A	11%
3.2	T1PKS,NRPS, butyrolactone	285285	476791	pentamycin	60%

De acuerdo a los hallazgos realizados mediante HPLC-MS/MS y análisis de redes moleculares mediante en base de datos GNPS, G35A produce compuestos emparentados con anfotericina B (ver 1.4.4 Análisis de redes moleculares revelan compuestos de interés en G35A, pág. 34). Tanto la anfotericina B, como la pentamicina y la nistatina A1 pertenecen a la clase de los antibióticos polieno-macrolidos con actividad antifúngica (*WO2009121495A1 - Highly pure pentamycin - Google Patents*, n.d.). El cluster de anfotericina es muy similar a los clusters de genes biosintéticos PKS de los compuestos estructuralmente relacionados de pentamicina y nistatina. Por ejemplo, la principal diferencia entre los clusters de anfotericina y nistatina son es que los loops reductores son distintos en un par de módulos (Figura 25 y Figura 26) (Caffrey et al., 2001).

Las predicciones de Antismash (Tabla 6) muestran que la región 3.2 contiene un cluster de genes biosintético PKS tipo I cuyo cluster conocido más similar es pentamicina. Dada la relación de estos cluster, resulta factible que el cluster en la región 3.2 codifique para alguno de los compuestos relacionados a anfotericina detectado mediante análisis de redes moleculares. La organización de los dominios de estos módulos se muestra en la Figura 27. Un análisis comparativo muestra que este cluster no cuenta con algunos motivos conservados entre los de anfotericina y nistatina, como es el caso de ampC y nysC. Dado que aún no se cuenta con una posible estructura molecular de estos compuestos, no es posible concluir sobre la relación entre esta región y los análogos de anfotericina detectados en el sobrenadante de G35A.

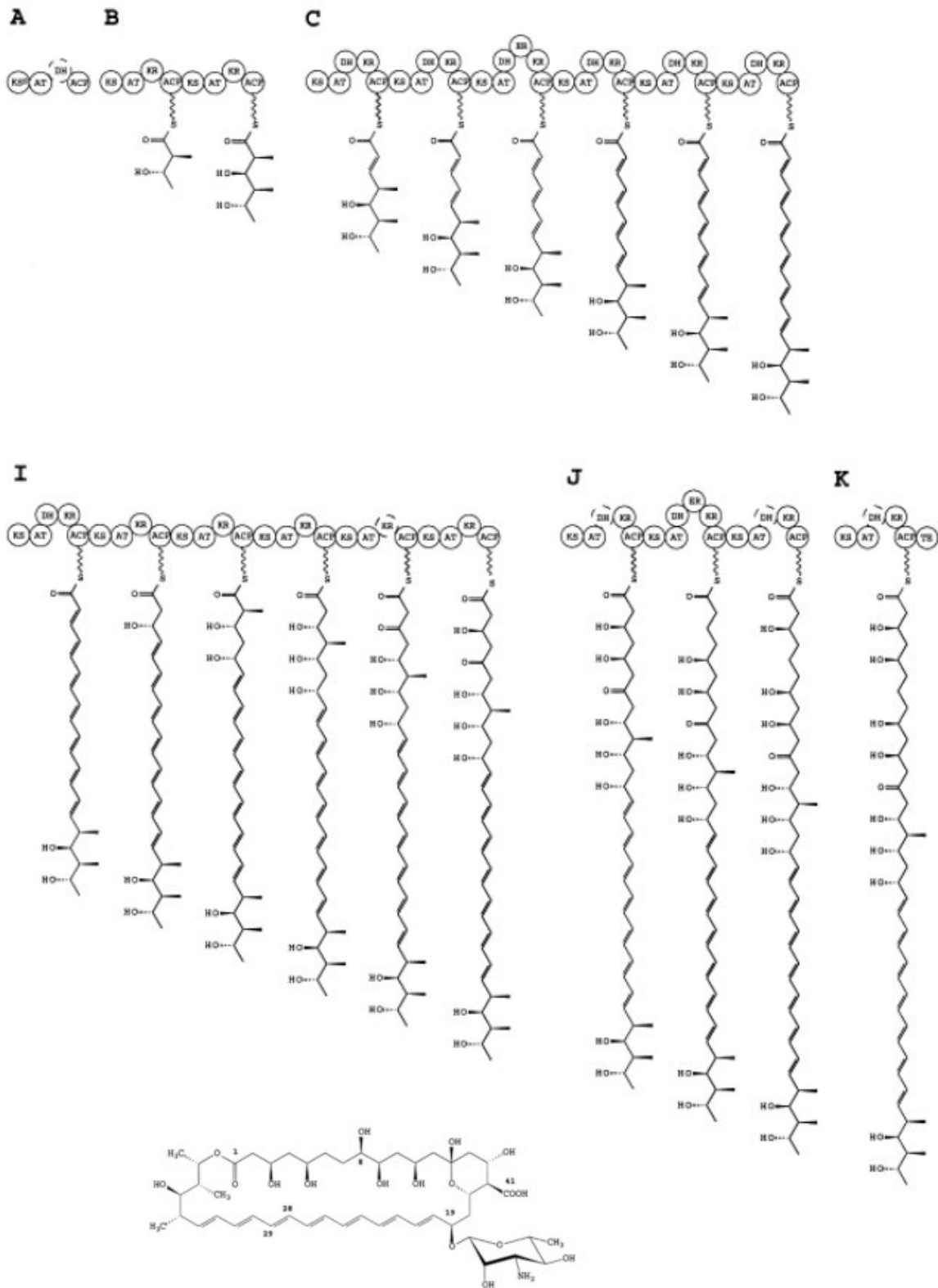


Figura 25: Organización cluster biosintético anfotericina y estructura de la molécula

Fuente: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552101000461>

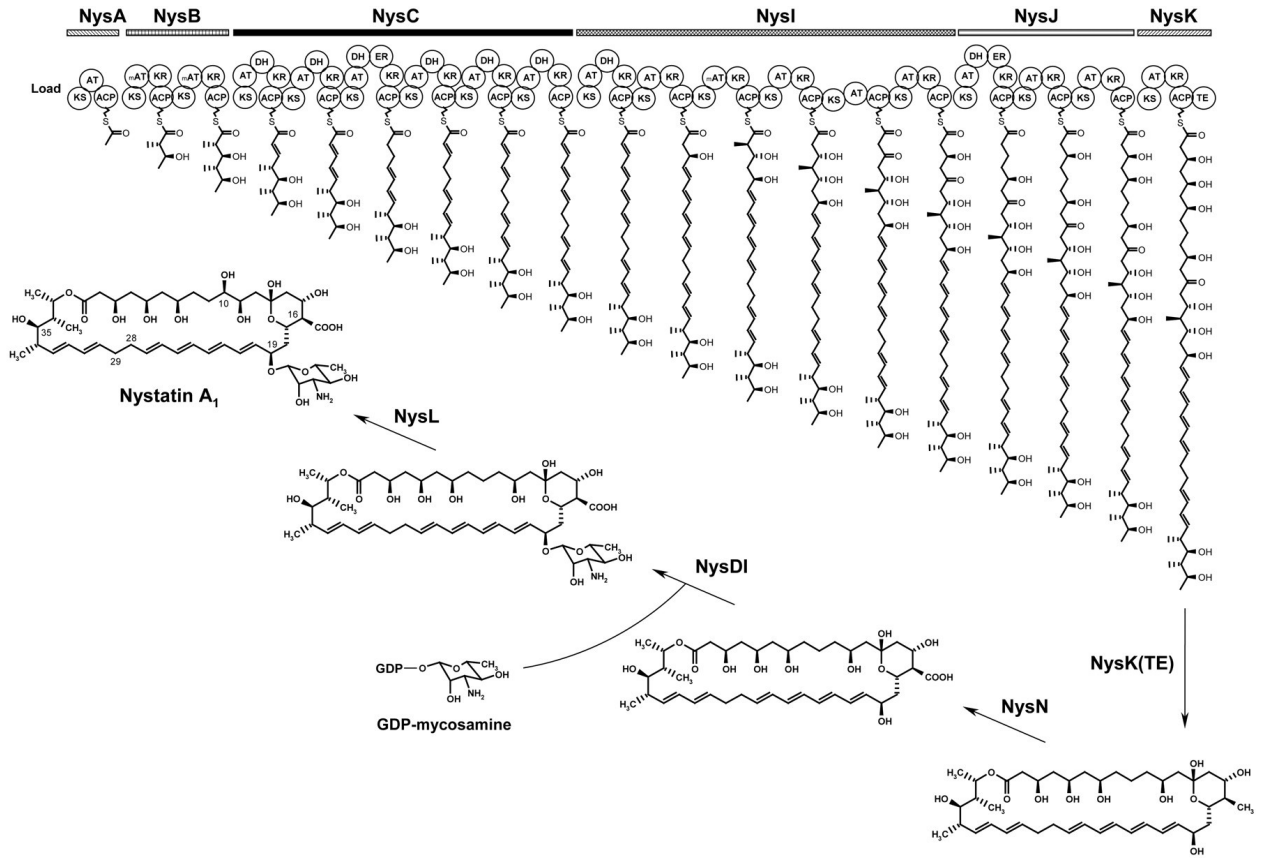


Figura 26: Organización cluster biosintético nistatina y estructura de la molécula

Fuente: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.48.11.4120-4129.2004>



Figura 27: Organización de los dominios de los módulos del PKS tipo I presente en la región 3.2 de G35A

2.3.2 Predicción de clusters de genes biosintéticos de desferrioxaminas en *Streptomyces* sp. S29

El ensamble genómico obtenido a partir de la secuenciación de *Streptomyces* sp. S29 mediante Nanopore e Illumina fue minado para identificar los cluster de genes biosintéticos responsables de la producción de metabolitos secundarios. Veintiún clusters fueron identificados inicialmente mediante Antismash (Tabla 7) (Blin et al., 2021). Estos incluyen cuatro PKS, dos NRPS y un RiPP, junto a otros clusters capaces de sintetizar otros compuestos como ectoína o desferrioxamina B.

Tabla 7: Cluster de genes biosintéticos para productos naturales en el genoma de *Streptomyces* sp. S29.

Los clústeres fueron identificados por AntiSMASH2 y se enumeran en orden de aparición en la secuencia

Región	Tipo	Desde	Hasta	Cluster conocido más similar	Similaridad
1.1	other,lassopeptide	192432	251584	lagmysin	80%
1.2	ectoine	253388	263792	ectoine	100%
1.3	NRPS-like,terpene	471965	530370	streptothricin	83%
1.4	T2PKS	561854	634363	spore pigment	66%
1.5	PKS-like,indole	940978	981904	5-isoprenylindole-3-carboxylate glycosyl ester	β -D-23%
1.6	siderophore	2495886	2506945	desferrioxamin B	100%
1.7	RiPP-like	4655160	4662821		0%
1.8	siderophore	5148239	5160272		0%
1.9	NRPS-like,NRPS	5302908	5353048	SW-163C / UK-63598 / SW-163E / SW-163F / SW-163G	28%
1.10	RiPP-like	5450714	5461784		0%
1.11	terpene	5543042	5564579	toxoflavin / fervenulin	14%
1.12	terpene	5845526	5870178	hopene	61%
1.13	siderophore	5949032	5962133		0%
1.14	NAPAA	6007809	6041750	lasalocid	9%
1.15	terpene,T1PKS	6055849	6133249	ebelactone	19%
1.16	terpene	6484078	6503852		0%
1.17	melanin	6505214	6530108	melanin	28%
1.18	siderophore	6568153	6581365		0%
1.19	T3PKS	6622115	6663176	alkylresorcinol	100%
1.20	CDPS,T1PKS,other,NRPS,PKS-like,prodigiosin,butyrolactone	6694870	6800748	cyphomycin	4%
1.21	terpene	6950544	6971605		0%

En la sección 1.4.3 (Actividad antifúngica mediada por agotamiento de hierro debido a la producción de desferrioxaminas en S29) se discute sobre el hallazgo de la producción de una diversidad estructural de desferrioxaminas (DFO), entre las que cuentan muchas estructuras nunca antes reportadas. Las DFO se biosintetizan mediante rutas de sideróforos independientes

de la sintetasa de péptido no ribosomal (nonribosomal peptide synthetase independent siderophore – NIS) y la presencia de al menos un gen que codifica un homólogo de IucA / IucC se ha reconocido como un marcador de cluster de genes biosintéticos (biosynthetic gene clusters - BGC) de NIS (Challis, 2005). La síntesis de DFO es codificada en un BGC (genes *desEFABCD*) que se encuentran en muchas especies de *Streptomyces* (Barona-Gómez et al., 2004). Usando FeGenie (Barco & Merino, 2020), la identificación de genes relacionados con el hierro reveló 27 biosíntesis de sideróforos y 11 genes relacionados con el transporte en el genoma de *Streptomyces sp.* S29. Estos genes relacionados con la biosíntesis de sideróforos se agrupan en cinco BGC y las predicciones antiSMASH (Kautsar et al., 2019) revelan que tres de los cinco contienen al menos un gen homólogo de IucA / IucC y los otros dos corresponden a rutas dependientes de NRPS (ver Figura 51).

La Región 1.6 (Tabla 7 y Figura 28) contiene un BGC sideróforo en *Streptomyces sp.* S29 con alta homología con los genes *desA-D* y con los genes de captación y utilización del sideróforo férrico (*desE-F*). Este grupo de *des* sigue la misma estructura que muchos *Streptomyces spp.*, incluida la posición de las *iron boxes* corriente arriba de los genes putativos *desE* (s29_002291) y *desA* (s29_002293) (Figura 28). *DesC* del des BGC de *Streptomyces sp.* S29 (s29_2295) exhibe una alta identidad con *DesC* de *S. coelicolor* (72%) y con *LgoC* de *Streptomyces sp.* MA37 (69%). En *S. coelicolor* A3 (2), la transcripción de *des* BGC es reprimida por la proteína reguladora dependiente de metales divalentes (DmdR) DmdR1 y desreprimida por limitación de hierro (FLORES & MARTÍN, 2004). El análisis mediante BLASTN / P reveló un presunto represor DmdR en *Streptomyces sp.* S29 (s29_002782) con 89% de nucleótidos y 93% de identidad de aminoácidos con DmdR1 (AJ271797.1 / CAC28070.1). Los análisis BLASTN identificaron ocho supuestos sitios de unión a DmdR (*iron boxes*) en *Streptomyces sp.* S29 mediante consulta de *iron boxes* putativas encontradas río arriba en diferentes ORF en el genoma de *S. coelicolor* A3(2) (Ronan et al., 2018).

Las aciltransferasas involucradas en la biosíntesis de hidroxamato normalmente exhiben una tolerancia de sustrato estrecha (por ejemplo, IucB, que muestra un alto grado de especificidad hacia acetil-CoA) (Ronan et al., 2018). El conjunto de DFO producidos por *S. coelicolor* (B, E, G1 y anfifílico) y aril DFO (legonoxamina AB) producidos por *Streptomyces sp.* MA37, se ha atribuido a las aciltransferasas *DesC* y *LgoC* tolerantes a sustrato, respectivamente (Maglangit et al., 2019; Ronan et al., 2018). Senges *et al.* reconocieron en su evaluación del secretoma de *Streptomyces chartreusis* que en un medio mínimo empobrecido en hierro también observaron desferrioxaminas adicionales producidas y que el potencial biosintético general puede ser mucho más amplio de lo que se había predicho (Senges et al., 2018). Clonación y análisis más detallado del BGC *des* de *Streptomyces sp.* S29 ha sido iniciado para vincular el potencial químico mostrado en este estudio.

Este trabajo dio origen a una publicación en colaboración que es posible revisar en Jarmusch et al., 2021).

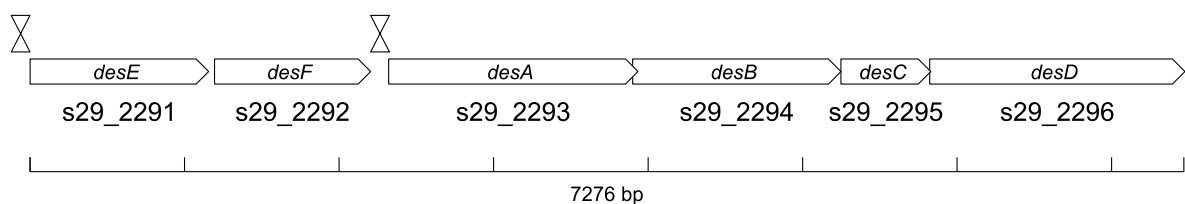


Figura 28: Organización de la región 1.6 - *des* gene cluster en *Streptomyces* sp. S29

2.3.2.1 Knockout *desC*

La diversidad molecular detectada en la síntesis de DFO puede ser explicada por tolerancia a diversidad de sustratos o promiscuidad por parte de DesC. Con la finalidad de demostrar la responsabilidad de este gen, se diseñó un sistema CRISPR/Cas9 con doble corte y reparación vía HDR para realizar un KO. Para esto se construyó un vector basado en pCRISPomyces-2¹⁹ (Cobb et al., 2014) mediante PCR / Gibson Assembly con las siguientes modificaciones. Se agregó, inicialmente, un segundo cassette de expresión de sgRNA. Luego se clonó los 2 spacers flanqueantes de *desC* (*desC*-sgRNA-5 y *desC*-sgRNA-3 en Anexos / Listado de Oligonucleótidos / sgRNA secuencias, página 85). Finalmente, se agregó dos regiones de 1kb río arriba y abajo de *desC*, preparadas por PCR usando los partidores *desc-ko-sgRNA-5-fwd/rev* y *desc-ko-sgRNA-3-fwd/rev* con gDNA de S29 como templado para generar el vector pCRISPomyces-2-ko-acylt-S29. El mapa final del vector se muestra en la Figura 52. El vector final fue transformado a *E. coli* ET12567/pUZ8002 y esta se utilizó para conjugar el vector pCRISPomyces-2-ko-acylt-S29 a *Streptomyces* sp. S29.

La evaluación del KO no se logró realizar por disponibilidad de tiempo y quedó pendiente de término. Los partidores para su verificación mediante PCR quedaron disponibles.

¹⁹ <https://www.addgene.org/61737/>

Capítulo 3

Expresión heteróloga de Cas9 y digestión *in vitro* de gDNA

3.1 Introducción

3.1.1 Sistemas de expresión bacterianos

Escherichia coli continúa dominando los sistemas de expresión bacterianos y sigue siendo el sistema preferido para las investigaciones de laboratorio y el desarrollo inicial en actividades comerciales o como un punto de referencia útil para la comparación entre varias plataformas de expresión. El sistema de plasmidios pET es ampliamente utilizado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Utilizando el promotor fuerte del bacteriófago T7 y las señales de traducción, el sistema pET se ha utilizado para expresar miles de proteínas diferentes en células huésped que expresan la polimerasa T7²⁰.

3.1.2 El cluster de actinorodina

La actinorhodina (Act) es un antibiótico de pigmento azul producido por *Streptomyces coelicolor* A3(2), que es genéticamente uno de los actinomicetos mejor caracterizados. Act pertenece a una clase de PK aromáticos, los antibióticos benzoisocromanequinona (BIQ). Act es el primer antibiótico cuyo BGC fue clonado y ha servido como uno de los mejores compuestos modelo para estudiar las PKS de tipo II, sus enzimas auxiliares y las enzimas de adaptación posteriores a la PKS. En consecuencia, numerosos estudios han proporcionado mucha información importante sobre la biosíntesis de Act. El BGC comprende una secuencia de 22 kb (Figura 29) (Okamoto et al., 2009).

