



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Modelamiento matemático del silenciamiento de los genes Velvet, SIX1, ERG11 y SGE1 de *Fusarium oxysporum* f. sp.  *cubense* raza tropical 4, con ARNs de interferencia generados mediante ARNs de doble cadena sintéticos**

Torres Moreira, Natalia Elizabeth

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

PhD. Flores Flor, Francisco Javier

5 de agosto del 2022



NataliaTorres Tesis ESPE.txt

Scanned on: 18:19 August 6, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	21
Words with Minor Changes	33
Paraphrased Words	38
Omitted Words	0



FRANCISCO  
JAVIER FLORES  
FLOR



Website | Education | Businesses



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: **“Modelamiento matemático del silenciamiento de los genes Velvet, SIX1, ERG11 y SGE1 de *Fusarium oxysporum* f. sp.  *cubense* raza tropical 4, con ARNs de interferencia generados mediante ARNs de doble cadena sintéticos”** fue realizado por la señorita **Torres Moreira, Natalia Elizabeth**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 5 de agosto del 2022

Firma:



Firmado electrónicamente por:  
**FRANCISCO  
JAVIER FLORES  
FLOR**

.....  
**Flores Flor, Francisco Javier PhD.**

C. C. 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Torres Moreira, Natalia Elizabeth**, con cédula de ciudadanía n° 1717051450, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Modelamiento matemático del silenciamiento de los genes Velvet, SIX1, ERG11 y SGE1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4, con ARNs de interferencia generados mediante ARNs de doble cadena sintéticos”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 5 de agosto del 2022

Firma:

**Torres Moreira, Natalia Elizabeth**

C.C.: 1717051450



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo **Torres Moreira, Natalia Elizabeth**, con cédula de ciudadanía n° 1717051450, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Modelamiento matemático del silenciamiento de los genes Velvet, SIX1, ERG11 y SGE1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4, con ARNs de interferencia generados mediante ARNs de doble cadena sintéticos”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 5 de agosto del 2022**

Firma:

**Torres Moreira, Natalia Elizabeth**

C.C.: 1717051450

### **Dedicatoria**

A mi padre Luis, por escucharme atentamente y darme sus opiniones cada vez que me tropezaba en el camino. Por su apoyo constante en el transcurso de toda mi vida, dando todo de sí mismo para que en casa no nos falte nada y hasta dándome dulces para animarme en mis momentos más oscuros.

A mi hermosa y divina madre Zully, por ser la guía infaltable en todos los pasos de mi crecimiento, con sus consejos y reprimendas que me han formado cada vez más en una mejor persona. Por todo lo que has sacrificado para estar pendiente de mis hermanos y yo, a pesar de cualquier problema.

A mis amados hermanos Caro, Vale y Luis Alejandro porque con sus peculiaridades y personalidades únicas, me han inspirado más de una vez a como seguir avanzando en mi camino para buscar la felicidad y realización como persona; a través de su perseverancia, confianza y su propia manera de ver la vida.

## Agradecimientos

A mis padres Luis y Zully, gracias por todo su apoyo y soporte en cada momento difícil de mi vida. Gracias por todo su tiempo y sacrificios que tuvieron que hacer para que pueda llegar a ser la persona que soy hoy. Por todas sus opiniones que muchas veces me han permitido ver los problemas de manera distinta y aprender de cada caída.

Agradezco a mis hermanos Caro, Vale y Luis Alejandro porque sé que puedo contar con ellos en cualquier momento, porque su compañía y amor me alegran cada día de mi vida. Gracias por todos los momentos únicos y especiales que hemos tenido como familia, los amo tal cual son.

Gracias a mis queridos amigos Sole y Negrito por estar pendientes de cómo me encuentro, ser mis confidentes, entenderme, acompañarme en cada momento difícil y animarme a seguir adelante.

Al equipo iGEM Ecuador contando a todos sus miembros pasados y actuales porque de cada uno he aprendido algo, tanto de conocimientos como a nivel emocional. Gracias por el apoyo mutuo y camaradería que viví, superamos las barreras que teníamos para poder desarrollar los proyectos. Cada uno de ustedes ha dejado una huella en mi corazón.

Agradezco a mi director de tesis Francisco Flores y a mi directora de carrera Karina Ponce por guiarme, impulsarme a seguir adelante y no rendirme en mi desarrollo profesional. Gracias por sus consejos para superarme en mi carrera, ser unas magníficas personas y velar porque cada estudiante sea apoyado y escuchado.

## Índice de Contenido

Reporte de la herramienta COPYLEAKS .....	2
Certificación del Director .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de Contenido.....	8
Índice de Tablas .....	10
Índice de Figuras .....	11
Abreviaturas.....	12
Resumen .....	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción .....	16
Formulación del problema.....	16
Justificación del problema .....	18
Objetivos .....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos .....	21
Capítulo II: Marco teórico .....	21
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza tropical 4 .....	21
Silenciamiento de ARN en hongos generado por dsRNA .....	24
Modelamiento matemático determinista de sistemas biológicos .....	26
Capítulo III: Metodología .....	28
Materiales .....	28
Procedimientos .....	29
<i>Formulación de reacciones bioquímicas del mecanismo silenciamiento de los genes Velvet, SIX1, SGE1 y ERG11</i> .....	29
<i>Desarrollo modelo matemático determinista</i> .....	30
<i>Simulación in silico de modelo matemático</i> .....	30
Capítulo IV: Resultados .....	31
Formulación de reacciones químicas.....	31

Modelamiento matemático .....	35
<i>Modelo EDO</i> .....	36
<i>Parámetros utilizados en el modelamiento matemático</i> .....	36
Simulación computacional .....	38
Capítulo V: Discusión .....	43
Capítulo VI: Conclusiones .....	46
Capítulo VII: Recomendaciones .....	47
Capítulo VIII: Referencias .....	48

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Parámetros generales del mecanismo ARNi</i> .....	37
<b>Tabla 2</b> <i>Parámetros específicos de los genes Velvet, SIX1, SGE1 y ERG11</i> .....	37

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Esquema del mecanismo de silenciamiento “Quelling” en células fúngicas .....	32
<b>Figura 2</b> Comportamiento de las especies bioquímicas en el modelamiento del ARNi del gen Velvet .....	39
<b>Figura 3</b> <i>Comparación de modelamientos de los cuatros genes objetivo: Velvet, SIX1, SGE1 y ERG11; con relación al comportamiento del dsRNA vs. tiempo</i> .....	40
<b>Figura 4</b> <i>Comparación de modelamientos de los cuatros genes objetivo, con relación al comportamiento del siRNA vs. tiempo</i> .....	40
<b>Figura 5</b> Comparación de modelamientos de los cuatros genes objetivo, con relación al comportamiento del mRNA basura vs. tiempo .....	41
<b>Figura 6</b> <i>Relación de la expresión del mRNA del gen SIX1 frente a varias concentraciones de dsRNA (Relación Dosis –Respuesta)</i> .....	42
<b>Figura 7</b> <i>Relación de la dosis necesaria de dsRNA de cada gen objetivo hasta alcanzar un máximo nivel de inhibición en un tiempo definido (Relación Dosis –Respuesta)</i> .....	43

**Abreviaturas**

<b>ADN</b>	Ácido desoxi ribonucleico
<b>nt</b>	nucleótidos
<b>FOC</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>
<b>R1</b>	Raza 1
<b>RT4</b>	Raza tropical 4
<b>iGEM</b>	International Genetically Engineered Machine
<b>QSSA</b>	Aproximación quasi-estacionaria
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>dsRNA</b>	Ácido ribonucleico de doble cadena
<b>RISC</b>	Complejo de Silenciamiento Inducido por Ácido ribonucleico
<b>siRNA</b>	Ácido ribonucleico de interferencia pequeño
<b>PIB</b>	Producto Interno Bruto
<b>ARNi</b>	Ácido ribonucleico de interferencia
<b>RdRP</b>	Polimerasa de ARN dependiente de ARN
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>aRNA</b>	ARN aberrantes

