

# 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 consenso 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