20 <https://www.merckmillipore.com/CL/es/life-science-research/genomic-analysis/dna-preparation-cloning/pet-expression-vectors/qFSb.qB.mLQAAFA6.VkiQ0G,nav>

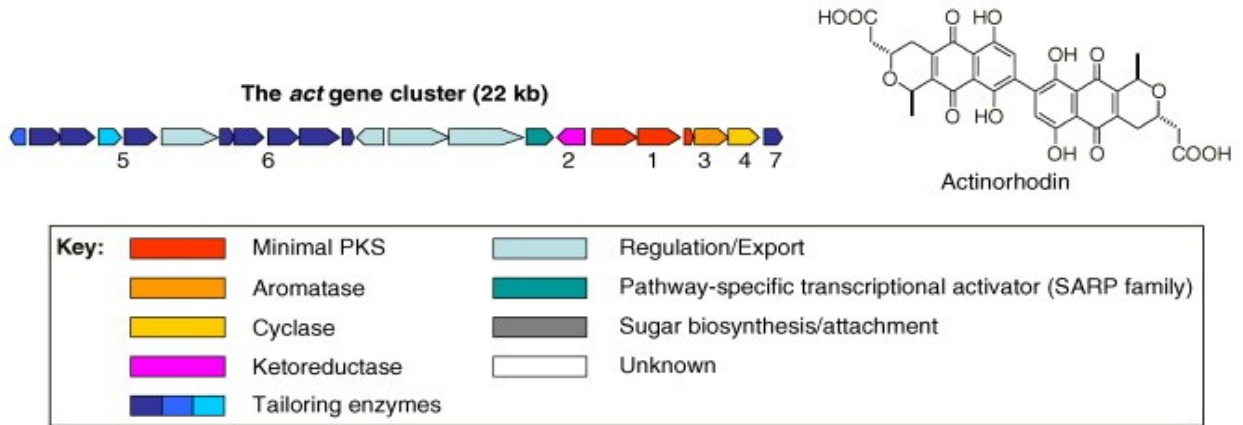


Figura 29: Organización del BGC de actinorodina (*Act*) y estructura molecular

3.1.3 Sistemas CRISPR/Cas9 *in vitro* para manipulación de DNA

Tradicionalmente, el análisis de BGC se ha basado en la edición de genes *in vivo* a través de recombinación homóloga. Pero, más recientemente, la expresión heteróloga de BGC ha surgido como una alternativa valiosa. La clonación de BGC en cósmidos es lento e inapropiado para clusters más grandes, por lo que los métodos directos como la recombinación homóloga mediada por RecET en *Escherichia coli*, la recombinación asociada a la transformación (TAR) en *Saccharomyces cerevisiae*, la clonación dirigida por oriT y la construcción de bibliotecas de cromosomas artificiales se ha establecido. Además, la recombinación sitio-específica y el método de Gibson Assembly se han utilizado para ensamblar BGCs. Las estrategias para la manipulación *in vitro* de estos fragmentos largos de DNA están muy poco desarrolladas. Las estrategias de clonación de rutina, incluida la amplificación por PCR y la digestión por enzimasrestricción, están restringidas por errores, limitación de sitios de restricción y baja eficiencia para fragmentos largos. λ *red recombination-mediated PCR targeting* causar recombinación no deseada debido a secuencias repetitivas (Liu et al., 2015).

Es posible aprovechar las características del sistema CRISPR/Cas9 *in vivo* en aplicaciones *in vitro*. spCas9 brinda una eficiencia y simplicidad única para la clonación de grandes clusters de genes, lo que permite lograr la clonación dirigida de secuencias genómicas de largo casi arbitrarias (demostradas de hasta 100 kb) en un solo paso como la desarrollada en el sistema CATCH (*Cas9-Assisted Targeting of CHromosome segments*) (Figura 30) (Jiang et al., 2015).

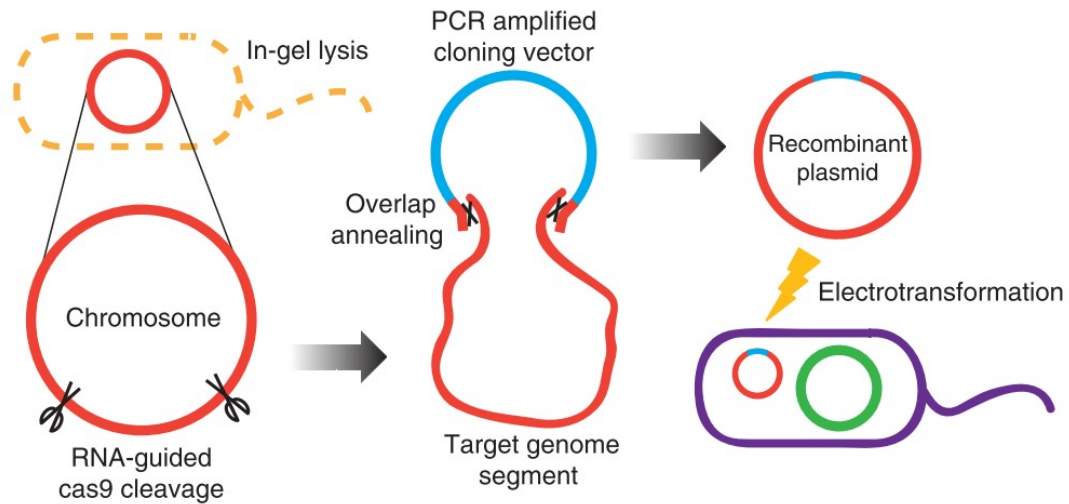


Figura 30: Clonación de cluster de genes grandes en un solo paso por CATCH.

Después de la lisis en gel de las células bacterianas, Cas9 guiado por RNA escinde los cromosomas en los sitios de destino designados. Un vector de clonación (longitud no a escala) que comparte superposiciones de secuencias terminales de 30 pb (cruz negra) con el DNA objetivo en ambos extremos se liga al segmento objetivo en una mezcla de ensamblaje Gibson. A continuación, el plásmido recombinante se electrotransforma en un huésped de clonación.

3.1.4 PFGE y desarrollo *open-source*

La electroforesis de DNA es una técnica de uso frecuente en biología molecular que permite la separación de moléculas de DNA hasta ~50 Kbp mediante la aplicación de un campo eléctrico unidireccional a través de un gel de agarosa donde se tamizan pequeñas moléculas de DNA de una manera dependiente de tamaño. Sin embargo, el efecto de tamizado que subyace a tales separaciones falla cuando se deben resolver moléculas de DNA muy grandes, como es el caso del análisis genómico utilizando moléculas de DNA cromosómico intactas o el análisis y la manipulación de fragmentos de restricción muy grandes. La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, pulsed-field gel electrophoresis), desarrollada por Schwartz y Cantor (Schwartz & Cantor, 1984), es una variación de la técnica de electroforesis de DNA convencional que permite la separación de moléculas de DNA muy grandes de hasta ~10 Mbp. Esto se logra mediante un cambio periódico y abrupto en la dirección del campo eléctrico que aprovecha los fenómenos de reptación de las moléculas grandes de DNA para permitir la movilidad electroforética dependiente del tamaño.

La subtipificación bacteriana es la principal aplicación de PFGE debido al poder discriminatorio, la simplicidad y el bajo costo de la tecnología. Aunque algunos laboratorios están haciendo la transición hacia la tipificación basada en la secuenciación del genoma completo, sigue siendo importante para los pequeños hospitales y laboratorios con recursos limitados y será la opción más factible para la subtipificación bacteriana por más tiempo (Lopez-Canovas et al., 2019; Neoh et al., 2019). Esta tecnología juega un papel clave en la genómica moderna, ya que permite manipulaciones con DNA de cromosomas completos o de sus grandes fragmentos (Nassonova,

2008) como es el caso, por ejemplo, del sistema CATCH (Jiang et al., 2015) o evaluación del tamaño de fragmentos de DNA para secuenciación de próxima generación²¹.

La bioquímica es un área donde se requiere equipo altamente sofisticado. En general, pocos equipos, es decir, PCR termocicladores²²: tienen una versión de código abierto, lo que limita el desarrollo de equipos mejorados/personalizados, y los costos de dichos equipos tienden a ser muy altos, lo que impone una gran barrera para democratizar su uso en muchos laboratorios académicos. El equipo PFGE es costoso y lo venden exclusivamente dos proveedores (Bio Rad, Analytik Jena), cuestan alrededor de USD \$ 30,000 y no tienen una versión de código abierto. Los equipos comerciales de PFGE que controlan la reorientación del campo eléctrico se basan tanto en circuitos electrónicos (CHEF, Bio Rad) como en electrodos rotatorios físicos (Rotaphor, Analytik Jena). El hardware abierto y el software libre y de código abierto (FOSS) proporcionan herramientas para fabricar dispositivos a costos más bajos y con mayor adaptabilidad. Los microcontroladores fáciles de usar, como Arduino, y las tecnologías de fabricación, como las impresoras 3D, han permitido que una comunidad diversa de desarrolladores comience a construir nuevos dispositivos personalizados, de bajo costo y de código abierto.

3.2 Expresión heteróloga de Cas9

En esta sección la endonucleasa Cas9 *wild-type* de *Streptococcus pyogenes* (spCas9) fue expresada heterológamente en *Escherichia coli* sobre un plasmidio pET22 (pET22b-CAS9) y purificada mediante cromatografía de afinidad.

3.2.1 Plasmidio para la expresión de spCas9

Para construir pET22b-CAS9, un PCR en condiciones estándar utilizando los partidores *CAS9 pET22b prev.pelB fwd* y *CAS9 pET22b HIStag rev* para amplificar un fragmento de ~4.1 kbp utilizando pwtCas9 como templado. Este fragmento fue ligado a un producto de PCR de ~5.3 kbp, con los partidores *pET22b HIStag fwd* y *pET22b prev.pelB rev* con pET22b como templado, mediante Gibson Assembly. Los fragmentos obtenidos por PCR que participaron de la ligación se muestran en la Figura 31. El plasmidio generado, pET22b-CAS9, fue utilizado para transformar *E. coli* T10. Tras la selección B/W y confirmación por PCR, una miniprep del constructo se utilizó para transformar Rosetta2(DE3).

21 <https://lab.loman.net/2018/05/25/dna-extraction-book- chapter/>

22 <http://openpcr.org>

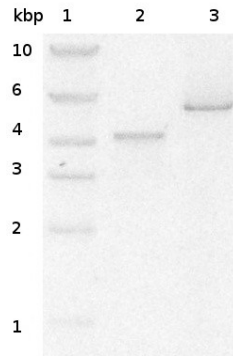


Figura 31: Fragmentos de CAS9 y pET22b amplificados mediante PCR

COL 1: High DNA Mass Ladder (ThermoFisher). COL 2: CAS9 fragment amplified from pwtCas9. COL 3: pET22b lineal fragment amplified from pET22b.

3.2.2 Inducción y purificación de spCas9

Para la inducción de Cas9, 5 ml de LB suplementado con ampicilina y cloramfenicol fue inoculado con 50 μ l de un pre-cultivo. Tras 3 h de incubación a 37 °C, el cultivo fue incubado en hielo por 5 minutos. Luego se agregó IPTG a una concentración final de 100 μ M. Como control se utilizó un cultivo sin inductor. El cultivo fue incubado a 25 °C por 18 h para la síntesis de proteína.

Para la extracción de proteínas, el cultivo fue centrifugado a 5.000 rfc por 2 min y lavado 2 veces con NiNTA Binding Buffer. Luego, el pellet fue resuspendido en 1 ml del mismo buffer y sonificado a 15 WRMS en un ciclo de 10 seg seguido de ultradonido seguido de 50 seg de incubación en hielo durante 6 repeticiones. Las células sonificadas fueron centrifugadas a 12.000 rfc por 15 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue retenido como fracción soluble. Las fracciones soluble e insoluble se muestran en la Figura 32.

La purificación de Cas9 fue realizada aplicando 1.5 ml de fracción soluble a una columna con 600 μ l de nitrilotriacetic acid (NTA) agarose (GE Life Sciences). Luego de 5 lavados con 1CV de Binding buffer, Cas9 fue eluida usando 1 volumen de Elutir buffer en 5 repeticiones, separando las fracciones para su posterior análisis. Las eluciones 2 y 3 fueron combinadas y cargadas a una PD-10 Desalting Column (GE Life Sciences) y se procesaron utilizando el protocolo estándar por gravedad eluyendo la proteína en Storage buffer. La enzima fue conservada a -20 °C para su posterior uso. Las fracciones más importantes de la purificación se muestran en la Figura 33v.

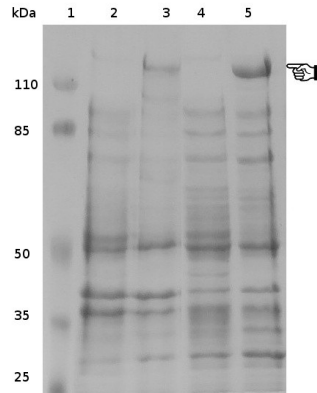


Figura 32: CAS9 induction and insoluble/soluble phase fractionation

COL 1: Pierce Prestained Protein MW Marker (ThermoFisher). COL 2: Insoluble fraction, IPTG 0 [mM]. COL 3: Insoluble fraction, IPTG 100 [mM]. COL 4: Soluble fraction, IPTG 0 [mM]. COL 5: Soluble fraction, IPTG 100 [mM]. CAS9 protein band pointed.

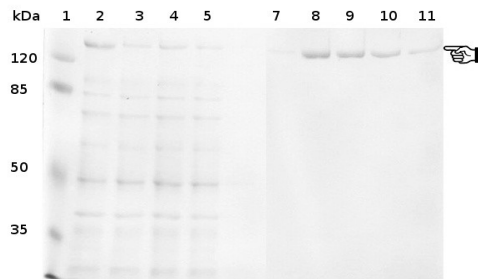


Figura 33: CAS9 fractions after purification by nitrilotriacetic acid (NTA) agarose column

COL 1: Pierce Prestained Protein MW Marker (ThermoFisher). COL 2-6: Sequential wash fractions with Binding buffer. COL 7-11: Sequential elution fractions with Elutite buffer. CAS9 purified protein band pointed.

3.3 Digestión *in vitro* de cluster Actinorodina

En esta sección se valida la actividad *in vitro* de la enzima Cas9 expresada y purificada anteriormente mediante la digestión de las regiones flanqueantes del cluster de actinorodina.

3.3.1 Selección de sitios de corte de cluster biosintético de Actinorodina

El cluster de Actinorodina en *Streptomyces coelicolor* M145 se encuentra codificado entre los genes sco5071 y sco5092 (incluidos), creando una región de 21.283 bp (Bentley et al., 2002). Debido a la posible presencia de regiones regulatorias río arriba de sco5071 o río abajo de sco5092 los sitios de corte se seleccionaron en el gen sco5070 para el 5' y en el sco5093 para la posición 3'.

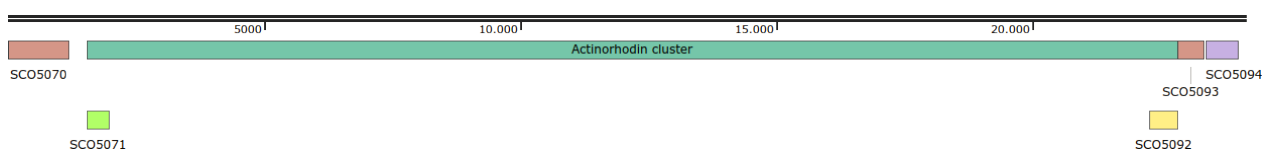


Figura 34: Organización del clúster de Actinorodina

3.3.2 *in vitro* transcription (IVT) for sgRNA synthesis

Se seleccionaron tres spacers candidatos de 20 bp para cada uno de los extremos 5' y 3'. El criterio utilizado para la selección de estos spacers se basa en un on-target score y un off-target score asignado a cada spacer especialmente desarrollado por Doench Fusi et al (Doench et al., 2016). Los spacers candidatos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Spacers candidatos para la exsición del clúster de Actinorodina

Candidate	Cluster 5' end spacer	Cluster 3' end spacer
#1	[+] CTGGACCGGGACCCCCAGGG	[+] GTAGTCGAGGAACCCGCGCA
#2	[+] GCGGGCCCTCTCGAACACGG	[-] CGCGGCGGACGAGCAGGACG
#3	[+] CGGTACCTCGACGATCGCCG	[+] GACGTGGTCGACGACCTCGG

Los templados de DNA para la síntesis por transcripción *in vitro* (IVT) fueron creados mediante el alineamiento de dos oligonucleótidos. El primer oligo contiene, en sentido 5' → 3', la secuencia de un promotor T7²³; una guanina (G), solo si la siguiente base no es una G, la secuencia del spacer (sin PAM); y una secuencia de overlap, complementaria al segundo oligo²⁴. La secuencia del segundo oligo – común a todos los sgRNAs – fue denominada *S. pyogenes Cas9 Scaffold* y contiene la secuencia que genera la estructura secundaria que es reconocida por

23 T7promoter sequence: TTCTAATACGACTCACTATA

24 T7promoter sequence: TTCTAATACGACTCACTATA

Cas9 (Jinek et al., 2012). El alineamiento y extensión de los oligos junto a la IVT, purificación y visualización de sgRNA fueron ejecutadas según se describe en el protocolo Protocolos para la síntesis, purificación y visualización de gRNA, página 89. Los sgRNA purificados se muestran en la Figura 35.

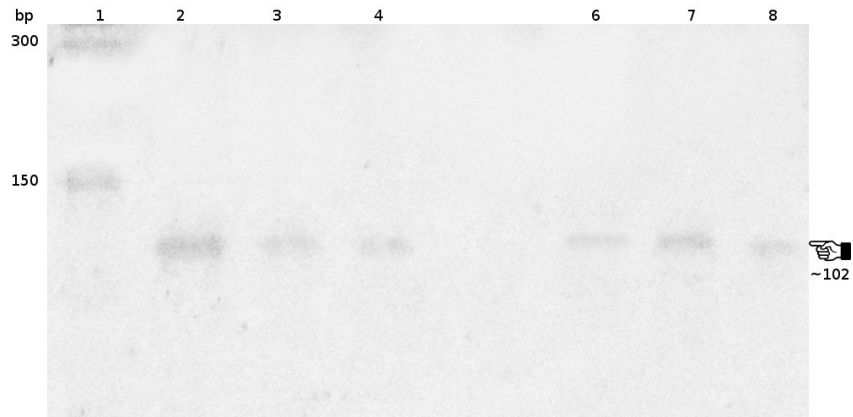


Figura 35: Urea-PAGE of sgRNAs correctamente sintetizados mediante IVT

8 [M] Urea-PAGE 15 [%]. COL 1: Low Range ssRNA Ladder (NEB). Bands of 300 and 150 [pb] are highlighted. COL 2: 5' sgRNA candidate #1. COL 3: 5' sgRNA candidate #2. COL 4: 5' sgRNA candidate #3. COL 6: 3' sgRNA candidate #1. COL 7: 3' sgRNA candidate #2. COL 8: 3' sgRNA candidate #3

3.3.3 Digestión *in vitro* de regiones flanqueadores del clúster de Actinorodina

Con la finalidad de testear la actividad de la endonucleasa Cas9 preparada en el laboratorio junto a determinación de la eficiencia de los spacers seleccionados y la determinación del protocolo de digestión se decide testear primero contra regiones de 1kb que contienen los targets de edición antes de trabajar directamente con el gDNA. Para esto, se obtuvo gDNA de *S. coelicolor* M145 utilizando el UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories). Este gDNA se utilizó como templado para una amplificación mediante PCR utilizando los partidores ACT 1kb 5 fwd y ACT 1kb 5 rev para amplificar una región de 940 bp en el gen sco5070 – llamado *ACT 1kb 5* – y ACT 1kb 3 fwd con ACT 1kb 3 para una región de 1124 bp en el gen sco5094 – llamado *ACT 1kb 3*.

La digestión de *ACT 1kb 5* y *ACT 1kb 3* utilizando tres candidatos de spacer para cada fragmento fue realizado siguiendo el protocolo descrito en Protocolos asociados con CAS9, página 91. Los resultados de digestión junto a sus controles se muestran para uno de los spacer candidatos en la Figura 36. La dirección simultánea de ambas regiones con los mejores spacers para cada corte singular se muestra en la Figura 37.

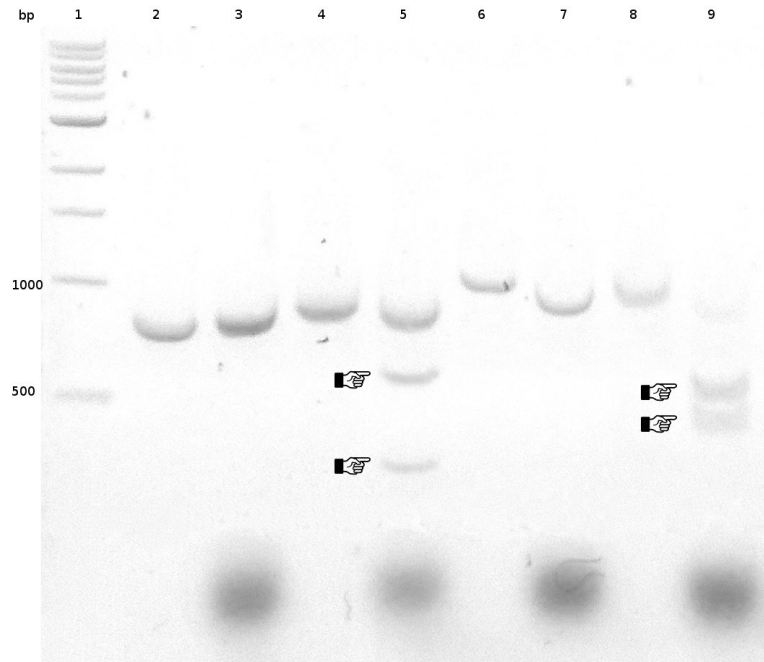


Figura 36: ~1 [kbp] Actinorhodin cluster regions digestion

ACT 1kb (3/5) | sgRNA (protospacer candidate/-) | CAS (\pm) COL 1: 1 kb DNA Ladder (NEB). COL 2: 5 | - | - . COL 3: 5 | 1 | - . COL 4: 5 | - | + . COL 5: 5 | 1 | + . COL 6: 3 | - | - . COL 7: 3 | 2 | - . COL 8: 3 | - | + . COL 9: 3 | 2 | + . Digestion products pointed.