**ssDNA**

ADN monocatenario

## Resumen

Entre los más importantes productos agrícolas del Ecuador encontramos al banano, alimento básico de la dieta en el país, fuente de trabajo para más de 2.2 millones de personas y causa de grandes aportaciones económicas anuales por su exportación a nivel mundial. Actualmente se ve amenazada por la enfermedad del marchitamiento por fusarium del banano, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raza tropical 4 (FOC RT4); para la cual aún no se han encontrado cultivos resistentes o algún control químico para frenar su diseminación. Por ello en 2019, se desarrolló el proyecto “AgroBactory 593: una plataforma bacteriana para producir bioplaguicidas específicos” del equipo estudiantil iGEM Ecuador, donde se diseñó un sistema de transcripción heteróloga de ARNs de doble cadena (dsRNA) con el objetivo que desencadenen el mecanismo de silenciamiento post-transcripcional por ARN de interferencia (ARNi). En el proyecto se planteó la producción de dsRNA sintético para los genes Velvet, SIX1, SGE1 y ERG11 de FOC RT4. Para comprender mejor este mecanismo de silenciamiento en hongos “*Quelling*” se realizó su modelamiento matemático determinista por medio de reacciones bioquímicas y se simuló *in silico* a través del programa MATLAB. Se logró expresar el efecto de saturación que afecta a este sistema a nivel experimental según bibliografía y se observó que las dosis de dsRNA necesarias para realizar un mismo efecto de silenciamiento, varían entre genes objetivo. En un tiempo de 5 días, para un máximo nivel de silenciamiento del 99.99% del mRNA objetivo inicial, se identificó que la dosis (1350 moléculas) de dsRNA ERG11 fue la más eficiente debido a que logró el mismo efecto que otros dsRNAs con menor concentración.

*Palabras clave:* modelamiento, ARNi, *in silico*.

**Abstract**

Among Ecuador's most important agricultural products are the banana, a staple food in the country's diet, a source of employment for more than 2.2 million people, and the cause of large annual economic contributions due to its exportation worldwide. It is currently threatened by the fusarium wilt disease of banana, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical Race 4 (FOC RT4); for which resistant crops or any chemical control to stop its spread have not yet been found. Therefore, in 2019, the project "AgroBactory 593: a bacterial platform to produce specific biopesticides" was developed by the iGEM Ecuador student team, where a heterologous transcription system of double-stranded RNAs (dsRNA) was designed to trigger the mechanism of post-transcriptional silencing by RNA interference (RNAi). The project aimed to produce synthetic dsRNA for the Velvet, SIX1, SGE1, and ERG11 genes of FOC RT4. To better understand this silencing mechanism in quelling fungi, its deterministic mathematical modeling was carried out employing biochemical reactions and simulated *in silico* using MATLAB software. It was possible to express the saturation effect that affects this system at the experimental level according to the literature and it was observed that the doses of dsRNA necessary to achieve the same silencing effect vary between target genes. In a time of 5 days, for a maximum silencing level of 99.99% of the initial target mRNA, it was identified that the dose (1350 molecules) of dsRNA ERG11 was the most efficient because it achieved the same effect as other dsRNAs with lower concentration.

*Key words:* modeling, ARNi, *in silico*.

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

Entre los cultivos más importantes a nivel mundial, se encuentra el banano. Su producción y comercio han aumentado rápidamente en los últimos años como respuesta al rápido crecimiento poblacional de países productores, el aumento de ingresos y la creciente conciencia con respecto a la nutrición en países importadores. En 2017-2019, su producción mundial media fue de 116 millones de toneladas valoradas en \$31000 millones de dólares USD (FAO, 2020).

Según FAO (2020), dentro de la industria exportadora de bananos, Ecuador ocupa el primer lugar a nivel mundial. La producción a gran escala de esta fruta comenzó a mediados del siglo XX con el auge bananero, donde se produjeron las siguientes reformas en el país: se expandió la frontera agrícola, se amplificaron las relaciones salariales, se mejoró la infraestructura vial y portuaria, crecieron vertiginosamente ciudades pequeñas costeñas y se incentivó el mercado interno (Chamba *et al.*, 2021). Desde esa época esta industria ha crecido, hasta representar cerca del 30% de los ingresos de las exportaciones agrícolas en el Ecuador en 2018 (FAO, 2020).

Aparte de las afecciones por el cambio climático, estas plantaciones de banano se encuentran en riesgo por la enfermedad del marchitamiento por *Fusarium* del banano. Las epidemias por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (FOC) han reducido considerablemente los monocultivos de variedad Gros Michel en todo el mundo y para estabilizar la industria bananera, los agricultores la sustituyeron con los bananos Cavendish, resistentes a FOC raza 1 (R1) (Ploetz, 2000) (2006). Sin embargo a inicios de los 90 apareció una cepa más virulenta, la raza tropical 4 (RT4), que es motivo de preocupación debido a su amplio

rango de hospederos, letalidad y persistencia en el suelo (Rodríguez, 2019). Además, actualmente no existe ninguna estrategia efectiva para erradicar o frenar FOC RT4; que en las plantas infectadas puede causar rápidamente la pérdida total de rendimiento (FAO, 2020) (Gurdaswani *et al.*, 2020).

En respuesta a la amenaza de esta plaga a la industria bananera ecuatoriana, dentro de la competencia de biología sintética “International Genetically Engineered Machine” (iGEM), el equipo de estudiantes de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE “Ecuador”, desarrolló el proyecto “AgroBactory 593: una plataforma bacteriana para producir bioplaguicidas específicos”. El proyecto utiliza la tecnología de ARN de interferencia (ARNi) para silenciar la expresión de objetivos específicos en el genoma del patógeno, en este caso FOC RT4 (iGEM Ecuador, 2021). ARNi es un proceso regulatorio en células eucariotas como hongos, plantas y animales, encargado del silenciamiento génico post-transcripcional como mecanismo de protección contra virus y transposones (Groenenboom *et al.*, 2005).

El bioplaguicida (producto natural derivado de organismo vivos, que controla el desarrollo de plagas) necesario para desatar el mecanismo ARNi, son moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA). El equipo Ecuador diseñó cuatro dsRNAs específicos para genes críticos de la supervivencia o capacidad de dispersión de FOC RT4 y que también se encuentren en su cepa homóloga R1, ya que para futuras pruebas *in vitro* no se puede utilizar RT4 porque está prohibido su ingreso al país como medida de prevención (iGEM Ecuador, 2021) (AGROCALIDAD, 2020).

Los cuatro genes de FOC TR4 seleccionados fueron: SIX1 (*Secreted in xylem 1*), SGE1 (*Six Gene Expression 1*), ERG11 (*cytochrome P450 lanosterol C-14 $\alpha$ -demethylase*) y Velvet. El gen SIX1 posee homólogos en algunas formas especiales de FOC, y su delección genética causa graves daños a la virulencia del hongo (Widinugraheni *et al.*, 2018). El gen SGE1 regula la expresión de

los genes SIX e influye en la producción estable de conidios (Gurdaswani *et al.*, 2020). ERG11 está vinculado en la síntesis de ergosterol (componente de la membrana celular fúngica) y la formación de conidios (Dou *et al.*, 2020). Por último, el gen Velvet juega un papel en el desarrollo de hifas conidios y producción de inductores de virulencia (Ghag *et al.*, 2014).