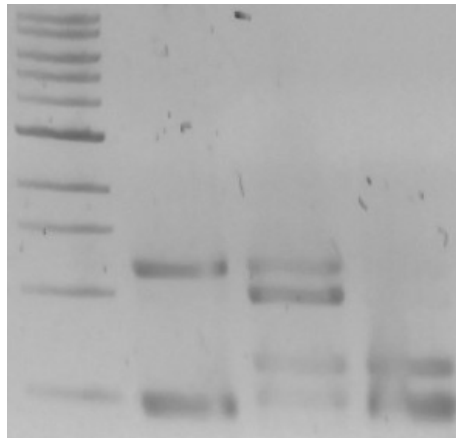


Figura 37: ~1 [kbp] Actinorhodin cluster regions digestion

COL 1: 1 kb DNA Ladder (NEB). COL 2: 1kb5 + 1kb3 + IVT 5.3. COL 3: 1kb5 + 1kb3 + IVT 3.2. COL 4: 1kb5 + 1kb3 + IVT 5.3 + IVT 3.2

3.4 Extracción de DNA genómico íntegro en plugs de agarosa y digestión *in vitro*

DNA genómico (gDNA) con alto grado de integridad es necesario para realizar las digestiones *in vitro* con Cas9. Para esto se realizan extracciones de gDNA utilizando células embebidas en agarosa (Jiang et al., 2015). Con la finalidad de definir el protocolo de extracción y la factibilidad de digestión en agarosa, se trabaja con *S. coelicolor* C34 y una enzima de restricción comercial. Para comenzar, se realizó una adaptación y optimización del protocolo para extracción de gDNA en plugs de agarosa reportado por (Keiser et al., 2000). Tras diversas rondas de testeo, se logra definir el protocolo detallado en Protocolos asociados a digestión *in vitro* de DNA genómico, página 92. Los plugs obtenidos fueron tratados con EcoRI (según el protocolo detallado en Protocolos asociados a digestión *in vitro* de DNA genómico, página 92.) y visualizados en gel de agarosa. Los resultados (ver Figura 38) muestran alta integridad del DNA y factibilidad de digestión mediante enzimas de restricción.

A continuación, se realizaron pruebas iniciales para la digestión mediante Cas9. Los primeros experimentos mostraron que al correr las digestiones en electroforesis de campo pulsado en openPFGE se observa una segunda banda bajo la banda principal de gDNA (como se observa en la Figura 39, COL 2). Es razonable plantear la hipótesis de que este fragmento puede corresponder a cambios en el patrón de migración producto de la fuerte asociación Cas9-DNA. Al utilizar Cas9 *in vitro* en solución es una práctica común aplicar temperatura o proteinasa K (protK) para denaturar/degradar Cas9 previo al análisis de los fragmentos de digestión (Jinek et al., 2012). A partir de esto, se decidió testear la aplicación de protK para evaluar su efecto en el cambio de patrón de migración producto de la denaturación de Cas9. Para esto se aplicó protK (1 mg/ml) incubando a 50°C por 120 min luego de la digestión y previo a la electroforesis. El resultado (Figura 39) muestra que no existe un efecto significativo de protK respecto del patrón de migración. Por razones de fuerza mayor, los experimentos con Cas9 no pudieron continuar.

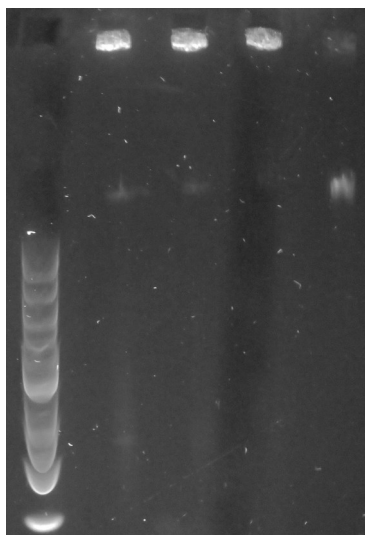


Figura 38: C34 gDNA plugs digeridos con EcoRI

Determinación del tiempo de incubación con proteinasa K y validación por digestión con EcoRI. COL 1: 1 kb DNA Ladder (NEB). COL 2: 1 h incubación prot. K / EcoRI -. COL 3: 1 h incubación prot. K / EcoRI +. COL 4: 12 h incubación prot. K / EcoRI -. COL 5: 12 h incubación prot. K / EcoRI +.

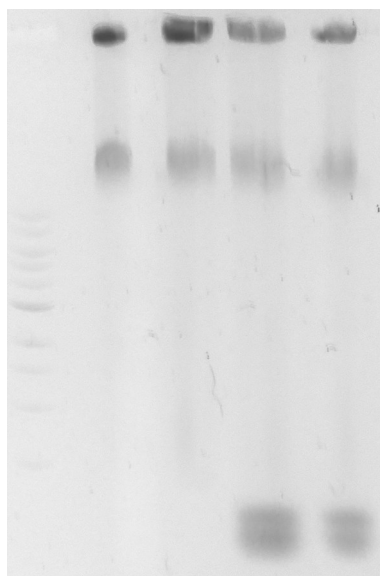


Figura 39: Efecto de aplicación de protK luego de digestión con Cas9. Electroforesis de campo pulsado de gDNA de C34

COL 1: 1 kb DNA Ladder (NEB). COL 2: Cas9 + / sgRNA - / ProtK - . COL 3: Cas9 + / sgRNA - / ProtK + . COL 4: Cas9 + / sgRNA + / ProtK - . COL 5: Cas9 + / sgRNA + / ProtK +

3.5 Selección de plasmidios para clonamiento BAC

Diferenciados por su origen, con consecuencia en alguna de sus propiedades (número de copias, resistencia), tanto los vectores los Bacterial Artificial Chromosome (BAC) como los Phage P1-derived Artificial Chromosome (PAC) permiten el clonamiento de fragmentos de alto tamaño (hasta 300 kbp). Por su disponibilidad y características, dos vectores fueron seleccionados como candidatos para el clonamiento de los fragmentos a obtener por digestión *in vitro* de clusters mediante Cas9.

El vector PAC pESAC13 fue desarrollado por M. Sosio and S. Donadio (NAICONS, Milán, Italia) y es utilizado por Bio S&T Inc²⁵. (Montreal, Canada). Contiene el origen de replicación del fago P1 y el sistema de integración del fago phiC31 que permite la integración estable en el genoma de la mayor parte de las especies de *Streptomyces*. También cuenta con un oriT que permite su transferencia en *Streptomyces* mediante conjugación – gran ventaja respecto de la laboriosa técnica de transformación mediante protoplastos. El vector codifica además para una resistencia a kanamicina en *E. coli* y a tiostreptona en *Streptomyces*. Es el vector tradicionalmente utilizado en la construcción de librerías de gDNA de *Streptomyces* (Jones et al., 2013).

La colección de vectores pOSV801 a pOSV812 ha sido especialmente desarrollada con una mirada moderna de biología sintética para contar con diversas técnicas de clonamiento de los constructos de interés, cuatro sistemas ortogonales de integración cromosomal en *Streptomyces*, oriT para conjugación, tres cassettes de resistencia y sitios de recombinación FLP para permitir la reutilización de marcadores de selección (Aubry et al., 2019). Pese a que no han sido validados para recibir fragmentos de alto tamaño, resulta interesante su incorporación en el flujo de trabajo. Para esto, se adquirió desde AddGene²⁶ los plasmidios: pOSV801, pOSV802, pOSV807 y pOSV812.

25 <http://www.biost.com/>

26 <https://www.addgene.org/>

3.6 openPFGE: Electroforésis de campo pulsado

La electroforésis es una técnica ampliamente usada para la separación de moléculas de DNA de acuerdo al tamaño (pares de bases) de cada molécula presente en una mezcla. Sin embargo, la electroforésis estándar no permite la separación de moléculas de gran tamaño (sobre 15 o 20 Kbp). En estas condiciones las moléculas de gran tamaño se mueven simultáneamente, independiente de su tamaño. Una variación del protocolo estándar, llamado electroforésis de campo pulsado (PFGE: *pulsed field gel electrophoresis*) (Schwartz & Cantor, 1984) permite la separación de moléculas de mayor tamaño (hasta ~10 Mbp) mediante la aplicación de voltaje cuya dirección alterna +/- 60° respecto de la línea de movimiento neto, a diferencia de la versión estándar en que la dirección permanece estática.

Dado el tamaño del genoma y el promedio de tamaño de los clusters comúnmente presentes en *Streptomyces* (~70 Kbp), un equipo como este resulta necesario para la detección del corte *in vitro* de un clúster de interés. Debido a esto, a que no se contaba con acceso a este equipo y a su alto costo de adquisición, se decide implementar una versión de bajo costo de este equipo.

En general en el área bioquímica se requiere de equipos altamente sofisticados. Solo algunos de estos equipos, como termocicladores para PCR²⁷, cuentan con una versión *open source* que permita su mejora continua y customización. Junto a esto, este equipamiento tiende a ser de alto costo, lo que impone una barrera de acceso para muchos laboratorios a lo largo del mundo. Los equipos de PFGE son caros (aprox USD\$30,000), vendidos exclusivamente por dos proveedores (Bio Rad, Analytik Jena) y no cuenta con una versión *open source*. Los equipos comerciales están basados tanto en control electrónico de la reorientación del campo eléctrico (CHEF, Bio Rad) como en la rotación física de los electrodos (Rotaphor, Analytik Jena).

Todo el diseño y programación se encuentra disponible en el repositorio Gitlab²⁸ y el equipo está certificado bajo OSHWA certification: [OSHW] CL000001 | Certified open source hardware | oshwa.org/cert. El equipo tiene un costo de USD\$850, lo que equivale ~3% del costo de un equipo comercial.

Varios laboratorios han implementado y adoptado la utilización de este equipo. Entre ellos: INIA, UTEM, The Jackson Laboratory, Arm Laboratory. Este trabajo dio origen a una publicación (Lagos-Susaeta et al., 2020). A modo de ejemplo, algunos ladders han sido separados utilizando este equipo (Figura 40).

27 <http://openpcr.org>

28 <https://gitlab.com/diegusleik/openpfge>

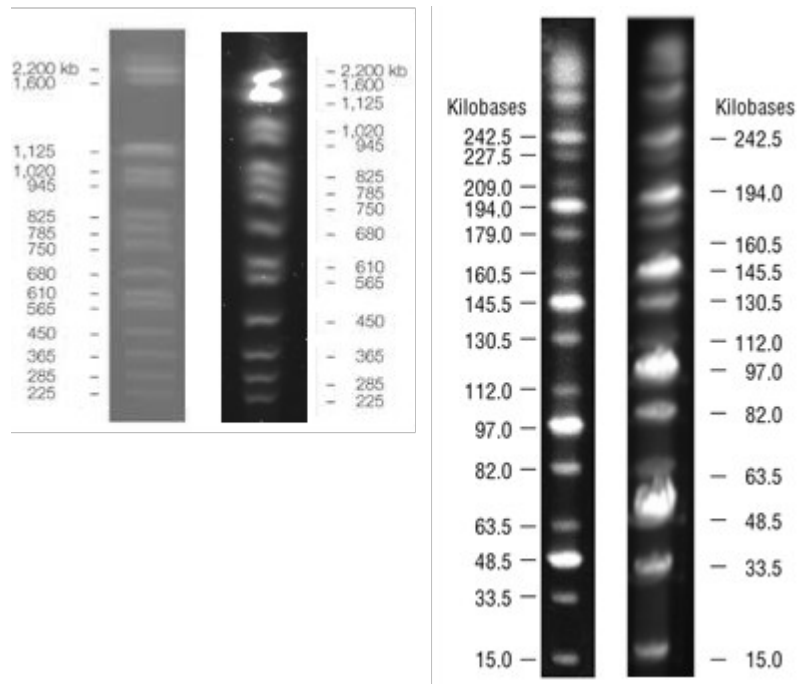


Figura 40: Comparación de 250 kbp y ~2.2Mbp markers.

Izquierda de cada imagen: Imagen referencial del proveedor de MidRange PFG Marker y CHEF DNA Size Marker #1703605, respectivamente. Derecha de cada imagen: Mismo marker luego de PFGE en openPFGE

3.6.1 Descripción general del hardware

Durante este trabajo se desarrolló un equipo PFGE *open source* y de bajo costo denominado openPFGE. El equipo implementa una electroforesis de gel rotatorio (RGE: *rotating gel electrophoresis*) sobre un campo eléctrico uniforme (Figura 41 y 42), usando las bases de un sistema descrito anteriormente (Southern et al., 1987). El diseño considera el uso de una cámara de electroforésis disponible comercialmente y la construcción de un RGE usando partes impresas en 3D, una bomba pequeña y celdas peltier para la refrigeración. El control del motor y sistema de enfriamiento se realizan mediante comunicación *Bluetooth* con un teléfono inteligente corriendo una aplicación Android.

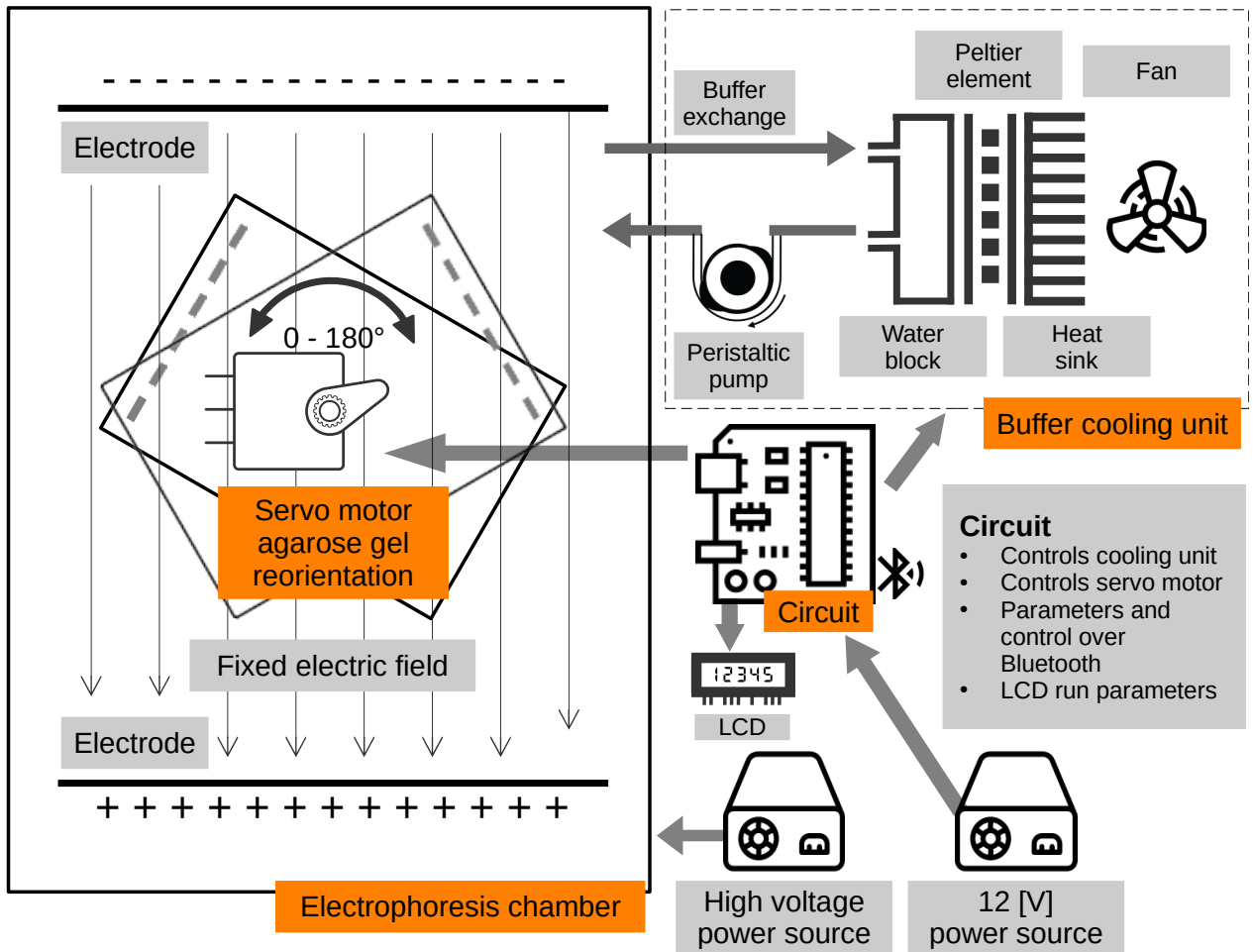


Figura 41: Diagrama de equipo openPFGE. Componentes principales del hardware openPFGE

Un servomotor reorienta la posición del gel de agarosa al girar una bandeja de gel con respecto a un campo eléctrico fijo. El movimiento del servomotor está controlado por un circuito cuyos parámetros se determinan a través de Bluetooth mediante una aplicación de Android. El circuito también controla una unidad de enfriamiento de búfer. *. Algunos íconos hechos por Freepick, Google, Eucalyp y esos íconos de www.flaticon.com

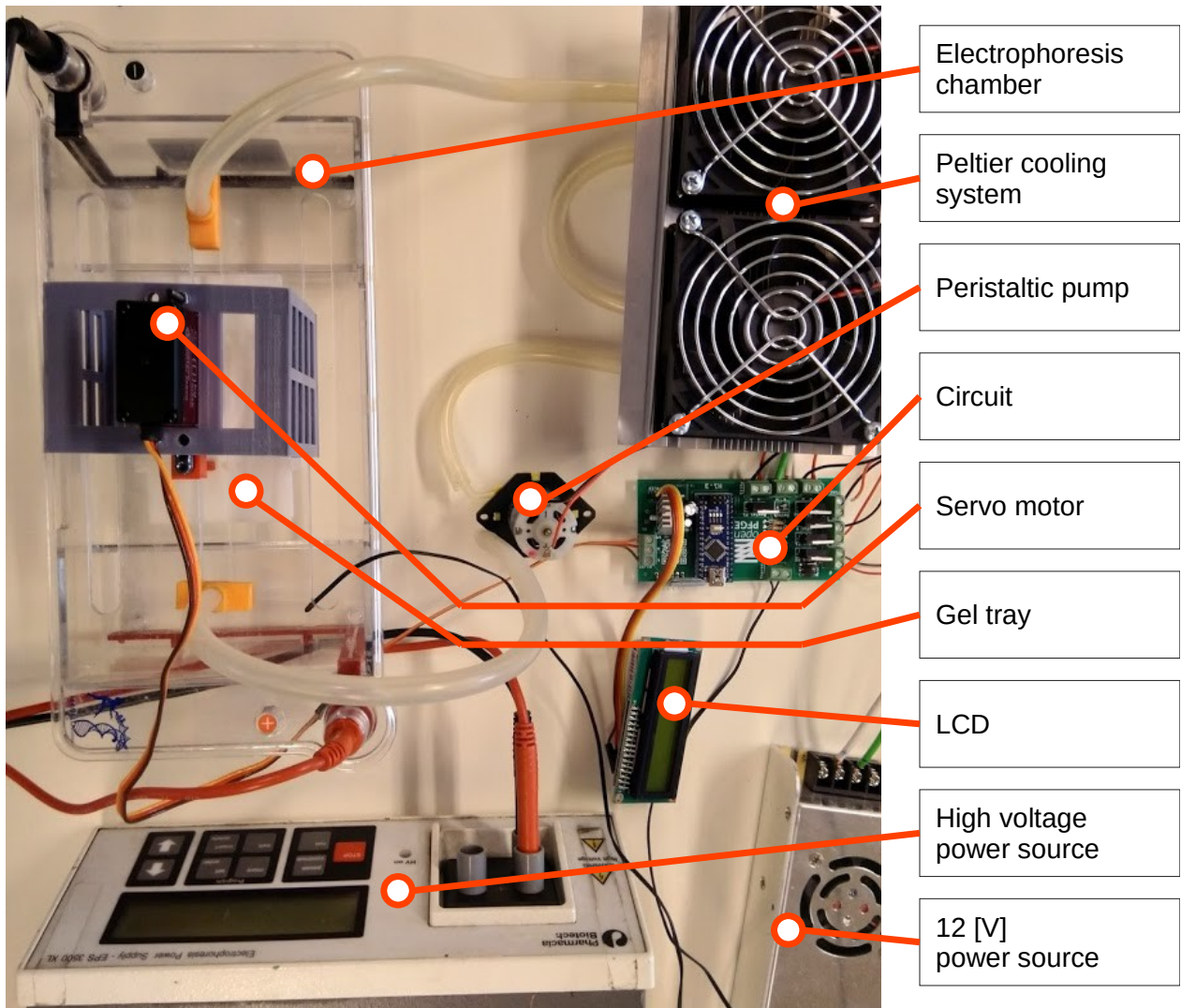


Figura 42: Imagen del equipo openPFGE. Vista general del sistema RGE implementado, destacando sus principales componentes.

3.6.2 Descripción general del software

El microprocesador Arduino Nano incorporado en el equipo permite el control de los componentes en forma autónoma: controla el movimiento del motor, la bomba, las celdas peltier y la pantalla de información. Además permite la comunicación con el teléfono inteligente mediante Bluetooth. Una aplicación Android, desarrollada especialmente para este equipo, corre en el teléfono inteligente.

3.6.3 Implementación del equipo en otros laboratorios

Además de la utilidad prestada por el equipo en el desarrollo de los experimentos de esta tesis, éste ha sido implementado ya en algunos otros laboratorios en el mundo. En base a correos

electrónicos de consultas puntuales sobre la implementación de openPFGE es posible determinar que, al menos, ha sido implementados en:

- Natural History Museum and Institute, Chiba, Japón
- Adaptation Robotic Manipulation (ARM) Laboratory, Atlanta, USA
- The Jackson Laboratory, Maine, USA
- Department of Pharmacology, Addiction Science and Toxicology, The University of Tennessee Health Science Center, USA
- Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), Santiago, Chile (No verificado)
- INIA, Santiago, Chile (No verificado)

Conclusiones generales, discusión y perspectivas de este trabajo

3.7 Establecimiento de colección de patógenos y controladores

El trabajo desarrollado tuvo la premisa de encontrar nuevas soluciones para la industria agrícola, particularmente, respecto del control – en forma efectiva y con el menor efecto negativo colateral posible – de algunos de los principales fito-patógenos que afectan cultivos importantes para la industria tanto local como global.

CeBiB no contaba con una colección de patógenos que permitiera realizar investigación en estos temas. Es por esto que la etapa preliminar al desarrollo principal del trabajo consistió en el establecimiento de un cepario de fito-patógenos de importancia agrícola. Para esto se recurrió a dos orígenes de muestras de campo (UTEM, CER). Estos recursos contaban con poca o nula identificación. Debido a esto, se establecieron los métodos necesarios para realizar la identificación de los aislados mediante secuenciación de ITS. Además de lograr definir metodologías simples y rápidas para la extracción de DNA y amplificación de las regiones ITS, se logró establecer un cepario con aislados pertenecientes a diversos géneros/especies, entre ellos, *Alternaria alternata*; *Penicillium rubens*, *griseofulvum*, *glabrum* y *chrysogenum*; *Aspergillus niger* y *creber*; además de los patógenos de gran relevancia: *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*. Dado que se contaba con numerosos aislados de *B. cinerea*, estos fueron ordenados por nivel de resistencia a anti-fúngicos mediante ensayos de crecimiento en placa.

En cuanto a los controladores, CeBiB contaba con aislados obtenidos desde una toma de muestra de rizósfera de Lupino en el desierto de Atacama. Se estimaba – basado en la metodología de aislamiento así como en las características fenotípicas macro y microscópicas – que estos pertenecían al filo Actinomycetota, particularmente a los géneros *Micromonospora* y *Streptomyces*. De esta colección, de aproximadamente 120 aislados, se realizó en este trabajo una selección de un grupo reducido de estos, basado en ensayos de actividad antifúngica contra patógenos de interés obtenidos en la creación de la colección de fito-patógenos.

Esta sub-colección de Actinomycetota fue identificada con mayor precisión mediante secuenciación de sus 16S para establecer su clasificación taxonomica y determinar la probabilidad de que alguna de ellas pudiera pertenecer a una nueva especie. Para esto se analizaron los resultados de secuenciación de 16S mediante bases de datos de referencia. Se logró definir su clasificación y confirmar su pertenencia al género *Streptomyces*, así como determinar bajos niveles de similitud de 16S respecto de las referencias para algunos de estos aislados.

Con todo lo anterior, con este primero desarrollo se establecieron colecciones de trabajo tanto de fito-patógenos de interés agrícola como de potenciales agentes de biocontrol. Ambas colecciones

cuentan con alta certeza respecto de la identidad de los aislados. Además de todo esto, se logró establecer las condiciones de crecimiento óptimas para cada una de ellas.

3.8 Ensayos de actividad antifúngica

La gran cantidad de patógenos y controladores planteaba un desafío importante respecto de la estrategia para acotar los aislados a ser estudiados para obtener nuevos candidatos a biocontroladores. Se optó por un *screening* masivo inicial de alta sensibilidad. Aquellas cepas de controladores que presentaron alguna actividad interesante fueron seleccionados para una segunda ronda frente a patógenos más difíciles de controlar. Todos estos experimentos fueron realizados mediante procedimientos en placa en co-cultivo. Luego se testearon fraccionamientos de estas muestras mediante extracciones líquidas con el método Kupchan UPO.

Algunas de estas cepas fueron analizadas mediante LC-MS/MS a través de una colaboración con el Jaspars Lab, Marine Biodiscovery Centre, Aberdeen University. Una de esas cepas, *Streptomyces sp.* G35A, resultó de particular interés por presentar – mediante análisis de redes moleculares por GNPS – la producción de algunos compuestos relacionados con Anfotericina B. Otra cepa, *Streptomyces sp.* S29, mostró actividad antifúngica mediada por agotamiento de hierro debido a la producción de una diversidad importante de desferrioxaminas.

3.9 Secuenciación de cepas de interés y predicción de BGC

Con estos resultados, se determinó realizar una secuenciación completa del genoma para las cepas G35A y S29. Para esto se estableció que la estrategia más adecuada sería secuenciar mediante las tecnologías de Nanopore e Illumina. Resultaba de particular interés realizar esto con Nanopore, ya que, a la fecha de ejecución, esta tecnología no había sido utilizada para genomas de *Streptomyces*. Con estas lecturas, la estrategia de ensamblaje fue utilizar los datos de Nanopore para el ensamblaje inicial para luego pulir (*polish*) los datos con los *reads* de Illumina. Los resultados ensamblaje mediante el software Canu arrojó 5 contigs para un genoma de ~ 8Mpb para G35A. Para S29 arrojó 17 contigs para un genoma de ~ 7 Mbp. Si bien los genomas presentaban alta integridad, este resultado puede ser mejorado a través de aumentar la profundidad de secuenciación o de mejorar los procedimientos bioinformáticos y software utilizado.

Estos datos genómicos permiten estudiar en profundidad las características generales de estas cepas, así como los BGC presentes. Para esto, se realizó la determinación funcional de los genes presentes mediante RAST lo que permitió tanto tener una visión general del metabolismo celular como la estimación de las cepas más cercanas emparentadas funcionalmente para cada una de las cepas. Por otro lado, el análisis de estos genomas mediante Antismash permitió caracterizar los principales BGC pertenecientes a las distintas familias de metabolitos secundarios. Las tablas 6 y 7 resumen los principales BGC presentes. Esto permitió definir los BGC responsables de la producción de desferrioxaminas en S29 así como algunos candidatos para la producción de los análogos de Anfotericina B en G35A. Dentro de la ruta de síntesis de desferrioxamina, la enzima

DesC destaca por su capacidad de permitir diversidad de sustratos. La DesC putativa de el BGC de S29 para desferrioxamina requiere de particular atención y futuro trabajo para determinar su responsabilidad en la variabilidad de productos observados en la espectroscopia de masas.

3.10 Aplicación *in vitro* de endonucleasa Cas9

Se perseguía también en este trabajo el clonamiento de BGC mediante la utilización de la endonucleasa Cas9 para escindir el fragmento correspondiente al cluster desde gDNA. Para esto se decidió implementar la producción de esta enzima en el laboratorio. Utilizando un sistema de expresión pET y purificación mediante cromatografía de afinidad se logró obtener proteína de alta pureza a concentraciones similares a los productos comerciales.

Para validar el sistema de clonamiento mediante Cas9, se estableció utilizar el cluster de actinorodina procedente de *Streptomyces coelicolor* A3(2) como prueba de concepto, dado que este compuesto es un pigmento de característica coloración azul y que el cluster tiene un tamaño relativamente pequeño (22 Kpb). Tras seleccionar los sitios de corte – y por ende los *spacers* – para Cas9, se prepararon fragmentos de DNA ~1 Kbp que contienen el *spacer*. Estos fragmentos fueron utilizados, por un lado, para validar la actividad de la Cas9 producida en el laboratorio así como para testear distintos *spacers* y su eficiencia de corte. Las digestiones *in vitro* de estos fragmentos demostraron el correcto funcionamiento de la enzima – con un nivel de actividad equivalente a la comercial – y permitieron determinar el sgRNA óptimo para cada uno de los dos cortes dentro de tres opciones disponibles para cada uno.

Para realizar el corte del cluster se debía contar con gDNA íntegro. En particular, para el cluster de actinorodina se debía contar con gDNA de *Streptomyces coelicolor* A3(2). Para esto se optó por realizar la extracción del DNA en células embebidas en agarosa a través de la utilización de enzimas para la degradación de la pared celular. Tras numerosos intentos y ajustes de protocolo se logró realizar esta extracción en forma satisfactoria.

La visualización de fragmentos de DNA de gran tamaño exigía la capacidad de resolver polímeros mayores a 20 Kbp. Esto se logra con electroforésis de campo pulsado ya que la electroforésis de campo unidireccional (común) no permite resolución sobre estos tamaños. Los equipos de electroforésis de campo pulsado no son muy comunes en los laboratorios y además son de alto costo. CeBiB no contaba con uno de estos equipos, por lo que se determinó construir uno. Se logró diseñar, construir, documentar y publicar un equipo de campo pulsado de bajo costo y *open source* denominado openPFGE: El equipo implementa electroforesis de gel rotatorio sobre un campo eléctrico uniforme. Utiliza piezas construidas mediante impresión 3D, materiales de bajo costo (bomba peristáltica, enfriadores de peltier) y un par de componentes estándar de laboratorio (cámara de electroforésis, fuente de poder). El equipo tiene un costo de USD\$850, lo que equivale ~3% del costo de un equipo comercial.

El openPFGE permitió validar la extracción de gDNA íntegra de *Streptomyces coelicolor* A3(2) utilizando ladders de alto peso molecular como referencia. Tras realizar con éxito la digestión *in vitro* de las regiones flanqueadoras del cluster de actinorodina, se intentó la digestión *in vitro* del

cluster completo en el gDNA embebido en agarosa. Las electroforésis de campo pulsado obtenidas mostraron que no había una banda clara en el tamaño esperado para este cluster. Se realizaron numerosos intentos para revertir este resultado sin éxito.

3.11 Perspectivas

Este trabajo avanzó sobre diversas líneas: establecimiento de colecciones de fito-patógenos y bacterias del filo Actinomycetota con actividad anti-fúngica, determinación de cepas productoras de anti-fúngicos, detección de compuestos de interés mediante espectroscopía de masas, secuenciación y predicción de BGC y metodologías para el clonamiento de BGC mediante Cas9 in vitro. Pese a que no se logró el clonamiento de los BGC de interés mediante la técnica propuesta, cada una de las líneas de trabajo quedó terminada o estado avanzado de proceso. Muchos de los hallazgos y desarrollos realizados tienen valor por si mismos y, además, abren el espacio para quienes quieran continuar esta línea de investigación.

Bibliografía

- Aubry, C., Pernodet, J. L., & Lautru, S. (2019). Modular and integrative vectors for synthetic biology applications in *Streptomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(16). <https://doi.org/10.1128/AEM.00485-19>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Barco, R. A., & Merino, N. (2020). FeGenie: A Comprehensive Tool for the Identification of Iron Genes and Iron Gene Neighborhoods in Genome and Metagenome Assemblies. *Front. Microbiol*, 11, 37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00037>
- Barnes, W. M. (1994). PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), 2216–2220. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2216>
- Barona-Gómez, F., Wong, U., Giannakopoulos, A. E., Derrick, P. J., & Challis, G. L. (2004). *Identification of a Cluster of Genes that Directs Desferrioxamine Biosynthesis in Streptomyces coelicolor M145*. <https://doi.org/10.1021/ja045774k>
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), 141–147. <https://doi.org/10.1038/417141a>
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W29–W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
- Bull, A. T., Andrews, B. A., Dorador, C., & Goodfellow, M. (2018). Introducing the Atacama Desert. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(8), 1269–1272. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1100-2>
- Bull, A. T., Asenjo, J. A., Goodfellow, M., & Gómez-Silva, B. (2016). The Atacama Desert: Technical Resources and the Growing Importance of Novel Microbial Diversity. *Annual*

- Review of Microbiology*, 70(1), 215–234. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095236>
- Caffrey, P., Lynch, S., Flood, E., Finnan, S., & Oliynyk, M. (2001). Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chemistry & Biology*, 8(7), 713–723. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00046-1)
- Carver, T., Thomson, N., Bleasby, A., Berriman, M., & Parkhill, J. (2009). DNAPlotter: Circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics*, 25(1), 119–120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn578>
- Challis, G. L. (2005). A Widely Distributed Bacterial Pathway for Siderophore Biosynthesis Independent of Nonribosomal Peptide Synthetases. *ChemBioChem*, 6(4), 601–611. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400283>
- Cobb, R. E., Wang, Y., & Zhao, H. (2014). High-Efficiency Multiplex Genome Editing of *Streptomyces* Species Using an Engineered CRISPR/Cas System. *ACS Synthetic Biology*, 4(c), 141208152636004. <https://doi.org/10.1021/sb500351f>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., & others. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096–1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- El-Tarabily, K. A., Soliman, M. H., Nassar, A. H., Al-Hassani, H. A., Sivasithamparam, K., McKenna, F., & Hardy, G. E. S. J. (2000). Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology*, 49(5), 573–583. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00494.x>
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., & Barakate, M. (2007). Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(11), 1503–1509. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9394-7>
- Evangelista-Martínez, Z. (2014). Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of*

- Microbiology & Biotechnology*, 30(5), 1639–1647. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1568-x>
- Fajarningsih, N. D. (2016). Internal Transcribed Spacer (ITS) as Dna Barcoding to Identify Fungal Species: a Review. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 11(2), 37. <https://doi.org/10.15578/squalen.v11i2.213>
- Fguira, L. F. B., Fotso, S., Ameer-Mehdi, R. Ben, Mellouli, L., & Laatsch, H. (2005). Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Research in Microbiology*, 156(3), 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.10.006>
- FLORES, F. J., & MARTÍN, J. F. (2004). Iron-regulatory proteins DmdR1 and DmdR2 of *Streptomyces coelicolor* form two different DNA-protein complexes with iron boxes. *Biochemical Journal*, 380(2), 497–503. <https://doi.org/10.1042/bj20031945>
- Gomez-Escribano, J. P., & Bibb, M. J. (2011). Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biotechnology*, 4(2), 207–215. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00219.x>
- Gwinn, K. D. (2018). *Bioactive Natural Products in Plant Disease Control* (pp. 229–246). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64058-1.00007-8>
- Herbert, R. B. (1989). *The biosynthesis of secondary metabolites*. Springer Science & Business Media.
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10(4), 273–290. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.273.290>
- Jarmusch, S. A., Lagos-Susaeta, D., Diab, E., Salazar, O., Asenjo, J. A., Ebel, R., & Jaspars, M. (2021). Iron-mediated fungal starvation by lupine rhizosphere-associated and extremotolerant *Streptomyces* sp. S29 desferrioxamine production. *Molecular Omics*, 17(1), 95–107. <https://doi.org/10.1039/D0MO00084A>
- Jiang, W., Zhao, X., Gabrieli, T., Lou, C., Ebenstein, Y., & Zhu, T. F. (2015). Cas9-Assisted Targeting of CHromosome segments CATCH enables one-step targeted cloning of large gene clusters. *Nature Communications*, 6, 8101. <https://doi.org/10.1038/ncomms9101>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(August), 816–822. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jones, A. C., Gust, B., Kulik, A., Heide, L., Buttner, M. J., & Bibb, M. J. (2013). Phage P1-Derived Artificial Chromosomes Facilitate Heterologous Expression of the FK506 Gene Cluster. *PLoS ONE*, 8(7), e69319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069319>

- Joo, G. J. (2005). Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters*, 27(19), 1483–1486. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-1315-y>
- Jorquera, M. A., Graether, S. P., & Maruyama, F. (2019). Editorial: Bioprospecting and Biotechnology of Extremophiles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00204>
- Kautsar, S. A., Blin, K., Shaw, S., Navarro-Muñoz, J. C., Terlouw, B. R., van der Hooft, J. J. J., van Santen, J. A., Tracanna, V., Suarez Duran, H. G., Pascal Andreu, V., Selem-Mojica, N., Alanjary, M., Robinson, S. L., Lund, G., Epstein, S. C., Sisto, A. C., Charkoudian, L. K., Collemare, J., Linington, R. G., ... Medema, M. H. (2019). MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz882>
- Keiser, T., Bibb, M., Buttner, M., Chater, K., & Hopwood, D. (2000). Practical streptomyces genetics. In *The John Innes Foundation*.
- Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
- Lagos-Susaeta, D., Salazar, O., & Asenjo, J. A. (2020). openPFGE: An open source and low cost pulsed-field gel electrophoresis equipment. *HardwareX*, 8, e00128. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2020.e00128>
- Lee, L.-H., Chan, K.-G., Stach, J., Wellington, E. M. H., & Goh, B.-H. (2018). Editorial: The Search for Biological Active Agent(s) From Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00824>
- Liu, Y., Tao, W., Wen, S., Li, Z., Yang, A., Deng, Z., & Sun, Y. (2015). In vitro CRISPR/cas9 system for efficient targeted DNA editing. *MBio*, 6(6), e01714-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01714-15>
- Lopez-Canovas, L., Martinez Benitez, M. B., Herrera Isidron, J. A., & Flores Soto, E. (2019). Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 573, pp. 17–29). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.020>
- Maglangit, F., Tong, M. H., Jaspars, M., Kyeremeh, K., & Deng, H. (2019). Legonoxamines A-B, two new hydroxamate siderophores from the soil bacterium, *Streptomyces* sp. MA37. *Tetrahedron Letters*, 60(1), 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.11.063>
- McMurry, J. (2011). *Organic chemistry with biological applications*. 30.
- Miao, V., & Davies, J. (2010). Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(2), 143–150. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9440-6>

- Moorman, W. J., Cheever, K. L., Skaggs, S. R., Clark, J. C., Turner, T. W., Marlow, K. L., & Schrader, S. M. (2000). Male adolescent exposure to endocrine-disrupting pesticides: Vinclozolin exposure in peripubertal rabbits. *Andrologia*, 32(4–5), 285–293. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2000.00400.x>
- Nassonova, E. S. (2008). Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and application. *Cell and Tissue Biology*, 2(6), 557–565. <https://doi.org/10.1134/S1990519X08060011>
- Neoh, H. min, Tan, X. E., Sapri, H. F., & Tan, T. L. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 74, p. 103935). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>
- Nguyen, T., Ishida, K., Jenke-Kodama, H., Dittmann, E., Gurgui, C., Hochmuth, T., Taudien, S., Platzer, M., Hertweck, C., & Piel, J. (2008). Exploiting the mosaic structure of trans-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. *Nature Biotechnology*, 26(2), 225–233. <https://doi.org/10.1038/nbt1379>
- Okamoto, S., Taguchi, T., Ochi, K., & Ichinose, K. (2009). Biosynthesis of Actinorhodin and Related Antibiotics: Discovery of Alternative Routes for Quinone Formation Encoded in the act Gene Cluster. *Chemistry & Biology*, 16(2), 226–236. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2009.01.015>
- Osborn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: Evolutionary toolkits for chemical innovation. In *Trends in Genetics* (Vol. 26, Issue 10, pp. 449–457). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.07.001>
- Pessarakli, A. H. and M. (2010). A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10(4), 273–290. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.273.290>
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Rampelotto, P. H. (Ed.). (2016). *Biotechnology of Extremophiles*: (Vol. 1). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2>
- Rashad, Y. M., & Moussa, T. A. A. (2020). Biocontrol Agents for Fungal Plant Diseases Management. In *Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications* (pp. 337–363). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33161-0_11
- Ronan, J. L., Kadi, N., McMahon, S. A., Naismith, J. H., Alkhalaf, L. M., & Challis, G. L. (2018). Desferrioxamine biosynthesis: Diverse hydroxamate assembly by substrate-tolerant