Como resultado del proyecto, se logró producir dsRNA sintético del gen Velvet en bacterias *Escherichia coli*, a través de ensamblajes de ADN con enzimas de restricción (iGEM Ecuador, 2021). Antes de realizar pruebas *in vitro*, para evitar la pérdida de recursos y tiempo, se requiere realizar simulaciones computacionales del proceso de ARNi y así aproximar que cantidad de producto se necesita para silenciar los genes objetivos del patógeno.

### **Justificación del problema**

Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador (2019), el sector agrícola aporta con 8% del producto interno bruto total anual (PIB) del Ecuador y se estima que en el primer semestre de 2019 representó el 29,74% del empleo total, generando más de 2.2 millones de fuentes de trabajo (The World Bank, 2021). Además que juega un rol importante al producir el 95% de los alimentos que se consumen internamente en el país, y ser una fuente significativa en la generación del intercambio de divisas mediante la exportación de productos; donde aportaron ingresos al país de 20.23 millones de dólares en 2020 (INEC, 2021) (BCE, 2021).

Entre los principales productos del sector agrícola está el banano, uno de los alimentos básicos de la dieta de la población ecuatoriana, especialmente de la región costa y oriente. Ecuador ocupa el primer lugar como exportador de esta fruta a nivel mundial, con una producción de 6.023.390 toneladas e involucrando una participación agropecuaria del 46.70% (SIPA, 2021). FEDEXPOR (2022) declaró en su reporte anual, al banano como el segundo producto más exportado del país, con \$3.485 millones USD; siendo su principal destino la Unión Europea.

Las plagas y enfermedades en plantas son uno de los principales peligros para la agricultura, se estima que causan daños aproximadamente del 40 a 48% de la producción mundial de alimentos (Suquilanda Valdivieso, 2017). Entre los principales fitopatógenos están las bacterias y hongos, promotores del deterioro anómalo de frutas, hojas, tallos y productos subterráneos (Juárez *et al.*, 2010). Según Rivera (2008), en países desarrollados las pérdidas por enfermedades fúngicas se estiman en un 5-25% y en países en desarrollo 20-50%.

Entre los hongos que afectan el banano, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ocasiona una de las enfermedades más perjudiciales en la familia Musaceae, provocando pérdidas millonarias en las plantaciones de banano (Cheng *et al.*, 2019). A fines del siglo XIX, FOC R1 arrasó con las plantaciones de banano de la variedad Gros Michel y en Ecuador fueron afectadas más de 170 mil hectáreas (Saltos, 2019). Para estabilizar la industria estas plantaciones fueron reemplazadas por la variedad Cavendish, resistente a FOC R1. Posteriormente apareció una cepa más resistente a los antifúngicos, con mayor capacidad de diseminación y que puede afectar a más de 70 tipos de musáceas; incluyendo los bananos resistentes a R1 y raza 2; FOC RT4 (Gurdaswani *et al.*, 2020).

Según FAO (2020) se ha diseminado oficialmente en 17 países, principalmente en Asia meridional y sudoriental. En agosto 2019 fue detectado por primera vez en la mayor región exportadora, América Latina, en el sector nororiental de La Guajira (Colombia); mientras que en abril de 2021, Perú confirmó la infestación en una parcela del distrito de Querecotillo, en Piura (SENASA, 2021); ambos países fronterizos con Ecuador.

En años recientes, se han estudiado la aplicación de ARNi en la lucha contra fitopatógenos. Este es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional de eucariotas altamente específico, que nos permitiría controlar el desarrollo de dichos microorganismos inhibiendo genes esenciales encargados de su crecimiento o infección en

plantas (Ghag *et al.*, 2014). Se ha convertido en una poderosa herramienta para comprender la función de los genes, también es utilizado ampliamente como una nueva "parte biológica" para diseñar circuitos biológicos sintéticos en biología sintética. Y tiene el potencial de convertirse en una importante herramienta terapéutica basada en la genética para las infecciones virales, el cáncer o los trastornos genéticos hereditarios (Cuccato *et al.*, 2011).

Frente a otros métodos o técnicas contra el desarrollo de hongos como: los fungicidas químicos, que son nocivos para la salud humana y ambiental; tratamientos térmicos, que pueden dañar o madurar el fruto por calor; aceites esenciales, que podrían afectar las propiedades organolépticas de los productos (Juárez *et al.*, 2010); aplicar dsRNA para activar la ruta dentro del mismo patógeno para controlarlo tiene sus beneficios. Es altamente específico para el gen objetivo, es decir que no afectaría a organismos beneficiosos, al ser humano o a la planta misma; su diseño se puede adaptar a cualquier eucariota patógeno, siendo versátil; y si es producida sintéticamente en bacterias, se reduce su costo y tiempo de producción considerablemente (iGEM Ecuador, 2021).

En la actualidad durante el diseño de proyectos con potencial industrial, para evitar pérdida de tiempo y recursos, se desarrollan simulaciones computacionales de los procesos; como una forma de aproximar la cantidad de materiales y productos necesarios para que cumplan su función objetivo. Para optimizar los bienes en la aplicación de dsRNA como bioplaguicida, es preferible modelar el proceso matemáticamente para aproximar la cantidad mínima necesaria de producto con el cual cumpla su función de silenciamiento de genes.

En literatura hay modelos matemáticos que describen el nivel de ARNm y proteína objetivo en el proceso de silenciamiento de ARN para diferentes dosis de ARNi (ARNi pequeño) en células de mamíferos *in vitro*, y predice en gran medida el efecto de saturación observado experimentalmente en el proceso de ARNi. Sin embargo, se deberían tomar en consideración

otros procesos como: el corte de dsRNA en oligómeros de 21-23 nt (nucleótidos) dependiendo de su tamaño o la amplificación de este último por medio de la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRP); que pueden afectar la cantidad o concentración del producto durante el mecanismo (Cuccato *et al.*, 2011).

## Objetivos

### Objetivo general

Modelar matemáticamente el silenciamiento de los genes Velvet, SIX1, ERG11 y SGE1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza tropical 4, con ARNs de interferencia generados mediante ARNs de doble cadena sintéticos

### Objetivos específicos

- Formular reacciones bioquímicas que expresen el comportamiento del mecanismo de silenciamiento de los genes Velvet, SIX1, ERG11 y SGE1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza tropical 4, por ARNs de interferencia generados con ARNs de doble cadena sintéticos.
- Desarrollar un modelo matemático para el silenciamiento de los genes especificados a partir de las reacciones bioquímicas establecidas.
- Simular *in silico* la cinética de las reacciones bioquímicas formuladas con el modelo matemático.

## Capítulo II: Marco teórico

### ***Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza tropical 4**

La clasificación taxonómica de *Fusarium oxysporum*: Reino: Fungi, Subreino: Dikarya, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Clase: Sordariomycetes, Subclase:

Hypocreomycetidae, Orden: Hypocreales, Familia: Nectriaceae, Género: *Fusarium*, Especie: *F. oxysporum*.

*Fusarium oxysporum* es el hongo causante de la enfermedad del marchitamiento por *Fusarium* y posee un amplio rango de hospederos, demostrando así su gran capacidad de evolución para atravesar las barreras de más de 100 especies de plantas. En la actualidad este hongo no se subdivide por diferencias taxonómicas entre especies o variedades, sino depende del huésped que infectan. *F. oxysporum* es hemibiótrofo, quiere decir que en un principio obligatoriamente se alimenta sólo de células vivas, pero acaban matando a las células y luego medran los restos (Gallego & Sánchez, 2006); aparte de eso, es un saprófito facultativo, capaz de sobrevivir en tejido muerto durante prolongados periodos de tiempo (Rodríguez, 2019).