- acyl transferase DesC. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1748). <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0068>
- Rossman, A. Y. (2009). The impact of invasive fungi on agricultural ecosystems in the United States. *Biological Invasions*, 11(1), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s10530-008-9322-2>
- Sandy, M., & Butler, A. (2009). Microbial Iron Acquisition: Marine and Terrestrial Siderophores. *Chemical Reviews*, 109(10), 4580–4595. <https://doi.org/10.1021/cr9002787>
- Schwartz, D. C., & Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), 67–75. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90301-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90301-5)
- Senges, C. H. R., Al-Dilaimi, A., Marchbank, D. H., Wibberg, D., Winkler, A., Haltli, B., Nowrousian, M., Kalinowski, J., Kerr, R. G., & Bandow, J. E. (2018). The secreted metabolome of *Streptomyces chartreusis* and implications for bacterial chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(10), 2490–2495. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715713115>
- Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), 285–295. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(03\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(03)00020-6)
- Shen, B., Cheng, Y.-Q., Christenson, S. D., Jiang, H., Ju, J., Kwon, H.-J., Lim, S.-K., Liu, W., Nonaka, K., Seo, J.-W., Smith, W. C., Standage, S., Tang, G.-L., Van Lanen, S., & Zhang, J. (2007). *Polyketide Biosynthesis beyond the Type I, II, and III Polyketide Synthase Paradigms: A Progress Report* (pp. 154–166). <https://doi.org/10.1021/bk-2007-0955.ch011>
- Shimizu, Y., Kotera, M., Tokimatsu, T., & Hattori, M. (n.d.). Comprehensive Analysis of Polyketide Synthase Families. *Jsbi.Org*, 200–201. <http://www.jsbi.org/pdfs/journal1/GIW09/Poster/GIW09P022.pdf>
- Skinninger, M. A., Merwin, N. J., Johnston, C. W., & Magarvey, N. A. (2017). PRISM 3: expanded prediction of natural product chemical structures from microbial genomes. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W49–W54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx320>
- Southern, E. M., Anand, R., Brown, W. R. A., & Fletcher, D. S. (1987). A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 15(15), 5925–5943. <https://doi.org/10.1093/nar/15.15.5925>
- Tacão, M., Alves, A., Saavedra, M. J., & Correia, A. (2005). BOX-PCR is an Adequate Tool for Typing *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88(2), 173–179. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-3450-9>
- Tanaka, Y., & Omura, S. (1993). AGRC)ACTIVE COMPOUNDS OF MICROBIAL ORIGIN. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47(1), 57–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.000421>

The Art and Science of Natural Products Purification : Basic Preparative Phytochemistry for Plant Scientists Participants ' handbook. (2016).

Vicente, M. F., Basilio, A., Cabello, A., & Peláez, F. (2003). Microbial natural products as a source of antifungals. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(1), 15–32. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00489.x>

Ward, A. C., & Bora, N. (2006). Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.04.004>

WO2009121495A1 - Highly pure pentamycin - Google Patents. (n.d.). Retrieved March 31, 2022, from <https://patents.google.com/patent/WO2009121495A1/en>

Xiao, K., Kinkel, L. L., & Samac, D. A. (2002). Biological Control of Phytophthora Root Rots on Alfalfa and Soybean with Streptomyces. *Biological Control*, 23(3), 285–295. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.1015>

Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>

Anexos

Anexo A. Listado de Plasmidios

Tabla 9: Listado de plasmidios

lasmid	Description	Antibiotic resistance	Reference or source
pET22b	N-terminal pelB signal sequence for potential periplasmic localization, plus optional C-terminal His-Tag® sequence. Target genes are under control of strong bacteriophage T7 transcription. Expression is induced by providing a source of T7 RNA polymerase in the host cell.	AMP	Novagen — Cat. No. 69744-3
pET22b CAS9	pET22b plasmid carrying wild-type CAS9 gene from <i>S. pyogenes</i> . No export peptide. C-terminal His-Tag® sequence included.	AMP	This work
pwtCas9	aTc-inducible expression of wild-type Cas9 (<i>S. pyogenes</i>) for bacterial gene knockdown	AMP	(Qi et al., 2013)
pCRISPomyces-2	Streptomyces expression of codon-optimized Cas9 and custom gRNA	Apramycin	(Cobb et al., 2014)
pCRISPomyces-2-ko-acylt-S29	PCRISPomyces-2 con un segundo cassette de expresión de sgRNA y spacers clonados para el KO de desC en S29. Contiene dos secuencias de homología de 1kb cada una para HDR	Apramycin	This work
pESAC13	P1-derived artificial chromosome. Vector. Phage P1 origin of replication, phiC31 integration system, oriT site that allows transfer into Streptomyces by conjugation, rather than by time-consuming protoplast transformation. The bla resistance gene in pESAC13 is lost upon library construction; however, the vector also confers kanamycin resistance in <i>E. coli</i> and thiostrepton resistance in Streptomyces.	Kanamycin (<i>E. coli</i>) Thiostrepton (<i>Streptomyces</i>)	M. Sosio and S. Donadio, NAICONS, Milano, Italy. Bio S&T Inc
POSV801 pOSV802 pOSV807 pOSV812	Standardized and modular vectors designed to afford the construction or the refactoring of biosynthetic gene clusters in Streptomyces species, using a large panel of cloning methods (three different resistance cassettes and four orthogonal integration systems). Details in paper	Apramycin hygromycin kanamycin	or (Aubry et al., 2019) or

Anexo B. Listado de Oligonucleótidos

i. PCR primers

Tabla 10: PCR primers

Oligonucleotide name	Sequence (5' → 3')
ACT 1kb 5 fwd	GGACGTCTCGAAGTCCGTG
ACT 1kb 5 rev	GAGGCACAGGACGATGTCC
ACT 1kb 3 fwd	TCTCCTCCACCATGTGGGT
ACT 1kb 3 rev	GGTGCTCATCGGAACTCCTT
CAS9 pET22b prev.pelB fwd	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGATAAGAAATACT CAATAGGC
CAS9 pET22b HIStag rev	AGTCAGCTAGGAGGTGACCACCACCACCACCACC
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
pET22b HIStag fwd	CACCACCACCACCACC
pET22b prev.pelB rev	TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT
27F	agagttgatcatggctcag
1492R	tacggttacctgttacgactt

desc-ko-sgRNA-5-fwd	ACGCGAGCACCACCACCCCGTCCG
desc-ko-sgRNA-5-rev	AAACCGACGGGGGTGGTGGTGCTC
desc-ko-sgRNA-3-fwd	ACGCGCGGGTGCAGAAGCTCAGCA
desc-ko-sgRNA-3-rev	AAACTGCTGAGCTTCTGCACCCGC
desc-ko-check-fwd	ACCGGTACACCGAGCCGGAG
desc-ko-check-rev	GTTCGCGCCGTCGCG

ii. sgRNA secuencias

Tabla 11: sgRNA secuencias

sgRNA name	Sequence (5' → 3')
desC-sgRNA-5	GAGCACCACCACCCCGTCCG
desC-sgRNA-3	GCGGGTGCAGAAGCTCAGCA

iii. Oligonucleotidos para la generación de templados de DNA para IVT

Tabla 12: Oligonucleotidos para la generación de templados de DNA para IVT

Oligonucleotide name	Sequence (5' → 3')
ACT 5 op1 proto	TTCTAATACGACTCACTATAGCTGGACCGGGACCCCGAGGGG TTTAGAGCTAGA
ACT 5 op2 proto	TTCTAATACGACTCACTATAGCGGGCCCTCTCGAACACGGGTT TTAGAGCTAGA
ACT 5 op3 proto	TTCTAATACGACTCACTATAGCGGTACCTCGACGATCGCCGGT TTAGAGCTAGA
ACT 3 op1 proto	TTCTAATACGACTCACTATAGTAGTCGAGGAACCCCGCGAGTT TTAGAGCTAGA
ACT 3 op2 proto	TTCTAATACGACTCACTATAGCGTCTGCTCGTCCGCCGCGGT TTAGAGCTAGA
ACT 3 op3 proto	TTCTAATACGACTCACTATAGACGTGGTTCGACGACCTCGGGTT TTAGAGCTAGA
S. pyogenes Cas9 Scaffold	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGG CTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAAC

* Protospacer is underlined.

Anexo C. Listado de cepas bacterianas

Tabla 13: Listado de cepas bacterianas

Plasmid	Description	Reference or source
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	T7 RNA polymerase gen and lacIq F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Rutine cloning strain. F- mcrA δ(mrr- hsdRMS-mcrBC) ψ80lacZΔM15	Invitrogen

	δ lacX74 nupG recA1 araD139 δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ -	
<i>Escherichia coli</i> Rosetta2	BL21 derivative designed to enhance the expression of eukaryotic proteins that contain codons rarely used in <i>E. coli</i> . These strains supply tRNAs for 7 rare codones (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, and CGG) on a compatible chloramphenicol-resistant plasmid. The tRNA genes are driven by their native promoters. F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR)	Merck
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Methylation deficient strain used for conjugation with <i>Streptomyces</i> . pUZ8002 provides conjugation machinery. <i>dam13::Tn9</i> (Chloramphenicol resistance) <i>dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-201::Tn10 galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtlI glnV44</i> , pUZ8002 (kanamycin resistance)	pR9406, A. Siddique and D. Figurski, unpublished
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	Wild-type strain. Prototrophic derivative of strain A3(2) lacking its two plasmids (SCP1, linear, 365 kb, AL590463, AL590464; and SCP2, circular, 31 kb, AL645771)	(Bentley et al., 2002)
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1152	M145, Δ act Δ red Δ cpk Δ cda rpoB[C1298T] ([S433L])	(Gomez-Escribano & Bibb, 2011)
<i>Streptomyces</i> sp. G35A	Isolated from Lupine rhizosphere	This work
<i>Streptomyces</i> sp. S29	Isolated from Lupine rhizosphere	This work
<i>Streptomyces nodosus</i>	ATCC 14899=CBS 926.68=DSM 40109=F-3293=IFO 12895=IMRU 3694=ISP 5109=JCM 4297=JCM 4656=M 4575=NCIMB 12816=RIA 1123=RIA 831=SC-2388 soil, Orinoco River region, Venezuela	Bennett (Squib Inst. for Med. Res.) Obtenida desde NRRL collection
<i>Streptomyces natalensis</i>	ATCC 27448=CBS 668.72=CBS 700.57=DSM 40357=IFO 13367=ISP 5357=JCM 4693=JCM 4795=NCIB 10038=NRRL 2651=NRRL B-5314=RIA 1328 soil, Pietermaritzburg, Natal (U. of S. Africa), South Africa	Shirling (ISP) Obtenida desde NRRL collection
<i>Streptomyces noursei</i>	ATCC 11455=CBS 240.57=DSM 40635=JCM 4922=J.M.COFFEY 48240=NCIB 8593 soil, Fauquier Country, VA, USA	ATCC Obtenida desde NRRL collection

Anexo D. Recetas de medios, soluciones y buffers

i. Recetas relacionadas a enzimas

Tabla 14: Cas9 Nuclease Reaction Buffer

Compuesto	Concentración	Unidad
HEPES	20	mM
NaCl	100	mM
MgCl ₂	5	mM
EDTA	0.1	mM
pH	6.5	

Tabla 15: CAS9 storage buffer

Compuesto	Concentración	Unidad
NaCl	500	mM
Tris-HCl	10	mM
EDTA	0.1	mM

Dithio-threitol [DTT]	1	mM
Glycerol	50	%
pH	7.4	

Tabla 16: Solución de liticase

Compuesto	Concentración	Unidad
Lyticase	10	U/ml
Tris pH 7.5	500	mM
EDTA	10	mM
β -mercaptoethanol	28	mM

ii. Medios líquidos

Tabla 17: ISP2 medium

Compuesto	Concentración	Unidad
Yeast extract	4	g / L
Malt extract	10	g / L
Glucose	4	g / L

Tabla 18: LB medium

Compuesto	Concentración	Unidad
Yeast extract	5	g / L
Tryptonet	10	g / L
NaCle	10	g / L

iii. Medios sólidos

Tabla 19: abouraud Agar

Compuesto	Concentración	Unidad
Dextrose (Glucose)	40	g/L
Peptone	10	g/L
Agar	15	g/L
Chloramphenicol	50	mg/L
pH	6.5	

iv. Small RNA urea denaturing PAGE

Tabla 20: 10XTBE

Compuesto	Concentración	Unidad
TRIS	54	g
Boric Acid	27.5	g
EDTA 0.5 [M], pH 8.0	20	ml
H ₂ O	up to 500	ml
ph	8.3	width HCl

Tabla 21: Formamide buffer

Compuesto	Concentración	Unidad
Formamide	90	%
EDTA	0.5	%
Bromophenol blue	0.1	%

v. NiNTA and PD10 purification

Tabla 22: Binding buffer

Compuesto	Concentración	Unidad
Tris	40	mM
NaCl	500	mM
Imidazole	5	mM
pH	7.9	with HCl

Tabla 23: Elutie buffer

Compuesto	Concentración	Unidad
Tris-Cl	20	mM
Imidazole	250	mM
NaCl	250	mM
Glycerol	10	%
pH	8.0	

Anexo E. Protocolos

i. Protocolos para la síntesis, purificación y visualización de gRNA

- ***Oligonucleotide joining for DNA template generation for IVT***

Mezclar en hielo:

Componente	Concentración	Unidad
Nuclease-free water	33.5	ul
HF Buffer (NEB) 10 X	10	ul
S. pyogenes Cas9 Scaffold 10 uM	2.5	ul
T7 promoter + protospacer oligonucleotide 10 mM	2.5	ul
dNTP 1:1:1:1 10 mM	1	ul
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	0.5	ul

Incubar en termociclador según:

Temperature (°C)	Time (s)
98	20
72	20
60	20
55	20
48	20
42	20
37	60
42	40
48	30
55	20
60	20
72	20

Purificar con cualquier Gel Extraction Kit (como PCR clean)

- ***in vitro transcription (IVT)***

Las IVT fueron realizadas utilizando el kit HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit de NEB. De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se debe combinar a temperatura ambiente:

Componente	Concentración	Unidad
Nuclease-free water	Up to 20	ul
NTP Buffer Mix	10 (10 mM each NTP final)	µl
Template DNA	1	ug

Incubar a 37°C for 4-16 hrs. Para transcritos cortos, es preferible una incubación de 16 hrs

• ***in vitro transcription (IVT) purification***

Protocolo adaptado desde referente (Jiang et al., 2015).

1. Agregar 130 ul de agua ultrapura a 50 ul de reacción de IVT
2. Agregar 4 ul de Dnase I. Mezclar
3. Incubar a 37°C por 15 minutos
4. Agregar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamil (25:24:1, pH < 5.0)
5. Vortex por 15 s
6. Incubación a RT x 3 min
7. Centrifugar a 12.000g a 4°C por 10 min
8. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml
9. Agregar 20 ul (~10% del volumen final) de acetato de sodio 3M (pH 5.5) y mezclar
10. Agregar un volumen (~200 ul) de isopropanol y mezclar completamente
11. Incubar a -80 °C por 10 minutos
12. Colectar el pellet por centrifugación a 12.000 g a 4°C por 30 minutos
13. Remover y descartar sobrenadante
14. Lavar el pelet dos veces con 50 ul de etanol 70%
15. Centrifugar a temperatura ambiente y descartar todo el etanol
16. Secar el pelet abriendo el tubo al ambiente por 5 minutos
17. Resuspender en 100 ul de agua ultrapura
18. Se espera una concentración de 300 – 1.000 ng/ul y $A_{260}/A_{280} > 2.0$ es ideal

• ***Small RNA Urea denaturing PAGE***

Preparación de las muestras:

1. Combinar 1ug de RNA en un máximo de 2.5 ul (completar con agua si es necesario)
2. Agregar 7.5 ul de Formamide buffer
3. Calentar a 70 – 90 °C por un par de minutos para denaturar el RNA. Enfriar a RT

Para 5 ml de gel 8M urea – 15% Acrilamida

1. Mezclar, a excepción de TEMED y APS:

Componente	Concentración	Unidad
Acrilamide:Bisacrilamide 29:1	1.875	ml
ultrapure UREA	2.4	g
10 X TBE	500	ul
APS (PSA) 10%	49.8	ul
TEMED	2	ul
milliqH2O	up to 4.93	ml

2. Calentar al microondas por algunos segundos, hasta que se disuelva la urea
3. Cargar en el molde del gel
4. Luego de la polimerización (~30 min), precorrer el gel por 30 minutos para que alcance su temperatura óptima y elimine el exceso de urea
5. Cargar las muestras y correr por 1 a 2 horas
6. Transferir el gel a 100 ml de TBE. Agregar 2 ul de RedGel. Incubar por 10 min. Revelar bajo UV

ii. Protocolos asociados con CAS9

• *CAS9 in vitro digestion*

1. Mezclar, con excepción del DNA:

Componente	Concentración	Unidad
sgRNA	22.4	ng/ul
CAS9	14	ng/ul
Cas9 Nuclease Reaction Buffer	1	X
DNA	4.59	ng/ul

Reacción típica es de 15 ul

2. Incubar a 25 °C por 10 min
3. Agregar el DNA
4. Incubar a 37 °C por 120 min y luego a 65 °C por 5 min para denaturar Cas9
5. Agregar 1 ul de Proteinasa K por cada 15 ul de reacción para degradar Cas9²⁹

²⁹ Esto es necesario para la visualización en agarosa, ya que Cas9 se una fuerte e inespecíficamente al DNA y no permite su normal migración

6. Incubar a 50 °C por 30 min
7. Cargar en gel de agarosa

iii. Protocolos asociados a digestión *in vitro* de DNA genómico

• Preparación de gDNA plugs

1. Centrifugar a 8000 rpm 5 ml de cultivo ON de *Streptomyces sp.* en ISP2 a OD600=0.1
2. Lavar con 10 ml de TE-25 x 2 veces
3. Resuspender en 1 ml de TE-25
4. Incubar a 50°C
5. Incubar 1 ml de agarosa 2% LMP a 50°C
6. Combinar 1:1 la agarosa y el cultivo lavado
7. Tomar con jeringa de 1 ml
8. Refrigerar a 4 °C x 10 min
9. Cortar en trozos de 2mm de alto usando cubreobjeto (vidrio, NO USAR METAL)
10. Incubar ~25 plugs en 10 ml de lisozima 2mg/ml en TE-25 por 2 horas a 37°C en una placa petri chica
11. Agitar manualmente en forma ocasional
12. Eliminar lisozima
13. Lavar con 10 ml TE-25
14. Agregar 10 ml de proteinasa K 1 mg/ml en NDS (preincubada a 50°C x 1h)
15. Incubar por 12h a 50 °C
16. Eliminar proteinasa K
17. Lavar con TE x 2 veces
18. Incubar en TE + 0.1 mM PMSF x 1 h
19. Lavar con TE
20. Incubar en TE x 1 h x 3 veces
21. Se pueden guardar x hasta 1 mes en TE a 4

• Digestión de plugs de agarosa de gDNA mediante enzimas de restricción

1. Colocar un plug de agarosa en eppendorf 2 ml

2. Agregar al plug 1 ml de buffer de reacción (1X) de la enzima de restricción a utilizar para ambientar
3. Eliminar sobrenadante
4. Agregar al plug 100 ul enzima de restricción (Ejemplo: EcoRI - 50 U / 100 ul) en buffer de enzima. Agregar 1% de BSA (2mg/ml) si el buffer no contiene BSA
5. Incubar > 6 h a 37°C
6. Eliminar sobrenadante
7. Lavar plug con 1 ml de TE
8. Correr en gel de agarosa

iv. Protocolos para la manipulación de *Streptomyces*

• Aislamiento de *Streptomyces*

Una alícuota de muestra de suelo fue calentada a 100 °C por 5 min y esparcida directamente en placas de Gause #1 y StrachCasein, ambos complementados con nistatina, ciclohexamida y ácido nalidíxico. Otra alícuota fue resuspendida en ¼ Ringer solution y calentada a 60 °C por 10 min. Las diluciones $10^{-1/2}$ y 10^{-1} fueron esparcidas en placas del mismo tipo. Las placas fueron incubadas a 30 °C por ~ 1 semana y las colonias fueron subcultivadas en placas de ISP2 y finalmente guardadas como glicerol stock.

• Preparación de stock de esporas

Protocolo adaptado desde [http://openwetware.org/wiki/Streptomyces:Protocols/Spore Prep](http://openwetware.org/wiki/Streptomyces:Protocols/Spore_Prep) y (Keiser et al., 2000).

1. Picar una colonia de *Streptomyces* sp. en una placa de agar SFM fresca, utilizando un bastoncillo de algodón estéril
2. Incubar a 30 ° C hasta alcanzar la esporulación completa.
3. Preparar el sistema de filtración. Rellenar una jeringa de 10 ml con algodón hidrófilo. Introducir el émbolo dentro del barril, dejando el sello del émbolo en la parte superior del barril. Envolver el sistema de filtración con papel de aluminio y esterilizar en autoclave. No tocar el adaptador durante todo el proceso.
4. Una vez que las células alcanzaron la esporulación completa, inundar las placas con 2 ml de glicerol al 20% y frote suavemente la superficie de la placa con un esparcidor de células hecho con una pipeta Pasteur.
5. Transferir la solución (glicerol al 20% más esporas y desechos) con una punta cortada a un tubo Eppendorf limpio de 1,5 ml y aplicar vórtex brevemente

6. Vertir el contenido del tubo Eppendorf en el sistema de filtración (sugerencia: coloque la jeringa con su adaptador dentro de un tubo Eppendorf limpio de 1,5 ml mientras el émbolo está separado del cilindro)
7. Expulsar la solución del sistema de filtración a un tubo Eppendorf estéril
8. Almacenar el stock de esporas a -20°C

• **Aislamiento de DNA genómico de *Streptomyces***

1. Iniciar un cultivo de *Streptomyces* en 50 ml de medio TSB a una temperatura adecuada para la cepa en uso, 250 rpm, hasta alcanzar una alta densidad celular (generalmente alrededor de 48 h).
2. Alícuotar el cultivo en volúmenes de 5 ml en tubos de centrifuga cónicos de 15 ml y centrifugar a 3500 rpm durante 10 min.
3. Desechar el sobrenadante y resuspender en 5 ml de glicerol al 20% y almacenar a -20°C hasta el aislamiento del DNA genómico.
4. Descongele las células y centrifugue a 3500 rpm durante 10 min y deseche el glicerol.
5. Resuspenda el sedimento celular en 5 ml de buffer SET y agregar 150 μl de 50 mg / ml de lisozima e incubar a 37°C durante 2 h. Mezclar brevemente cada 30 min.
6. Agregar 300 μl de solución SDS al 20% (del proveedor)
7. Añadir 75 μl de proteinasa K (Fermentas E00491-1ML) e incubar a 60°C durante 1,5 h hasta que la mezcla se vuelva traslúcida.
8. Agregar 2 ml de NaCl 5 M y mezclar lentamente. Aquí el DNA se precipitará
9. Llenar el tubo centrífugo cónico con cloroformo (grado analítico)
10. Mezclar por inversión en un mezclador rotatorio durante 30 min.
11. Centrifugar la muestra a 4000 rpm durante 20 min.
12. Recuperar con cuidado la primera fase de la solución con una punta estéril y cortada. Registrar el volumen recolectado
13. Agregar el mismo volumen de isopropanol que el registrado en el paso anterior y mezclar por inversión, brevemente
14. Añadir 1 ml de etanol al 70% a un tubo Eppendorf estéril de 2,0 ml
15. Con una pipeta Pasteur, hacer un anzuelo para extraer el DNA. Transferir el DNA al tubo con etanol
16. Centrifugar a 4.000 rpm, 1 min.
17. Pipetear con cuidado el sobrenadante. Secar las muestras a 60°C (no secar demasiado)

18. Dependiendo del rendimiento del proceso, resuspender en 20–100 µl de tampón Tris-EDTA.

- **BoxPCR**

Mix:

Reactivo	Stock	Volumen (ul)
Green GoTaq® Reaction Buffer	5X	2
MgCl ₂	25 mM	0.6
gNTP (60% GC)	8mM AT, 12mM GC	0.2
BOXA1R	100 uM	0.16
GoTaq		0.05
gDNA	De kit	0.5
DMSO	100%	0.8
H ₂ O		upto 10

Programa:

- Denaturación inicial 95° por 5 min
- X30 ciclos:
 - Denaturación 95° por 1 min
 - Alineamiento 52° por 1 min
 - Extensión 72° por 3 min
- Extensión final 72° por 5 min

v. Protocolos para la manipulación de hongos

- ***Extracción de DNA genómico para templado PCR mediante liticase e incubación a alta temperatura***

1. Cultivar hongos en placa de agar
2. Resuspender con 2 ml de glicerol al 10% utilizando una pipeta Pasteur estéril
3. Tomar 30 ul la resuspensión en un nuevo tubo Eppendorf
4. Añadir 470 ul de dH₂O al 1%
5. Agregar 250 ul de solución de lyticase e incubar a 37 ° C durante 30 min para producir esferoplastos
6. Centrifugar a máxima velocidad durante 10 min. Desechar el sobrenadante
7. Resuspender en 200 ul de dH₂O
8. Calentar a 100 ° C durante 10 min

9. Almacenar a -20 ° C para uso posterior

vi. Protocolos bioensayos

• **Bioensayo selección aislado *Botrytis CER***

1. Grow *S. noursei* y *S. sp G23* (Lupino isolate) from glycerol stock at -80 in to a fresh ISP2 plate at 30°C for 4 days
2. Pick an agar plug and use it to inoculate 10 fresh ISP2 plates (invert the plug over the surface of the new agar plate)
3. Use pre-made spore stock of *Botrytis* samples (10), all at same concentration
4. Pick an standar volume and inoculate at 2cm from the *Streptomyces* plug
5. Let air dry until complete absortion/evaporation of the dot
6. Incubate the plate at 25°C and darkness for 10 days

• **Screening inicial de actividad antifúngica**

1. Cada aislado de interés fue crecido en ISP2 por 7 días a 30°C
2. Se tomaron tapones de cada muestra (usando una punta de 1 ml) y se colocaron en placas petri nuevas (4 tapones/placa). Se vertió PDA (a 50°C) hasta casi cubrir los tapones.
3. Después de la solidificación, se inocularon 20 ul de solución de esporas de un fitopatógeno desde glicerol stock a ~2 cm del tapón.
4. Las placas se incubaron durante 10 días a 30°C.

• **Ceparío completo Lupino**

1. Aislados de diversos controladores fueron crecidas en medio ISP2 durante 7 días a 30 °C
2. Bocados de cada aislado de controlador fueron colocados en una nueva placa con medio de producción (4 controladores por placa a 2 cm del centro) (ISP 2 y 19 para *Streptomyces*; GYM y 333 para *Micromonosporas*)
3. Incubación por 2 días a 30°C
4. Se inoculó patógeno (*Botrytis cinerea*) en el centro de la placa (10ul de stock 4 x10⁴ e/ml)
5. Incubación por 7 días a 25°C

• **Selección de ceparío Lupino en PDA**

1. Aislados de diversos controladores fueron crecidas en medio ISP2 durante 7 días a 30 °C
2. Bocados de cada aislado de controlador fueron colocados en una nueva placa con medio PDA (2 controladores por placa a 2 cm del centro)

3. Incubación por 2 días a 30°C
4. Se inoculó patógeno (*Botrytis cinerea*) en el centro de la placa (10ul de stock 4 x10⁴ e/ml)
5. Incubación por 7 días a 25°C

• **Sobrenadante de cultivo de selección de cepario Lupino en PDA**

1. Inoculación 5 ml medio 400 y OM en vial 20ml con tapón a partir de precultivo en placa ISP2
2. Crece por 7 días a 30°C, 200 rpm con perlitas
3. Toma de muestra 50 ul a los 3, 5 y 7 días
4. Volumen de muestra es centrifugado y aplicado al pocillo de placa PDA (4 pocillos por placa a 2 cm del centro)
5. Se inoculó patógeno (*Botrytis cinerea*) en el centro de la placa (10ul de stock 4 x10⁴ e/ml)

vii. Protocolos generales

• **Gibson assembly**

El buffer de reacción isotérmico 5X contiene:

El 2X Master Mix contiene:

Reacción de ligación:

1. Mezclar en hielo 50% v / v de 2X Master Mix y 50% v / v de los fragmentos que se ligarán en igual molaridad.
2. Incubar durante 1 hora a 50 ° C.
3. Transformar bacterias, revelar en un gel de agarosa o amplificar directamente por PCR.

• **Protocolo de células competentes de cloruro de calcio de E. coli**

1. Iniciar un cultivo durante la noche de la cepa de E. coli en 5 ml de LB a 37 ° C
2. Inocular 50 ml de LB fresco, en 250 matraces Erlenmeyer, con 1 ml (1/50) de E. coli del cultivo nocturno. Incubar a 37 ° C y 250 rpm hasta que se alcance una DO medida a 600 nm entre 0,2-0,3
3. Incubar el cultivo en hielo durante 10 min
4. Centrifugar el cultivo en tubos de centrifuga cónicos de 50 ml a 3000 rpm a 4 ° C durante 10 min.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 12,5 ml (1/4) de MgCl₂ 0,1 M y colocar el sedimento resuspendido en hielo durante 5 min

6. Centrifugar a 4 ° C y 4000 rpm durante 10 min
7. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 2,5 ml (1/20) de CaCl₂ 0,1 M y colocar el sedimento resuspendido en hielo durante 20 min
8. Centrifugar a 4 ° C y 4000 rpm durante 10 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 1 ml (1/50) de una solución de CaCl₂ 0,1 M al 85% más glicerol al 15%. Nota. La solución de CaCl₂ 0,1 M al 85% más glicerol al 15% contiene, para cultivo de 50 ml de volumen inicial: 42,5 ml de CaCl₂ 0,1 M más 7,5 ml de glicerol al 80%
9. Distribuya alícuotas de la suspensión resultante en 100 µl en tubos Eppendorf estériles de 0,6 ml y almacénelos a -80 ° C hasta su uso.

• **Protocolo de células electrocompetentes de *E. coli***

1. Inicire un cultivo durante la noche de la cepa de *E. coli* en 5 ml de LB a 30 ° C o 37 ° C con (o sin) los antibióticos relevantes y agite a 250 rpm
2. Temprano a la mañana siguiente, inocular 50 ml de LB fresco, complementado con (o sin) antibióticos relevantes, con 1 ml (1/50) de *E. coli* del cultivo de la noche. Incubar a 30 ° C o 37 ° C a 250 rpm hasta que se alcance la DO medida a 600 nm entre 0.5–0.7. Colocar la solución de glicerol en hielo para su uso posterior
3. Colocar el cultivo en hielo durante 10 min 494. Cultivo de centrifugado en tubos de centrífuga cónicos de 50 ml a 4000 rpm durante 5 min a 4 ° C
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 20 ml (1 / 2.5) de glicerol al 10% (mantenido en hielo)
5. Centrifugar a 4 ° C y 4000 rpm durante 5 min.
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 20 ml (1 / 2.5) de glicerol al 10% (mantenido en hielo)
7. Centrifugar a 4 ° C y 4000 rpm durante 5 min.
8. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 1 ml de glicerol al 10% (mantenido en hielo)
9. Prepare alícuotas de 100 µl en tubos Eppendorf de 0,6 ml (previamente esterilizados en autoclave) y almacénelos a -80 ° C.

• **Transformación química de *E. coli***

1. Descongelar el stock de cepa de *E. coli* competente de cloruro de calcio en hielo

2. Mezclar 100 µl de E. coli competente en cloruro de calcio con 10 µl de plásmido purificado o mezcla de ligación en un tubo Eppendorf de 1,5 ml e incubar en hielo durante 30 min.
3. Incubar en un baño de agua a 42 ° C durante 45 segundos y luego colocar en hielo durante 1 minuto.
4. Añadir 900 µl de medio SOC e incubar a 37 ° C a 250 rpm durante 1 h.
5. Esparcir volúmenes de 50 ul en placas LB
6. Incubar las placas a 37 ° C durante la noche y seleccionar el transformante deseado.

• **Transformación de E. coli por electroporación.**

1. Descongelar el stock de E. coli electrocompetente en hielo
2. Mezclar 100 µl de E. coli electrocompetente con 10 µl de plásmido purificado o mezcla de ligación en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y mantener en hielo durante 30 min
3. Colocar la mezcla en una cubeta de congelación de electroporación (espacio de 0,2 cm de ancho) y realice la electroporación en BioRad GenePulser a 2500 V
4. Añadir inmediatamente 900 µl de LB helado e incube durante 1 ha 37 ° C
5. Esparcir volúmenes de 50 ul en placas LB
6. Incubar las placas a 37 ° C durante la noche y seleccionar el transformante deseado.

Anexo F. Información suplementaria del Capítulo 1: Colección de fito-patógenos fúngicos y Streptomyces. Ensayos de actividad anti-fúngica

i. Fitopatógenos / Secuencias de concenso ITS

Tabla 24: Fitopatógenos / Secuencias de concenso ITS

Internal code	Consensus region
2	CTC CGT AGG GTG AAC CTG CGG AGG GAT CAT TAC ACA AAT ATG AAG GCG GGC TGG AACCTC TCG GGG TTA CAG CCC TTG CTG AAT TAT TCA CCC TTG TCT TTT GCG TAC TTC TTG TTTCTT TGG TGG GTT CGC CCA CCA CTA GGA CAA ACA TAA ACC TTT TGT AAT TGC AAT CAG CGTCAG TAA CAA ATT AAT AAT TAC AAC TTT CAA CAA CGG ATC TCT TGG TTC TGG CAT CGA TGAAGA ACG CAG CGA AAT GCG ATA AGT AGT GTG AAT TGC AGA ATT CAG TGA ATC ATC GAA TCTTTG AAC GCA CAT TGC GCC CTT TGG TAT TCC AAA GGG CAT GCC TGT TCG AGC GTC ATT TGTACC CTC AAG CTT TGC TTG GTG TTG GGC GTC TTG TCT CTA GCT TTG CTG GAG ACT CGCCTT AAA GTA ATT GGC AGC CGG CCT ACT GGT TTC GGA GCG CAG CAC AAG TCG CAC TCT CTATCA GCA AAG GTC TAG CAT CCA TTA AGC CTT TTT TTC AAC TTT TGA CCT CGG ATC AGG TAGGGA TAC CCG CTG AAC TTA AGC ATA TCA ATA AGC GGA GGAA
13	CCT GCG GAA GGA TCA TTA CCG AGT GAG GGC CCT CTG GGT CCA ACC TCC CAC CCG TGTTTA TTT TAC CTT GTT GCT TCG GCG GGC CCG CCT TAA CTG GCC GCC GGG GGG CTT ACGCCC CCG GGC CCG CGC CCG CCG AAG ACA CCC TCG AAC TCT GTC TGA AGA TTG TAG TCTGAG TGA AAA TAT AAA TTA TTT AAA ACT TTC AAC AAC GGA TCT CTT GGT TCC GGC ATC GATGAA GAA CGC AGC GAA ATG CGA TAC GTA ATG TGA

ATT GCA AAT TCA GTG AAT CAT CGA GTCTTT GAA CGC ACA TTG CGC CCC CTG GTA TTC CGG GGG GCA
TGC CTG TCC GAG CGT CATTTC TGC CCT CAA GCA CGG CTT GTG TGT TGG GCC CCG TCC TCC GAT CCC
GGG GGA CGGGCC CGA AAG GCA GCG GCG CGT CCG GTC CTC GAG CGT ATG GGG CTT TGT
CACCCG CTC TGT AGG CCC GGC CGG CGC TTG CCG ATC AAC CCA AAT TTT TAT CCA GGT TGA CCTCGG
ATC AGG TAG GGA TAC CCG CTG AAC TTA AGC ATA T

14 GAA GGA TCA TTA CCG AGT GAG GGC CCT CTG GGT CCA ACC TCC CAC CCG TGT TTA TTT TACCTT GTT
GCT TCG GCG GGC CCG CCT TAA CTG GCC GCC GGG GGG CTT ACG CCC CCG GGCCCG CGC CCG CCG AAG
ACA CCC TCG AAC TCT GTC TGA AGA TTG TAG TCT GAG TGA AAA TATAAA TTA TTT AAA ACT TTC AAC
AAC GGA TCT CTT GGT TCC GGC ATC GAT GAA GAA CGC AGCGAA ATG CGA TAC GTA ATG TGA ATT GCA
AAT TCA GTG AAT CAT CGA GTC TTT GAA CGC ACATTG CGC CCC CTG GTA TTC CGG GGG GCA TGC CTG
TCC GAG CGT CAT TTC TGC CCT CAAGCA CGG CTT GTG TGT TGG GCC CCG TCC TCC GAT CCC GGG GGA
CGG GCC CGA AAG GCAGCG GCG GCA CCG CGT CCG GTC CTC GAG CGT ATG GGG CTT TGT CAC CCG CTC
TGT AGGCC GGC CGG CGC TTG CCG ATC AAC CCA AAT TTT TAT CCA GGT TGA CCT CGG ATC AGG
TAGGGA TAC CCG CTG AAC TTA AGC ATA

16 GAA GGA TCA TTA CCG AGT GAG GGC CCT CTG GGT CCA ACC TCC CAC CCG TGT TTA TTT TACCTT GTT
GCT TCG GCG GGC CCG CCT TAA CTG GCC GCC GGG GGG CTT ACG CCC CCG GGCCCG CGC CCG CCG AAG
ACA CCC TCG AAC TCT GTC TGA AGA TTG TAG TCT GAG TGA AAA TATAAA TTA TTT AAA ACT TTC AAC
AAC GGA TCT CTT GGT TCC GGC ATC GAT GAA GAA CGC AGCGAA ATG CGA TAC GTA ATG TGA ATT GCA
AAT TCA GTG AAT CAT CGA GTC TTT GAA CGC ACATTG CGC CCC CTG GTA TTC CGG GGG GCA TGC CTG
TCC GAG CGT CAT TGC TGC CCT CAAGCA CGG CTT GTG TGT TGG GCC CCG TCC GAT CCC GGG GGA
CGG GCC CGA AAG GCAGCG GCG GCA CCG CGT CCG GTC CTC GAG CGT ATG GGG CTT TGT CAC CCG CTC
TGT AGGCC GGC CGG CGC TTG CCG ATC AAC CCA AAT TTT TAT CCA GGT TGA CCT CGG ATC AGG
TAGGGA TAC CCG CTG AAC TTA AGC ATA TCA

31 GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TTA CCG AGT GCG GGT CCT TTG GGC CCA ACC TCC CATCCG TGT CTA
TTG TAC CCT GTT GCT TCG GCG GGC CCG CCG CTT GTC GGC CGC CGG GGGGGC GCC TCT GCC CCC CGG
GCC CGT GCC CGC CGG AGA CCC CAA CAC GAA CAC TGT CTGAAA GCG TGC AGT CTG AGT TGA TTG AAT
GCA ATC AGT TAA AAC TTT CAA CAA TGG ATC TCTTGG TTC CGG CAT CGA TGA AGA ACG CAG CGA AAT
GCG ATA ACT AAT GTG AAT TGC AGA ATTCAG TGA ATC ATC GAG TCT TTG AAC GCA CAT TGC GCC CCC
TGG TAT TCC GGG GGG CAT GCCTGT CCG AGC GTC ATT GCT GCC CTC AAG CCC GGC TTG TGT GTT GGG
TCG CCG TCC CCCTCT CCG GGG GGA CGG GCC CGA AAG GCA GCG GCG GCA CCG CGT CCG ATC CTC GAG
CGTATG GGG CTT TGT CAC ATG CTC TGT AGG ATT GGC CGG CGC CTG CCG ACG TTT TCC AAC CATTCT
TTC CAG GTT GAC CTC GGA TCA GGT AGG GAT ACC CGC TGA ACT TAA GCA TAT CAA T