Entre las formas especiales encontramos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), que causa la enfermedad del marchitamiento en la familia de plantas *Musaceae*, contada entre las enfermedades más devastadoras del mundo (Velandia, 2021). Este hongo invade el sistema radicular del banano y coloniza el tejido del cormo, obstruyendo los vasos conductores de agua, lo que provoca el marchitamiento de las partes aéreas de la planta de banano infestada (Rodríguez, 2019). Fisiológicamente, dentro de FOC se encuentran las cepas (razas tropicales o RT); que no están estrictamente relacionadas a nivel genético, porque aún se desconoce una fase sexual de reproducción del hongo. Entre estas cepas, la raza 1 y la raza Tropical 4 (TR4) son las más reconocidas históricamente, además son homólogos genéticamente (Gurdaswani *et al.*, 2020).

FOC TR4 infecta los cultivos de banano incluyendo la variedad Cavendish, que es resistente a FOC TR1. TR4 es estimada como el mayor peligro para la producción mundial de banano, por la extensa cantidad de hospederos, letalidad y permanencia en el suelo de hasta 30 años por sus estructuras llamadas clamidosporas (Rodríguez, 2019) (Curry, 2022). Esta cepa se

reproduce asexualmente e infecta a la planta a través de las raíces, donde al inicio demora de 2 a 3 semanas para progresar 50 cm y cuando llega los vasos de xilema maduros puede avanzar la misma distancia en 2-3 días (Pegg *et al.*, 2019).

Debido a la falta de cultivares resistentes y estrategias de control químico ineficaces, el desarrollo de cultivares genéticamente mejorados resistentes a FOC es la única opción disponible y debe tomarse como una prioridad máxima (Smith *et al.*, 2006). En estudios anteriores se han introducido transgenes (genes de otros organismos) antifúngicos como defensinas y quitinasas, para producir plantas transgénicas de banano resistentes a *Fusarium*, pero ante la constante evolución de este fitopatógeno se podría superar estas barreras; por lo cual, se buscan tácticas para mantener una resistencia estable contra FOC (Ghag *et al.*, 2014).

Entre los genes más destacados de FOC TR4 relacionados con la virulencia y su supervivencia tenemos los siguientes: SIX1, SGE1, ERG11 y Velvet. El gen SIX1 es parte de los genes “*Secreted in xylem*” (SIX), que son los principales en codificar pequeñas proteínas secretadas en la planta, llamados efectores. Su importancia radica en que alteran la estructura fisiológica celular del huésped, modifican la respuesta defensiva de la planta y resguardan la conformación fúngica necesaria para la colonización y proliferación (Martínez-Cruz & Rueda, 2017). En el caso de SIX1, posee un papel importante en la virulencia de *F. oxysporum* (Widinugraheni *et al.*, 2018).

El gen SGE1 regula la expresión de los genes SIX, necesarios para que FOC TR4 infecte a su huésped; y se ha observado en estudios que influye en la producción estable de conidios (Gurdaswani *et al.*, 2020). En el caso de ERG11 juega un papel en la síntesis de ergosterol (componente de la membrana celular fúngica), así como en la formación de conidios (Dou *et al.*, 2020). Mientras que el gen Velvet participa en el desarrollo de hifas, la generación, germinación

de conidios y la formación de metabolitos secundarios inductores de virulencia (Ghag *et al.*, 2014).

### **Silenciamiento de ARN en hongos generado por dsRNA**

Entre los mecanismos de silenciamiento de ARN uno de los más investigados actualmente por su potencial de aplicación es el ARNi. Un regulador de genes eucariotas robusto que desencadena el silenciamiento de los transcriptos (Wilson & Doudna, 2013). En el reino fúngico se han encontrado los tres componentes centrales de este sistema: la proteína de unión a ARN, Argonaute (Ago), como componente principal del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC); ARN polimerasas dependientes de ARN (RdRP), que generan dsRNA; y la enzima Dicer, una ARNasa tipo III (Noreiga *et al.*, 2016) (Dang *et al.*, 2011).

El ARNi se ha adaptado durante la evolución fúngica, como por ejemplo en las levaduras que se perdieron las RdRP. Caso contrario, esta vía ancestral se ha mantenido en todos los hongos filamentosos investigados, y desempeña el papel de la defensa del genoma además de la regulación génica. Para analizar ARNi en hongos se ha tomado como organismo modelo a *Neurospora crassa*. Este hongo posee dos mecanismos ligados a ARNi para la defensa a infecciones virales. En la etapa vegetativa (asexual) tiene el mecanismo de silenciamiento post-transcripcional, denominado Quelling; mientras que en el ciclo sexual tiene el silenciamiento meiótico por ADN no apareado (MSUD) (Noreiga *et al.*, 2016).

Se han identificado los genes que codifican los componentes en el mecanismo Quelling: QDE-1, QDE-2, DCL-1 y DCL-2 que codifican respectivamente una RdRP, una proteína Argonaute y dos proteínas tipo Dicer; donde DCL-2 es la principal en células vegetativas (Dang *et al.*, 2011).

En los hongos, la producción de dsRNA viene a darse por la presencia de secuencias de ADN repetitivas en tándem que forman estructuras de ADN aberrantes, que son reconocidas por

QDE-3, una recQ ADN helicasa. QDE-3 despliega dsDNA para producir ADN monocatenario (ssDNA), que luego se estabiliza mediante la proteína de replicación A (RPA). QDE-1, reclutado por QDE-3 y RPA, aplica su actividad ARN polimerasas dependientes de ADN (DdRP) para producir aRNA a partir de ssDNA y luego convierte el aRNA en dsRNA a través de su actividad RdRP (Dang *et al.*, 2011).

En 2020, se estimó que la introducción de dsRNA sintético para desencadenar el sistema ARNi, como control de plagas agrícolas, depende del mecanismo endocitosis y generalmente su punto de absorción se encuentra en la punta hifal del hongo en crecimiento (Wytinck *et al.*, 2020a). En un estudio se encontró que en el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, la absorción se daba a través de endocitosis mediada por clatrina (Wytinck *et al.*, 2020b); y a pesar de que no hay investigaciones referentes, esta ruta de transporte también podría ser utilizada en *F. oxysporum* (Kanehisa Laboratories, 2021).

El proceso de “Quelling” inicia con los ARN aberrantes (aRNA) que son producidos a partir de secuencias transgénicas o ADN repetitivo. RdRP (QDE-1) identifica aRNA y sintetiza dsRNA. Dicer generalmente actúa sobre dsRNA, escindiéndolo en ARN pequeño de interferencia (siRNA) dúplex de ~25 pares de bases (Song & Rossi, 2017). Estos últimos se cargan en la proteína Ago, componente esencial de RISC, pero se mantiene inactiva su función (Carthew & Sontheimer, 2009). Para activar RISC se necesitan dos pasos: primero, Ago corta el siRNA dúplex utilizando la hebra sentido como sustrato; segundo, Ago recluta la proteína exonucleasa QIP, para reconocer la hebra pasajera y degradarla (Dang *et al.*, 2011).

Después de activarse el complejo siRNA-RISC, el mRNA objetivo se une a la hebra antisentido llamada también guía, mediante la complementariedad de bases de Watson-Crick; desencadenando la degradación del mRNA diana (Cuccato *et al.*, 2011). Posteriormente estos

trozos de aRNA, producto de la escisión, referidos como "ARN basura" se separan del complejo; liberándolo para procesar más mRNAs (Groenenboom *et al.*, 2005).

En 2001 se identificó siRNA adicional del que se obtiene a partir del dsRNA introducido y que es dependiente de las proteínas RdRP (Wilson & Doudna, 2013). Actualmente se han determinado dos rutas de amplificación: amplificación cebada y no cebada (Groenenboom *et al.*, 2005). Se ha observado que la primera vía donde el siRNA se une al ARNm para iniciar la síntesis de dsRNA, no es una función importante para la RdRP de los hongos; difiriendo de insectos y mamíferos. También se ha encontrado que QDE-1 puede sintetizar ARN de novo, con capacidad de sintetizar moléculas de dsRNA desencadenantes del mecanismo y/o producir pequeños ARN guía. Estos productos se podrían incorporar de nuevo al mecanismo de ARNi (Makeyev & Bamford, 2002).