35 GAA GGA TCA TTA CTG AGT GAG GGC CCT CTG GGT CCA ACC TCC CAC CCG TGT TTA TTT ACCTTG TTG
CTT CGG CGG GCC CGC CTT AAC TGG CCG CCG GGG GGC TTA CGC CCC CGG GCCCGC GCC CGC CGA AGA
CAC CCT CGA ACT CTG TCT GAA GAT TGT AGT CTG AGT GAA AAT ATAAAT TAT TTA AAA CTT TCA ACA
ACG GAT CTC TTG GTT CCG GCA TCG ATG AAG AAC GCA GCGAAA TGC GAT ACG TAA TGT GAA TTG CAA
ATT CAG TGA ATC ATC GAG TCT TTG AAC GCA CATTGC GCC CCC TGG TAT TCC GGG GGG CAT GCC TGT
CCG AGC GTC ATT GCT GCC CTC AAG CACGGC TTG TGT GTT GGG CCC CGT CCT CCG ATT CCG GGG GAC
GGG CCC GAA AGG CAG CCGCGG CAC CGC GTC CGG TCC TCG AGC GTA TGG GGC TTT GTC ACC CGC TCT
GTA GGC CCGGCC GGC GCT TGC CGA TCA ACC CAA ATT TTT ATC CAG GTT GAC CTC GGA TCA GGT
AGGGAT ACC CGC TGA ACT TAA GCA TAT

CC4A TTC CGT AGG TGA ACC TGC GGA AGG ATC ATT ACC GAG TGA GGG CCC TCT GGG TCC AACCTC CCA CCC
GTG TTT ATT TTA CCT TGT TGC TTC GGC GGG CCC GCC TTA ACT GGC CGC CCGGGG GCT TAC GCC CCC
GGG CCC GCG CCC GCC GAA GAC ACC CTC GAA CTC TGT CTG AAGATT GTA GTC TGA GTG AAA ATA TAA
ATT ATT TAA AAC TTT CAA CAA CGG ATC TCT TGG TTCCGG CAT CGA TGA AGA ACG CAG CGA AAT GCG
ATA CGT AAT GTG AAT TGC AAA TTC AGT GAATCA TCG AGT CTT TGA ACG CAC ATT GCG CCC CCT GGT
ATT CCG GGG GGC ATG CCT GTCCGA GCG TCA TTT CTG CCC TCA AGC ACG GCT TGT GTG TTG GGC CCC
GTC CTC CGA TCCCGG GGG ACG GGC CCG AAA GGC AGC GGC GGC ACC GCG TCC GGT CCT CGA GCG TAT
GGGGCT TTG TCA CCC GCT CTG TAG GCC CGG CCG GCG CTT GCC GAT CAA CCC AAA TTT TTA TCCAGG
TTG ACC TCG GAT CAG GTA GGG ATA CCC GCT GAA CTT AAG CAT ATC AA

CC17A CCT TCC GTA GGG GAA CCT GCG GAA GGA TCA TTA CTG AGT GAG GGC CCT CTG GGT CCAACC TCC CAC
CCG TGT TTA TTG TAC CTT GTT GCT TCG GTG CGC CCG CCT CAC GGC CGC CCGGGG GCT TCT GCC CCC
GGG TCC GCG CGC ACC GGA GAC ACT AIT GAA CTC TGT CTG AAGATT GCA GTC TGA GCA TAA ACT AAA
TAA GTT AAA ACT TTC AAC AAC GGA TCT CTT GGT TCCGGC ATC GAT GAA GAA CGC AGC GAA ATG CGA
TAA CTA ATG TGA ATT GCA GAA TTC AGT GAATCA TCG AGT CTT TGA ACG CAC ATT GCG CCC CCT GGT
ATT CCG GGG GGC ATG CCT GTCCGA GCG TCA TTG CTG CCC TCA AGC ACG GCT TGT GTG TTG GGC TCC
GTC CCC CCG GGGACG GGT CCG AAA GGC AGC GGC GGC ACC GAG TCC GGT CCT CGA GCG TAT GGG GCT
TTGTCA CCC GCT CTG TAG GCC CGG CCG GCT CCA GCC GAC AAC CAA TCA TCC TTT TTT CAG GTTGAC
CTC GGA TCA GGT AGG GAT ACC CGC TGA ACT TAA GCA TAT CAA TAA GCC GGA GGA

CC18G ACC TGC GGA AGG ATC ATT ACC GAG TGC GGG CTG CCT CCG GGC GCC CAA CCT CCC ACCCGT GAC TAC
CTA ACA CTG TTG CTT CGG CGG GGA GCC CTC TCG GGG GCG AGC CGC CCGGGA CTA CTG AAC TTC ATG
CCT GAG AGT GAT GCA GTC TGA GTC TGA ATA TAA AAT CAG TCAAAA CTT TCA ACA ATG GAT CTC TTG
GTT CCG GCA TCG ATG AAG AAC GCA GCG AAC TGC GATAAG TAA TGT GAA TTG CAG AAT TCA GTG AAT
CAT CGA GTC TTT GAA CGC ACA TTG CGC CCCCTG GCA TTC CGG GGG GCA TGC CTG TCC GAG CGT CAT
TGC TGC CCA TCA AGC CCG GCTTGT GTG TTG GGT CGT CGT CCC CCC CGG GGG ACG GGC CCG AAA GGC
AGC GGC GGC ACCGTG TCC GGT CCT CGA GCG TAT GGG GCT TTG TCA CCC GCT CGA TTA GGG CCG GCC

GGGCGC CAG CCG ACG TCT CCA ACC ATT TTT TTC AGG TTG ACC TCG GAT CAG GTA GGG ATA CCCGCT
GAA CTT AAG CAT ATC AAT AAA GCG GAG

BOT TCC GTA GGG TGA ACC TGC GGA AGG ATC ATT ACA GAG TTC ATG CCC GAA AGG GTA GAC CTCCCA CCC
TTG TGT ATT ATT ACT TTG TTG CTT TGG CGA GCT GCC TTC GGG CCT TGT ATG CTCGCC AGA GAA TAC
CAA AAC TCT TTT TAT TAA TGT CGT CTG AGT ACT ATA TAA TAG TTA AAACCTT TCA ACA ACG GAT CTC TTG
GTT CTG GCA TCG ATG AAG AAC GCA GCG AAA TGC GAT AAGTAA TGT GAA TTG CAG AAT TCA GTG AAT
CAT CGA ATC TTT GAA CGC ACA TTG CGC CCC TTGGTA TTC CGG GGG GCA TGC CTG TTC GAG CGT CAT
TTC AAC CCT CAA GCT TAG CTT GGT ATTGAG TCT ATG TCA GTA ATG GCA GGC TCT AAA ATC AGT GGC
GGC GCC GCT GGG TCC TGAACG TAG TAA TAT CTC TCG TTA CAG GTT CTC GGT GTG CTT CTG CCA AAA
CCC AAA TTT TTCTAT GGT TGA CCT CGG ATC AGG TAG GGA TAC CCG CTG AAC TTA AGC ATA TCA ATA AG

FUS ACT GCG GAG GGA TCA TTA CCG AGT TTA CAA CTC CCA AAC CCC TGT GAA CAT ACC ACT TGTTGC CTC
GGC GGA TCA GCC CGC TCC CGG TAA AAC GGG ACG GCC CGC CAG AGG ACC CCTAAA CTC TGT TTC TAT
ATG TAA CTT CTG AGT AAA ACC ATA AAT AAA TCA AAA CTT TCA ACAACG GAT CTC TTG GTT CTG GCA
TCG ATG AAG AAC GCA GCA AAA TGC GAT AAG TAA TGTGAA TTG CAG AAT TCA GTG AAT CAT CGA ATC
TTT GAA CGC ACA TTG CGC CCG CCA GTA TTCTGG CGG GCA TGC CTG TTC GAG CGT CAT TTC AAC CCT
CAA GCA CAG CTT GGT GTT GGGACT CGC GTT AAT TCG CGT TCC CCA AAT TGA TTG GCG GTC ACG TCG
AGC TTC CAT AGC GTAGTA GTA AAA CCC TCG TTA CTG GTA ATC GTC GCG GCC ACG CCG TTA AAC CCC
AAC TTC TGAATG TTG ACC TCG GAT CAG GTA GGA ATA CCC GCT GAA CTT AAG CAT ATC AAT AAG CCG
GGAGGAA

ii. PCR y secuenciación Botrytis CER

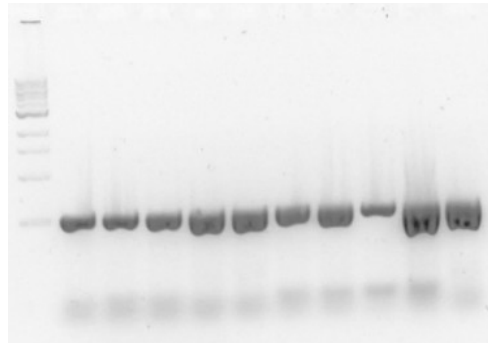


Figura 43: Electroforesis PCR ITS CER

COL 1: Ladder 1kb plus. COL2-11: Botrytis sp. 1 - 10

iii. Screening inicial de actividad antifúngica

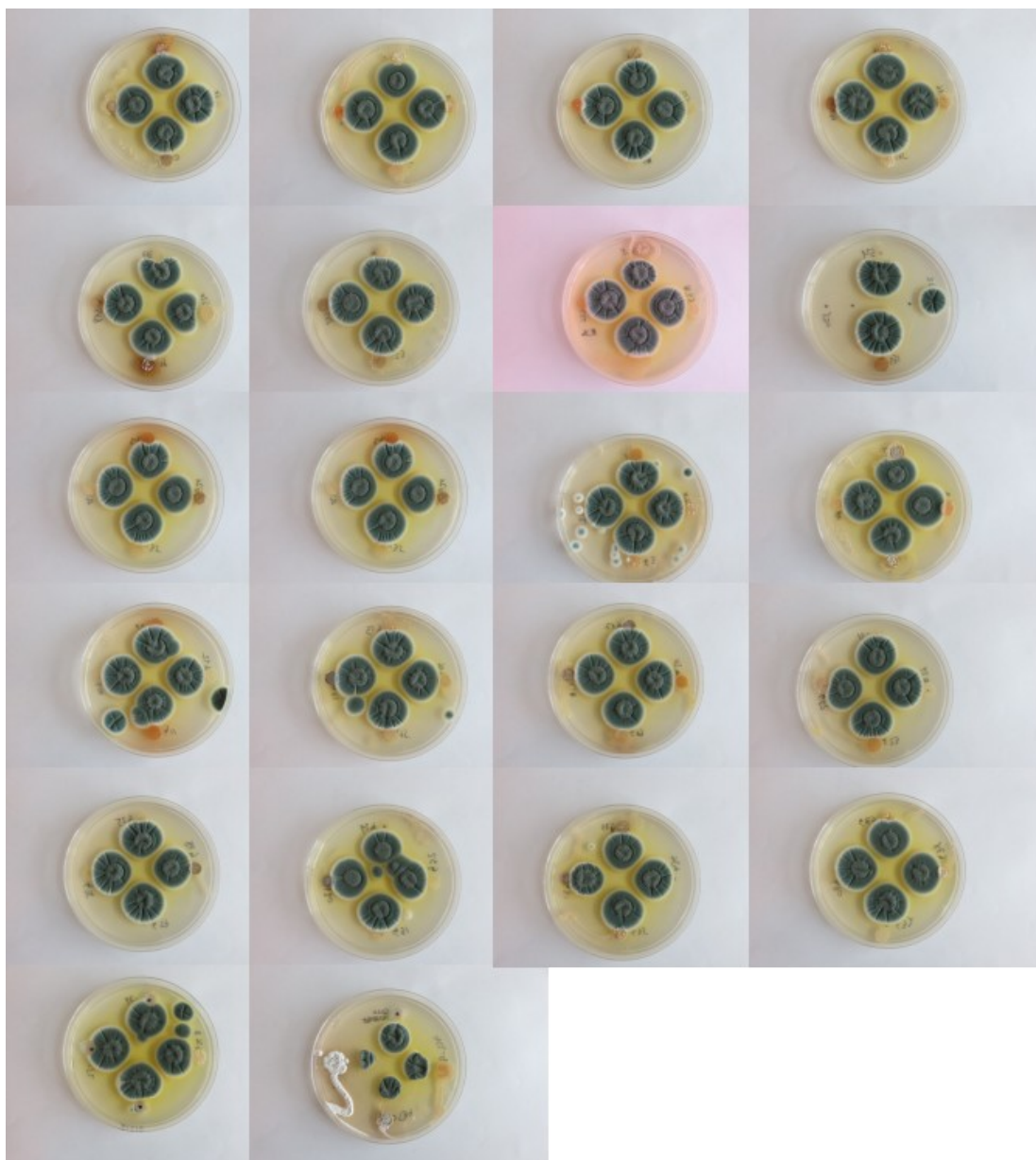


Figura 44: Screening aislados colección *Streptomyces* frente a *Penicillium rubens*

Placas ISP2 tras 10 días de incubación. De izquierda a derecha y de arriba a abajo en sentido dextrógiro comenzando en la colonia superior: S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 | S21 | S22 | S23 | S24 | S25 | S26 | S27 | S28 | S29 | S30 | S31 | S32 | S33 | S34 | S35 | S36 | S37 | S38 | S39 | S40 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | G7 | G8 | G9 | G10 | G11 | G12 | G13 | G14 | G15 | G16 | G17 | G18 | G19 | G20 | G21 | G22 | G23 | G24 | G25 | G26 | G27 | G28 | G29 | G30 | G31 | G32 | G33 | G34 | G35 | G36 | G37 | G38 | G39 | G40 | C34 | M1152 (C-) | vacío | S26B | Cyclohexamida | NRRL-B1714 | NRRL-B5314 | NRRL-B2371.

iv. Árboles filogenéticos

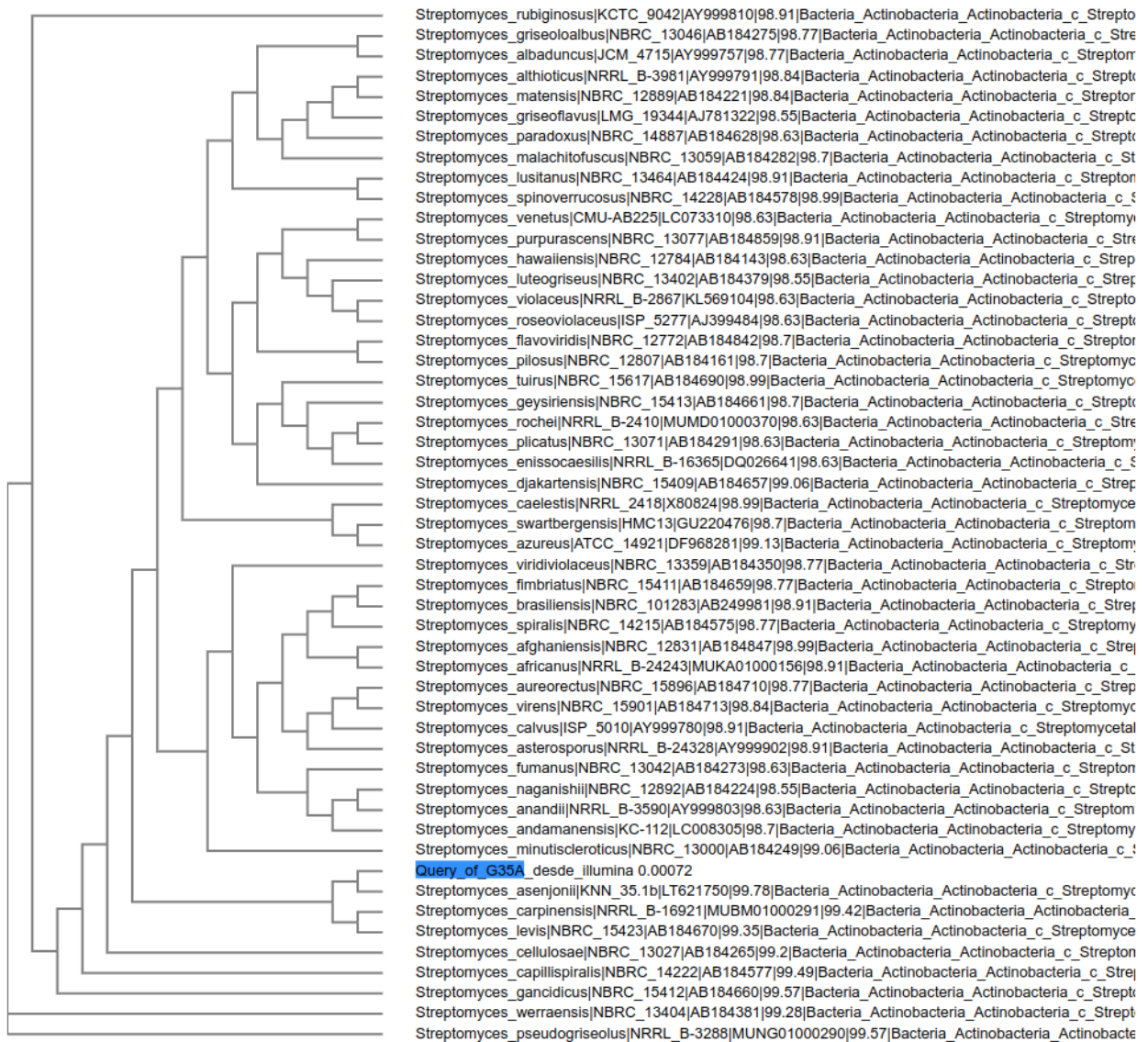


Figura 45: Árbol neighbour-joining sin corrección de distancias para 16S de G35A

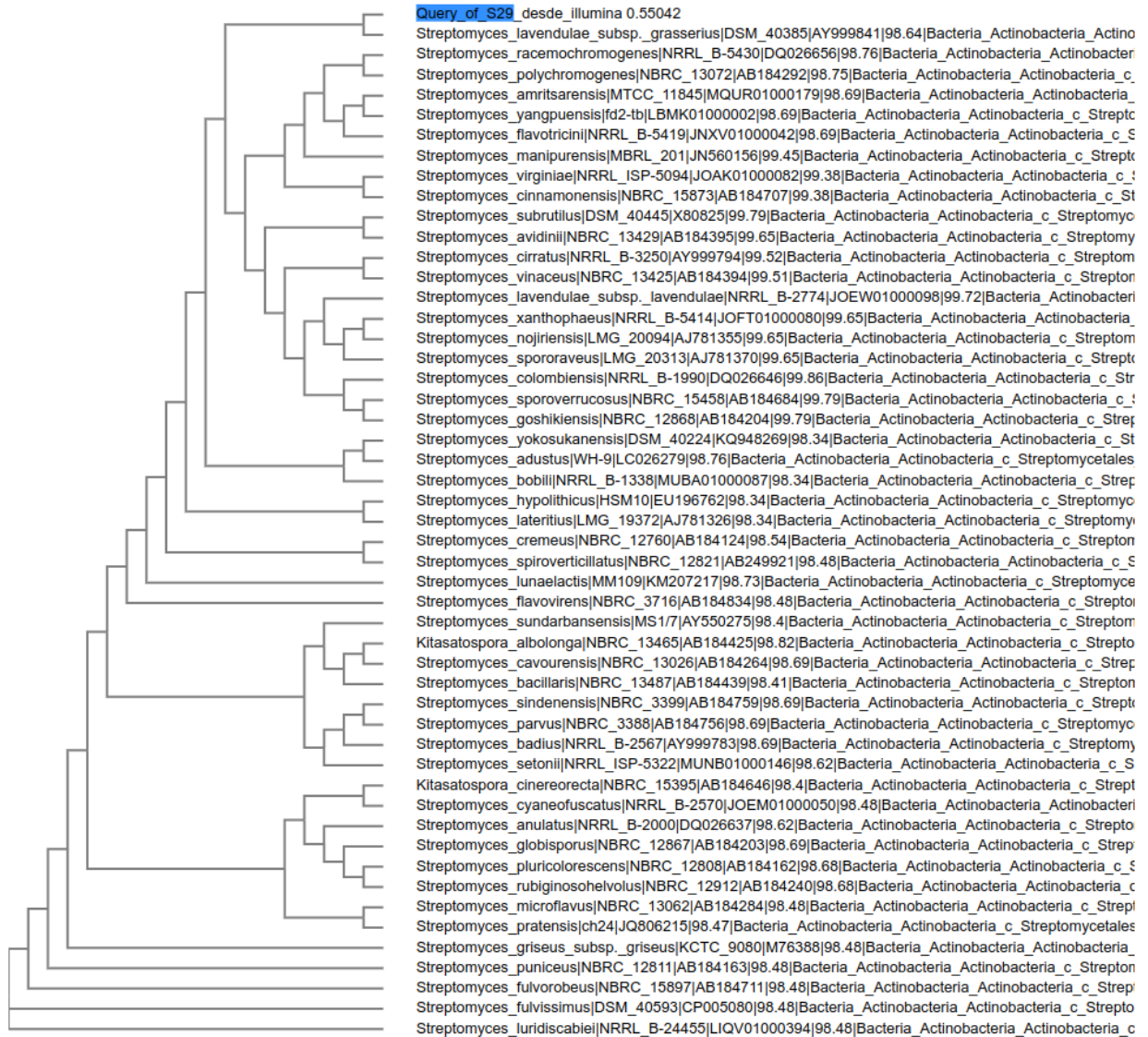


Figura 46: Árbol neighbour-joining sin corrección de distancias para 16S de S29

Anexo G. Información suplementaria del Capítulo 2: Identificación de clústers biosintéticos

i. Output Nanopore

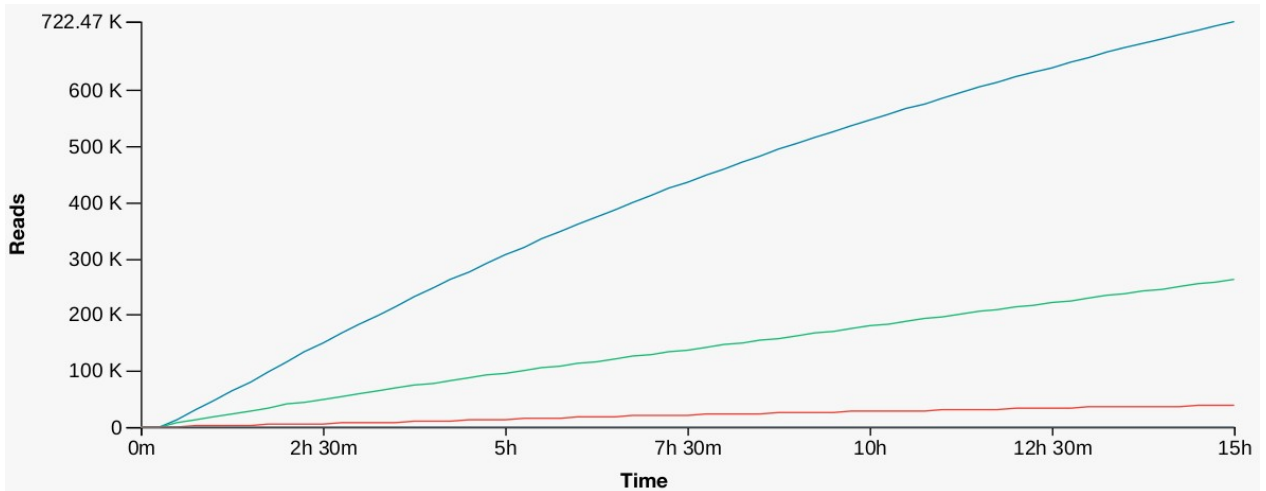


Figura 47: Output acumulativo secuenciación por Nanopore cepe G35A / Secuenciación 1

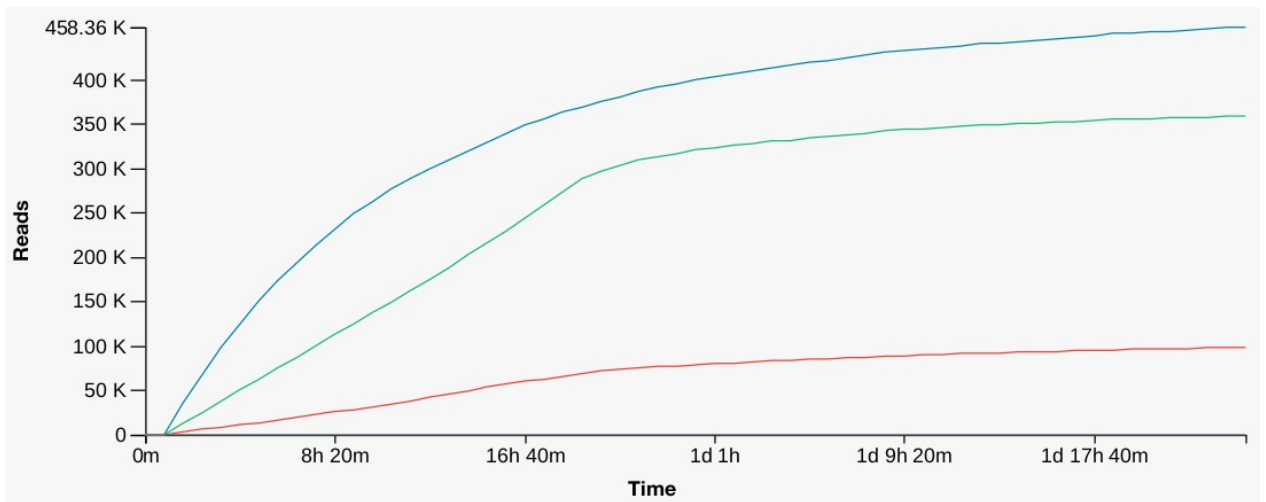


Figura 48: Output acumulativo secuenciación por Nanopore cepe G35A / Secuenciación 2

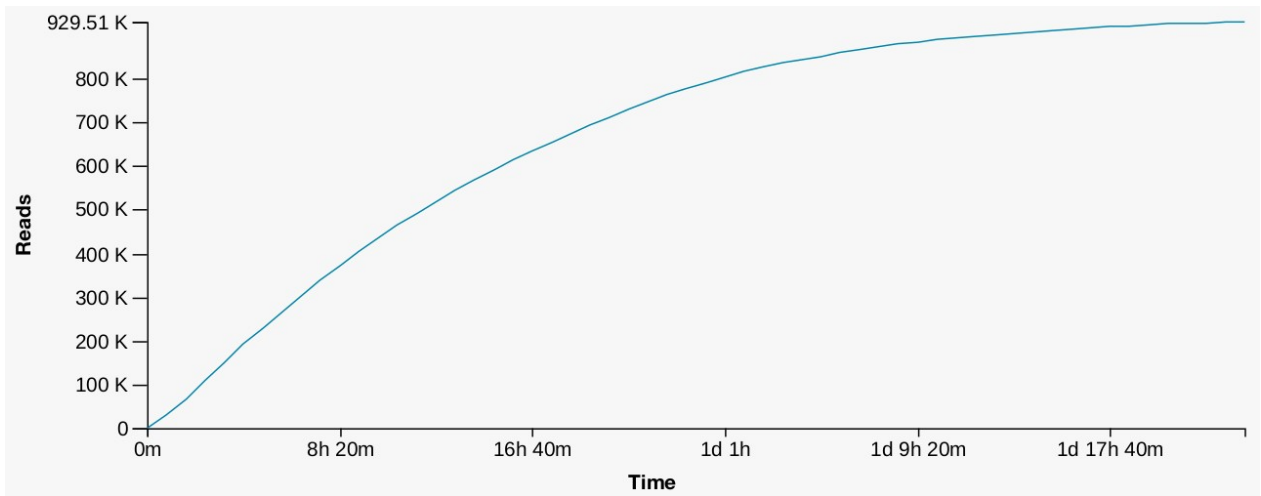
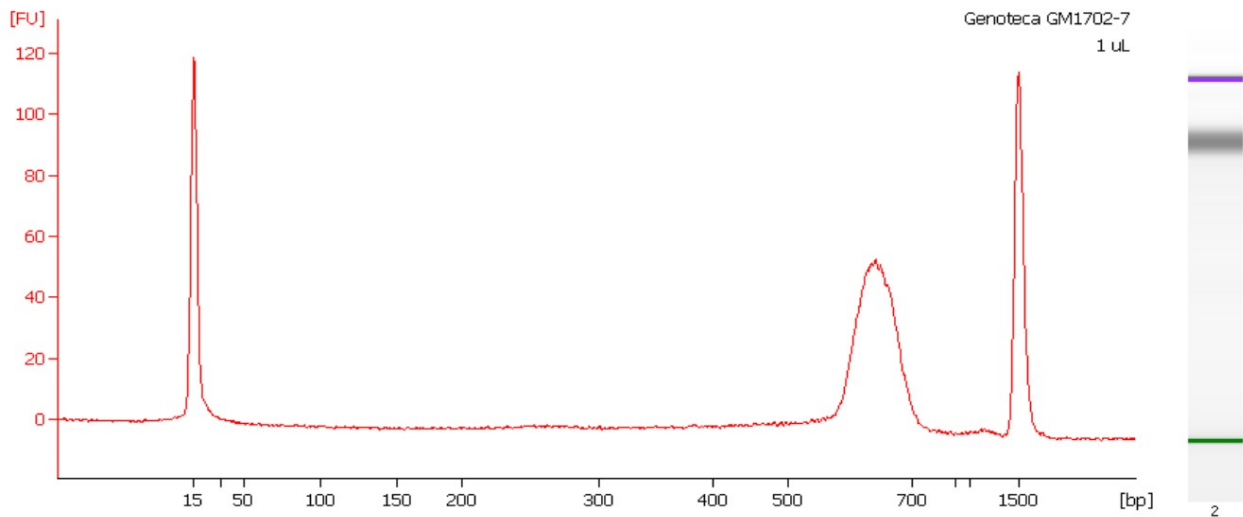


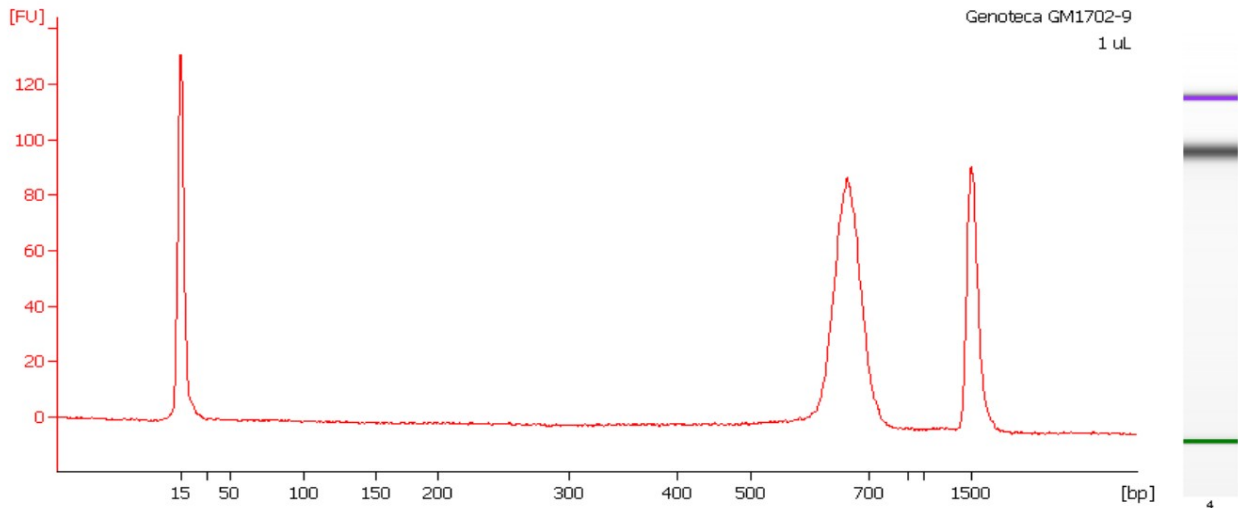
Figura 49: Output acumulativo secuenciación por Nanopore cept S29

ii. Secuenciación Illumina

G35A



Integridad del DNA de las genoteca GM1702-7analizada mediante Bioanalyzer. Tamaño promedio de la genoteca: 642 bp



Integridad del DNA de las genoteca GM1702-9 analizada mediante Bioanalyzer . Tamaño promedio de la genoteca: 663 bp.

iii. Resultados Antismash *Streptomyces* sp. G35A

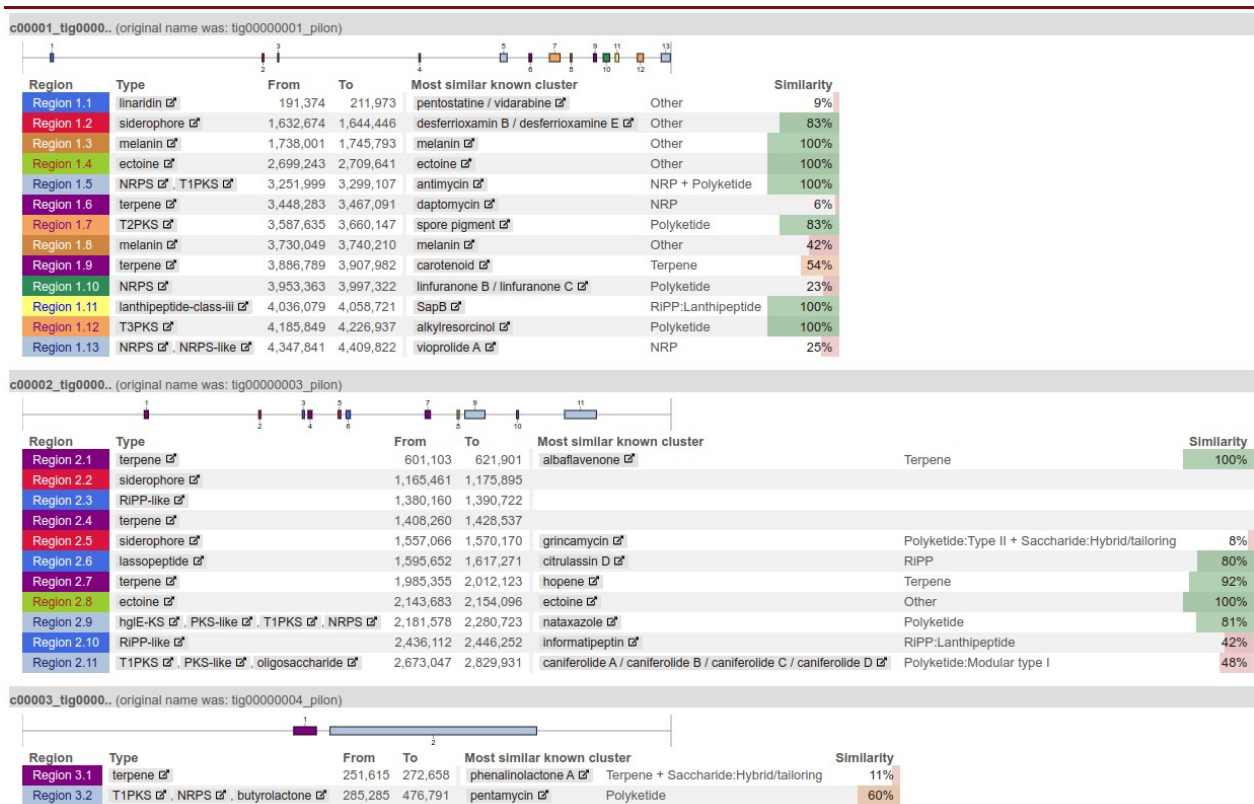


Figura 50: Resultados Antismash *Streptomyces* sp. G35A

iv. Resultados Antismash *Streptomyces* sp. S29

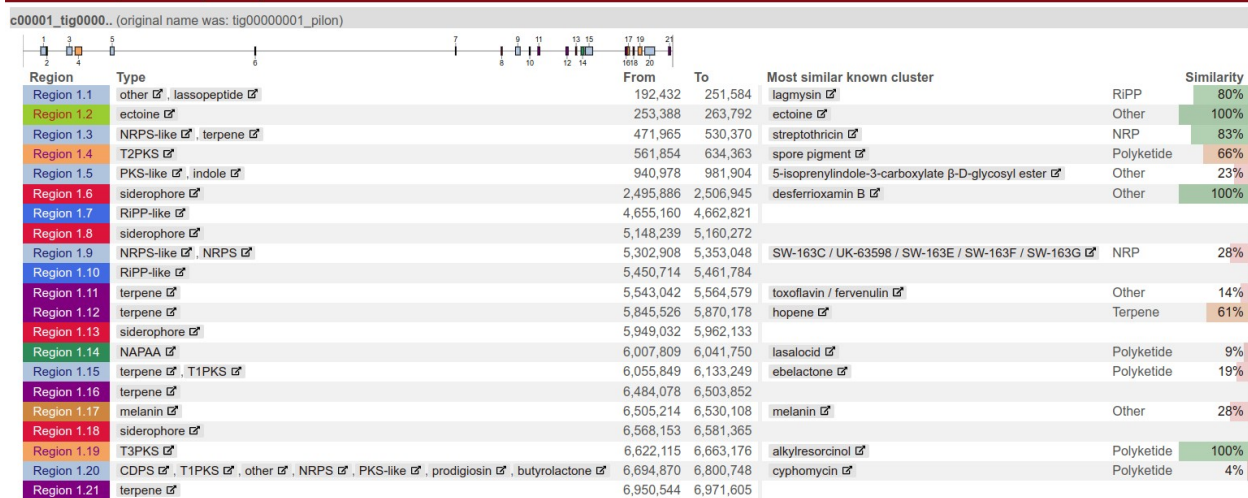


Figura 51: Resultados Antismash *Streptomyces* sp. S29

v. Mapa plasmidio pCRISPomyces-2-ko-acylt-S29

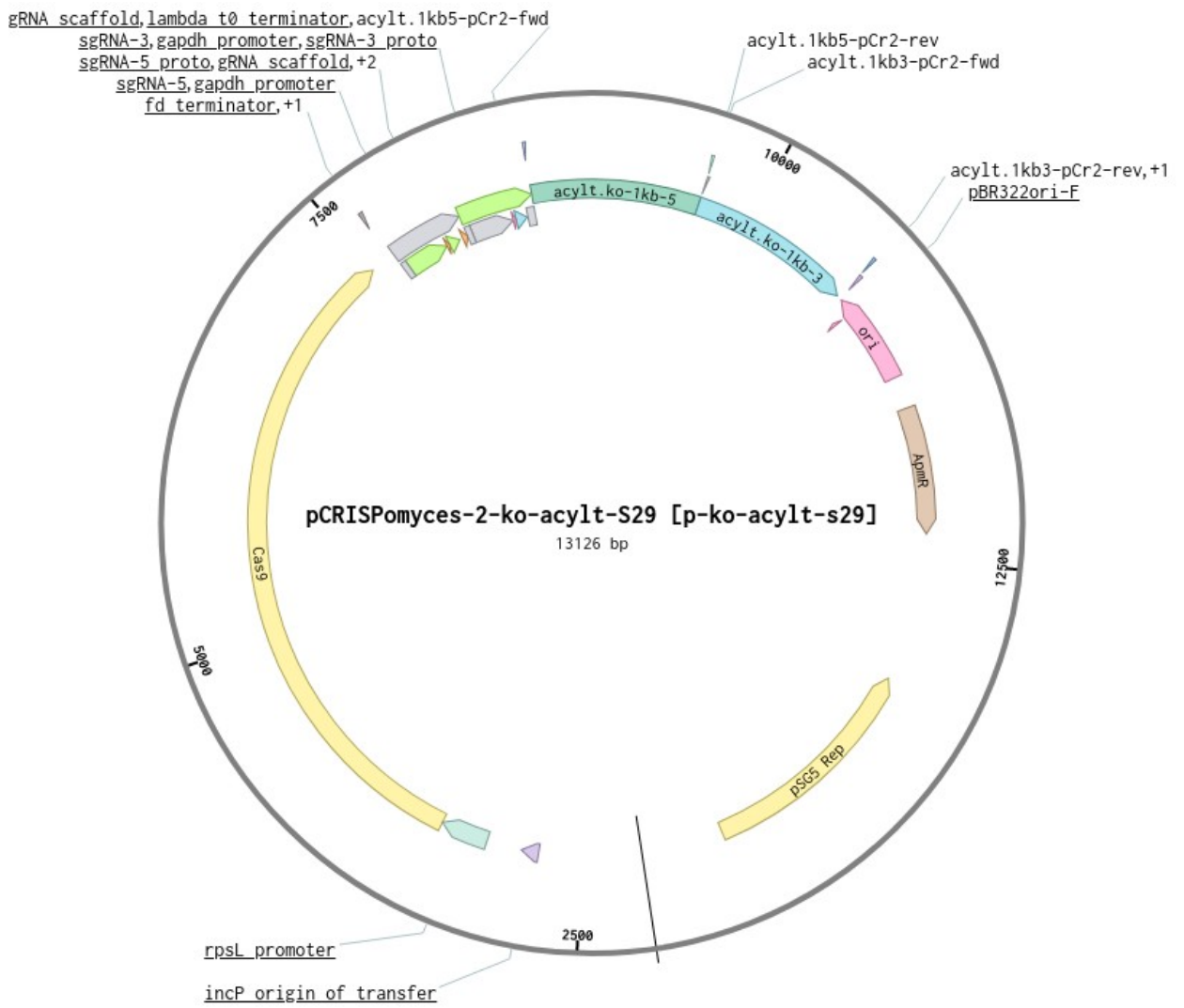


Figura 52: Mapa plasmidio pCRISPomyces-2-ko-acylt-S29