### **Modelamiento matemático determinista de sistemas biológicos**

Los modelamientos matemáticos expresan y representan sistemas o procesos por medio de conjuntos de ecuaciones, funciones y símbolos matemáticos (Ogata, 2003). Las funciones son relaciones entre dos conjuntos, donde a cada elemento de uno corresponde a un único elemento del otro conjunto. En el caso de un conjunto de números asignados a un símbolo, se los denomina variable; las que dependen del valor de otra variable son llamadas dependientes y las que no independientes (Galindo, 2010). Se puede determinar la velocidad de cambio de las funciones, a través de sus derivadas. La ecuación diferencial ordinaria (EDO) es una igualdad que "relaciona los valores de una función y sus derivadas con una única variable independiente" (Lahoz-Beltrá, 2004), estas ecuaciones en el modelamiento dinámico nos permiten observar, analizar el comportamiento de un sistema y a través de la simulación *in silico*, es decir computacionalmente predecir la relación entre los elementos de un sistema.

Un sistema bioquímico es el “conjunto de partes similares que trabajan en armonía para cumplir alguna función fisiológica determinada”. Estos sistemas interaccionan con otros formando redes, que se organizan y realizan procesos más complejos (Muñoz *et al.*, 2019). Y se expresan o explican a través de reacciones bioquímicas, que son procesos dentro de las células de los seres vivos, donde una sustancia o varias son formadas por otra u otras sustancias (Raviolo *et al.*, 2011). Los sistemas se desarrollan de forma natural o sintética y pueden ser computacionalmente previsibles.

Para modelar procesos biológicos hay dos rutas: la representación a través de modelos estocásticos, que consideran la probabilidad de las reacciones químicas; o determinísticos, que toman en cuenta la cuantía de moléculas transformadas para cada sustancia o especie, velocidades de reacción y coeficientes estequiométricos. La cinética estudia las velocidades de las reacciones químicas y para expresarlas se utiliza comúnmente la Ley de Acción de Masa (LAM) (Picó *et al.*, 2015).

La LAM considera que la velocidad de reacción bioquímica es “proporcional al producto de las concentraciones de las especies reactantes elevadas a una potencia dada por la estequiometría de reacción” (Picó *et al.*, 2015). Las tasas de reacción son el factor de proporcionalidad y estas generalmente son determinadas a nivel experimental.

Uno de los principales procesos biológicos modelados matemáticamente es la expresión de proteínas que posee dos procesos: transcripción, donde el ADN se toma como plantilla para generar una copia mRNA, y traducción, donde a partir del mRNA maduro se generan cadenas de aminoácidos que forman proteínas (National Human Genome Research Institute, 2022). Para el modelamiento de la transcripción, se analiza si la reacción es constitutiva o inducible. Las primeras se realizan continuamente y siempre están activas en las células por su requerimiento;

y las segundas necesitan de una molécula o complejos, llamados factores de transcripción, para poder iniciar (Vignoni, 2021).

Determinar cómo se aborda un modelamiento matemático, es decir, qué consideraciones se tienen para desarrollarlo depende de la perspectiva del autor. Durante este proyecto se desarrollan modelos del mecanismo de silenciamiento de ARN, para comprender el comportamiento de las especies involucradas y predecir si los genes Velvet, SIX1, SGE1 y ERG11 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4, necesitan dosis de ARNs de doble cadena distintas para lograr el máximo nivel de inhibición de su mRNA objetivo.

### Capítulo III: Metodología

#### Materiales

Para el proceso se tuvo como base los dsRNA sintéticos diseñados por iGEM Ecuador para los cuatro genes objetivo: Velvet, SIX1, SGE1 y ERG11. Para su diseño se utilizó el programa E-RNAi y se validaron sus características fisicoquímicas (Horn & Boutros, 2010). Tomando como plantilla las secuencias codificantes de los genes escogidos, se seleccionaron parte de las secuencias considerando que el contenido de GC debe ser inferior al 50%, se evitó secuencias con repeticiones de tres o más G o C, ya que su presencia inicia estructuras secundarias intramoleculares que impiden silenciar la hibridación. Además, se confirmó que las secuencias sean compatibles para realizar ensamblajes de biología sintética con restricción-ligación utilizando las enzimas EcoRI, XbaI, SpeI y PstI (Ghag *et al.*, 2014). También se comprobó que sean altamente específicos y no posean homólogos en especies distintas al objetivo, a través del programa Blast, para evitar efectos no deseados en el ambiente donde se aplicaría como producto. Los tamaños de los dsRNA diseñados son: Velvet, 472 nt; SIX1, 486 nt; SGE1, 483 nt; y ERG11, 397 nt.

## Procedimientos

### ***Formulación de reacciones bioquímicas del mecanismo silenciamiento de los genes Velvet,***

#### ***SIX1, SGE1 y ERG11***

A través de revisión bibliográfica, se analizó el mecanismo de silenciamiento post-transcripcional en hongos; desde la presencia de dsRNA en el citoplasma del hongo hasta el reciclaje de sus componentes, posterior a la degradación del ARN mensajero del gen objetivo. Se identificaron las moléculas que reaccionan entre sí y los productos que se obtienen en cada etapa, denotando las siguientes especies: mRNA del gen objetivo o X, dsRNA del gen X, siRNA, complejo [RISC · siRNA], complejo [RISC · siRNA · mRNA] y mRNA basura. De cada reacción se distinguieron las constantes de proporcionalidad para expresar la velocidad de reacción (Vignoni, 2021). En el caso de las tasas de transcripción ( $km$ ) de cada gen objetivo, debido al poco estudio de sus valores en *F. oxysporum*, se los calculó a partir de la media de las posibles tazas mínima y máxima; con las siguientes fórmulas (Boada *et al.*, 2019):

$$km_X \min = \frac{Lm_B \times Lp_A}{CDS_{bp} \times E_{pol}} \quad (1)$$

$$km_X \max = \frac{Lm_A \times Lp_A}{CDS_{bp} \times E_{pol}} \quad (2)$$

Donde:

$Lm_B$  = Limite inferior tasa de transcripción

$Lm_A$  = Limite superior tasa de transcripción

$Lp_A$  = Limite superior tasa de traducción

$CDS_{bp}$  = Tamaño de la secuencia codificante del gen objetivo

$E_{pol}$  = Eficiencia de la polimerasa

La secuencia codificante de una proteína o también llamadas CDS, es una secuencia de ADN que se transcribe en ARNm y este último se traduce en una cadena polipeptídica específica (iGEM Foundation, 2022).

### ***Desarrollo modelo matemático determinista***

Para el desarrollo y formulación de las ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) del modelo matemático se utilizó la Ley de Acción de Masas (LAM) en cada paso del proceso. Se establece que la derivada de cada especie en función del tiempo será igual a la sumatoria de términos que expresen su comportamiento en todo el proceso. Estos términos se forman por el producto de las constantes involucradas en la reacción con las concentraciones de los reactantes y su signo depende de la localización de la especie en la reacción bioquímica, en el caso de estar como reactivo su signo será negativo y si se encuentra como producto será positivo. El conjunto de ODEs resultantes de todas las especies viene a ser el modelo matemático que expresa el proceso biológico (Vignoni, 2021).

### ***Simulación in silico de modelo matemático***

Para la simulación de la cinética de las reacciones que intervienen en el silenciamiento por ARNi se utilizó el software MATLAB. Se resolvió el sistema de ecuaciones diferenciales mediante la función `ode15`, que es un solucionador de orden variable (VSVO) basado en las fórmulas de diferenciación numérica (NDFs) (Shampine & Reichelt, 1997). Se programaron varios scripts con diferentes objetivos: en “`main.m`” (generado por OneModel de MATLAB), se almacenaron parámetros generales, condiciones iniciales, rango de tiempo y matriz de masa para Ecuaciones Algebraicas Diferenciales (DAEs) para simular el mecanismo de silenciamiento; además se realizó un script “`main_X.m`” para cada uno de los genes X objetivo, donde se guardan los parámetros específicos de cada gen objetivo, se configura la integración definida de `ode15` y se guardan los resultados obtenidos.

Para analizar detenidamente el flujo del sistema se programó un script “plots.m”, que incorpora funciones para graficar los comportamientos de cada especie bioquímica en función del tiempo, gráficas comparativas de los modelamientos por gen objetivo, de cada especie bioquímica; y para observar la interacción de dosis - respuesta, se realizaron gráficas del porcentaje de mRNA objetivo en función del tiempo, con distintas dosis (condición inicial de dsRNA). Los scripts con su programación se encontrarán en los Anexos 1.

## Capítulo IV: Resultados

### Formulación de reacciones químicas

Se consideró la producción de los genes de interés dentro del hongo FOC, expresada a través de la Ecuación 3 como un proceso de transcripción constitutiva de  $mRNA_X$ ; además se explica la degradación de  $mRNA_X$  en la Ecuación 4.

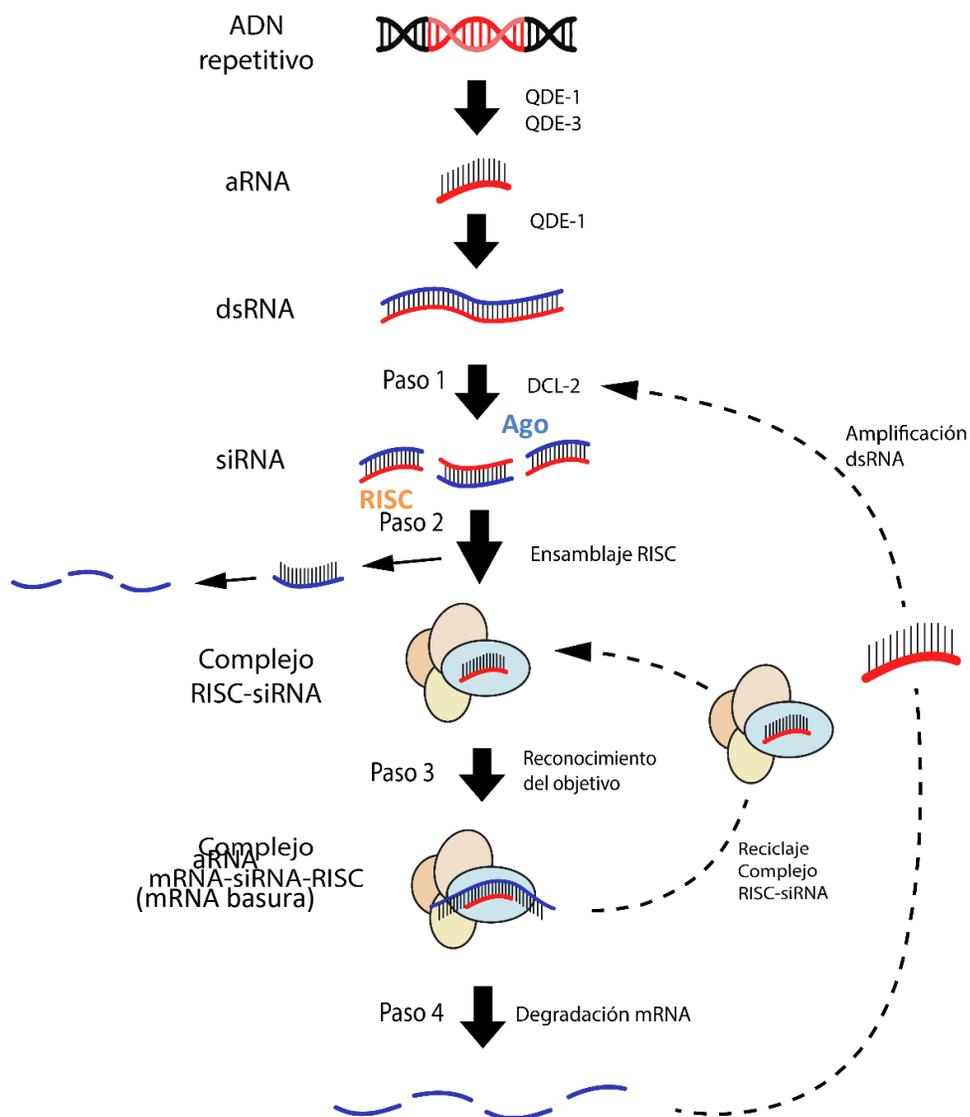


Donde:  $km_X$  es la tasa de transcripción del  $mRNA_X$  del gen  $X$  objetivo y  $dm_X$  es la tasa de degradación del  $mRNA_X$

Se realizó un esquema representativo del mecanismo de silenciamiento “Quelling” a través de referencias bibliográficas (**Figura 1**); que fue tomado como base para el modelamiento desde el paso 1 donde se desencadena la acción de la enzima Dicer, dividiendo el dsRNA en fragmentos de aproximadamente 25 nt.

**Figura 1**

*Esquema del mecanismo de silenciamiento "Quelling" en células fúngicas*



*Nota.* Regiones de ADN repetitivo promueven la producción de RNA aberrante (aRNA), donde QDE-1, ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), lo identifica y sintetiza dsRNA. Paso 1: el ARN de doble cadena (dsRNA) acciona la actividad de la enzima Dicer (DCL-2), que divide el dsRNA en fragmentos de ~25 pares de bases (siRNA dúplex) (Song & Rossi, 2017). Paso 2: los siRNA dúplex se cargan en el Complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), en QDE-2, la

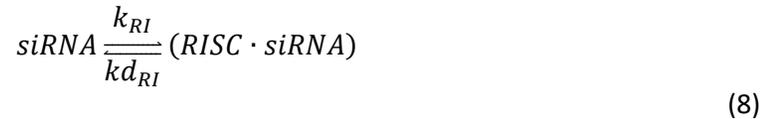
proteína Argonaute (Ago) inactiva (Carthew & Sontheimer, 2009); que corta la hebra sentido y degrada, formando un complejo RISC-siRNA funcional (Dang *et al.*, 2011). Paso 3: la hebra guía que actúa como plantilla del mecanismo, reconoce el mRNA objetivo por complementariedad de bases de Watson-Crick, formando un complejo RISC-siRNA-mRNA (Cuccato *et al.*, 2011). Paso 4: este último ensamble desencadena la degradación del ARNm objetivo, produce mRNA basura, reconocido como aRNA por RdRP para sintetizar dsRNA; además se libera el complejo RISC-siRNA para procesar más mRNA objetivo (Makeyev & Bamford, 2002). Adaptado de Cuccato, G., Polynikis, A., Siciliano, V., Graziano, M., di Bernardo, M., & di Bernardo, D. (2011). Modeling RNA interference in mammalian cells. *BMC Systems Biology*, 5. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-19>

Cuando el dsRNA sintético ingresa en las células del hongo, inicia el mecanismo de silenciamiento por ARNi. La proteína Dicer identifica el  $dsRNA_X$  y lo segmenta en  $X$  fragmentos cortos de  $siRNA_X$  (Ecuación 7).



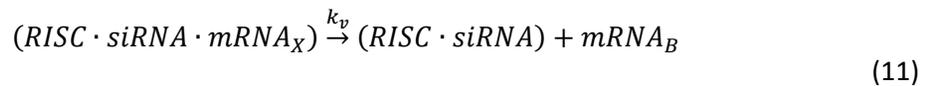
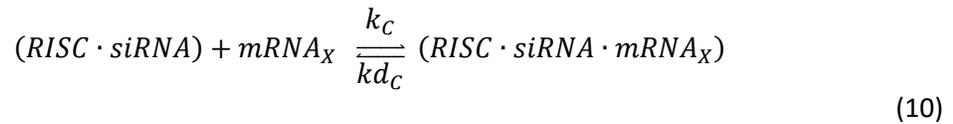
Donde:  $k_{Di}$  es la tasa de escisión de Dicer.

Las moléculas de  $siRNA_X$  se cargan en un complejo multiprotéico llamado Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN (RISC), para el modelamiento no se considera la concentración del complejo como reactante, ya que al ser parte del metabolismo del hongo, es abundante y constante en el sistema (Ecuación 8). En un inicio estas proteínas Ago se encuentran inactivas y para activarlas se necesita eliminar del complejo, la cadena pasajera del  $siRNA_X$  dúplex que posteriormente se degrada por otra proteína (Ecuación 9). Como podemos observar en las siguientes reacciones:



Donde:  $k_{RI}$  es la tasa de formación del complejo ( $RISC \cdot siRNA$ ),  $kd_{RI}$  es la tasa de disociación del complejo ( $RISC \cdot siRNA$ ) y  $dsi$  es la tasa de degradación de  $siRNA$ .

Los mRNA objetivo se reconocen y unen al complejo ( $RISC \cdot siRNA$ ) mediante el emparejamiento de bases (Ecuación 10). Posteriormente el complejo escinde el  $mRNA_X$  causando así su silenciamiento (Ecuación 11), a una velocidad  $k_v$  y una acumulación de  $mRNA$  basura; no se toma en cuenta un coeficiente estequiométrico para esta especie porque no hay referencias bibliográficas que detallen este mecanismo. Finalmente se degrada este  $mRNA_B$  (Ecuación 12).



Donde:  $k_C$  es la tasa de unión del complejo ( $RISC \cdot siRNA$ ) con  $mRNA_X$ ,  $kd_C$  es la tasa de disociación del complejo ( $RISC \cdot siRNA \cdot mRNA_X$ ),  $k_v$  es la tasa de formación del  $mRNA_B$  y  $dm_B$  es la tasa de degradación de  $mRNA_B$ .

Durante el proceso de ARNi existen rutas de amplificación de  $dsRNA$  y en el caso de los hongos, el  $mRNA_B$  es considerado  $aRNA$  por RdRP, a través del cual sintetiza el  $dsRNA$ .



Donde:  $k_a$  es la tasa de amplificación de  $dsRNA_X$  por RdRP.

Siguiendo las Ecuaciones 1 y 2, estimamos las tasas de transcripción de los cuatro genes objetivo, tomando como referencia los límites de las tasas de reacción de iGEM Ecuador (2021),  $Lm_B$ ,  $Lm_A$ ,  $Lp_A$  y  $Epol$ , serán iguales al 10 % de pares de bases (bp)/seg, 100 %bp/seg, 60 %nt/seg y 85% respectivamente. El valor de  $X$  va a ser igual al valor redondeado de la división entre la longitud de los dsRNA diseñados y 25, que es el tamaño aproximado de los fragmentos que corta la enzima Dicer en los hongos.

### Modelamiento matemático

Este modelo ODE está diseñado para una célula fúngica como FOC TR1/TR4. Donde todos los valores de los parámetros se encuentran en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, y se realizan las siguientes suposiciones para su desarrollo:

1. Se considera que las concentraciones de proteínas Dicer, complejos RISC y enzimas RdRP son lo suficientemente grandes y constantes, por lo que las fluctuaciones con el tiempo pueden descuidarse.
2. Tomando en cuenta su aplicación como control de plagas, el dsRNA sintético que ingresa al hongo será la condición inicial de concentración de dsRNA que desencadena el mecanismo.
3. La conversión de  $dsRNAs$  en  $X$   $siRNAs$  (aproximadamente 25 nt) toma en cuenta como una reacción irreversible y rápida.
4.  $X$  es el número de  $siRNAs$  que depende de la longitud del ARN diana.
5. Una molécula de  $siRNA$  basta para escindir el ARN objetivo y, detrás, iniciar el mecanismo de silenciamiento del ARN.
6.  $dsX$  son las moléculas de dsRNA del gen  $X$ ,  $si$  denotará al  $siRNA$ ,  $RI$  es el complejo  $RISC$ , el mRNA objetivo del gen  $X$  es  $m_X$  y  $m_B$  es el mRNA degradado.

**Modelo EDO**

$$\frac{d[m_X]}{dt} = km_X - k_C[m_X][RI \cdot si] + kd_C[RI \cdot si \cdot m_X] - dm_X[m_X]$$

$$\frac{d[dsX]}{dt} = -k_{Di}[dsX] + k_a[m_B]$$

$$\frac{d[si]}{dt} = X k_{Di}[dsX] - k_{RI}[si] + kd_{RI}[RI \cdot si] - d_{si}[si]$$

$$\frac{d[RI \cdot si]}{dt} = k_{RI}[si] - kd_{RI}[RI \cdot si] - k_C[m_X][RI \cdot si] + kd_C[RI \cdot si \cdot m_X] + k_v[RI \cdot si \cdot m_X]$$

$$\frac{d[RI \cdot si \cdot m_X]}{dt} = k_C[m_X][RI \cdot si] - kd_C[RI \cdot si \cdot m_X] - k_v[RI \cdot si \cdot m_X]$$

$$\frac{d[m_B]}{dt} = k_v[RI \cdot si \cdot m_X] - dm_B[m_B] - k_a[m_B]$$

(14)

**Parámetros utilizados en el modelamiento matemático**

A continuación, se despliegan tablas con los parámetros y valores generales del modelo (**Tabla 1**) con sus referencias correspondientes y los parámetros específicos estimados de cada gen objetivo (**Tabla 2**).

**Tabla 1**

Parámetros generales del mecanismo ARNi

Parámetro	Descripción	Valor	Referencia
$k_{Di}$	Taza de escisión de Dicer	$0.033 \text{ min}^{-1}$	(Meng <i>et al.</i> , 2017)
$k_{RI}$	Taza de formación de $[RI \cdot si]$	$0.33 \text{ min}^{-1}$	(iGEM Ecuador, 2021)
$k_C$	Taza de unión de $[RI \cdot si]$ con $mRNA_X$	$1.33 e^{-4} \text{ molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	(Groenenboom <i>et al.</i> , 2005)
$k_v$	Taza de degradación de $mRNA_X$ por ARNi	$8.1 e^{-3} \text{ min}^{-1}$	(Cuccato <i>et al.</i> , 2011)
$k_a$	Taza de amplificación de $dsRNA$ por RdRP	$3.333 e^{-4} \text{ min}^{-1}$	(Groenenboom <i>et al.</i> , 2005)
$kd_{RI}$	Tasa de disociación de $[RI \cdot si]$	$1.667 e^{-11} \text{ min}^{-1}$	(Bartlett & Davis, 2006)
$d_{si}$	Taza de degradación de $siRNA$	$0.033 \text{ min}^{-1}$	(Carthew & Sontheimer, 2009)
$kd_C$	Taza de disociación de $[RI \cdot si]$ con $mRNA_X$	$0.0167 \text{ min}^{-1}$	(Bartlett & Davis, 2006)
$dm_X$	Taza de degradación de $mRNA_X$	$0.0023 \text{ min}^{-1}$	(Meng <i>et al.</i> , 2017)
$dm_B$	Taza de degradación de $mRNA_B$	$0.0467 \text{ min}^{-1}$	(Groenenboom <i>et al.</i> , 2005)

**Tabla 2**

Parámetros específicos de los genes Velvet, SIX1, SGE1 y ERG11

Parámetro	Descripción	Valor	Referencia
$km_{VE}$	Taza de transcripción de $mRNA$ del gen Velvet	$3 \text{ molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	Estimados
$X_{VE}$	$siRNAs$ del gen Velvet	18	
$km_{SIX}$	Taza de transcripción de $mRNA$ del gen SIX1	$5 \text{ molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	
$X_{SIX}$	$siRNAs$ del gen SIX1	19	
$km_{SGE}$	Taza de transcripción de $mRNA$ del gen SGE1	$3 \text{ molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	
$X_{SGE}$	$siRNAs$ del gen SGE1	19	
$km_{ERG}$	Taza de transcripción de $mRNA$ del gen ERG11	$2 \text{ molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	
$X_{ERG}$	$siRNAs$ del gen ERG11	15	

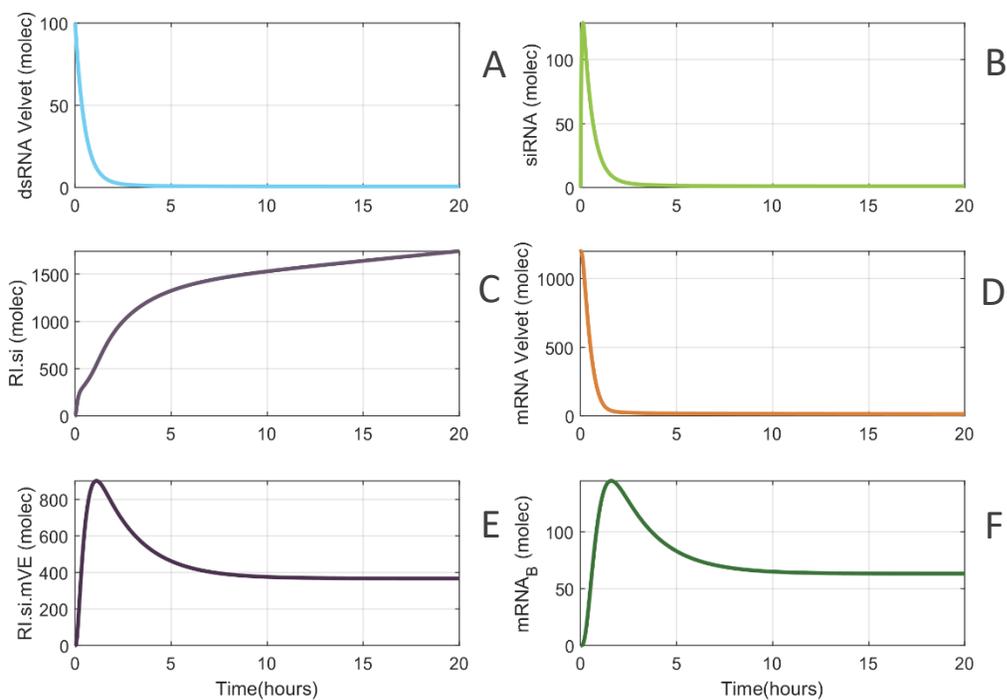
### Simulación computacional

Mediante la función ode15 de MATLAB, se resolvieron los sistemas de ecuaciones diferenciales de los genes objetivo: Velvet, SIX1, SGE1 y ERG11. Teniendo en cuenta la siguiente configuración para las simulaciones: Intervalo de integración de 0 a 20h, tolerancia de error absoluto y relativo de  $1e-8$ , la matriz de masa inicial es una matriz diagonal de  $6 \times 6$ , se trabajó con una concentración inicial de mRNA igual a 1200 moléculas.

A través de las gráficas de cada especie química del sistema teniendo como ejemplo el modelamiento de silenciamiento del gen Velvet: se determina que mecanismo a partir de las 5h mantiene estabilidad, se procesa rápidamente el dsRNA (**Figura 2A**) en siRNA, también la formación del complejo [Ri-si] es una reacción rápida, pudiendo aproximarse mediante QSS (**Figura 2C**). En la figura se observa que al mismo tiempo el aumento de siRNA, silencia el mRNA objetivo y produce mRNA basura. La reacción de esta última especie para sintetizar dsRNA, no se logra expresar a través de este modelamiento o en ínfima con respecto a los otros procesos. En el Anexo 2 se pueden encontrar gráficas del comportamiento de las especies químicas de los otros genes objetivo.

**Figura 2**

*Comportamiento de las especies bioquímicas en el modelamiento del ARNi del gen Velvet*

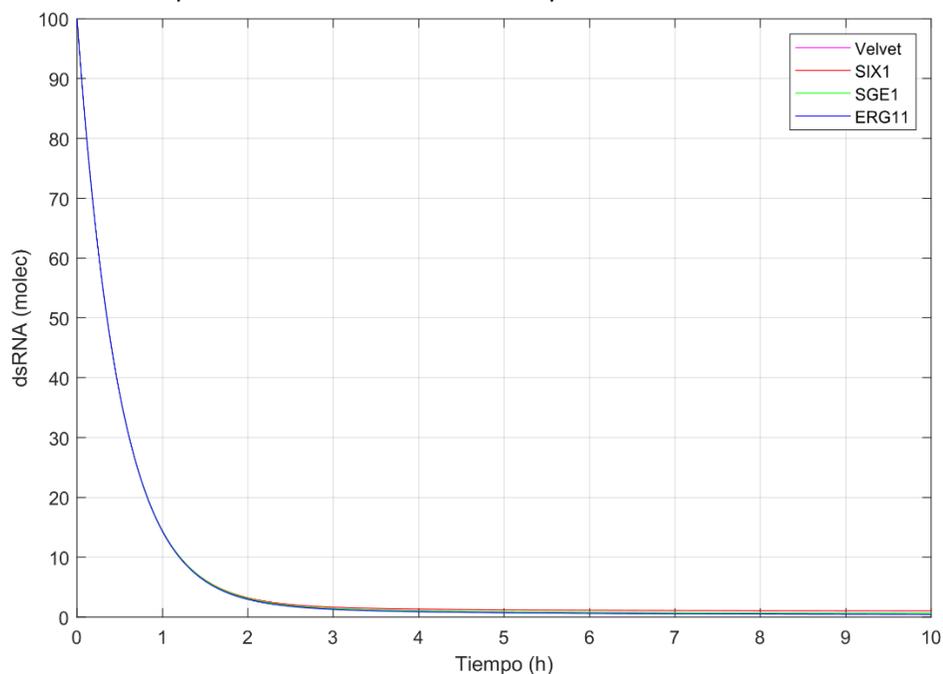


*Nota.* Simulación computacional con concentración inicial de dsRNA de 100 moléculas.

También realizamos comparaciones entre los modelamientos de los genes objetivo dependiendo de una especie química en específico. Se distinguió que el comportamiento de la concentración de dsRNA en relación al tiempo es igual en cualquier modelo (Figura 3) y en el caso de la concentración de siRNA en función del tiempo, hay variaciones del punto máximo dependiendo del modelamiento (Figura 4). Si tomamos en cuenta la Figura 5, los modelamientos de los genes Velvet y SGE1 siguen el mismo comportamiento en relación con la producción de mRNA basura, el modelo SIX1 sobrepasa al resto de modelos con la mayor concentración mRNA degradado. Podemos encontrar gráficas comparativas de las demás especies químicas en el Anexo 3.

**Figura 3**

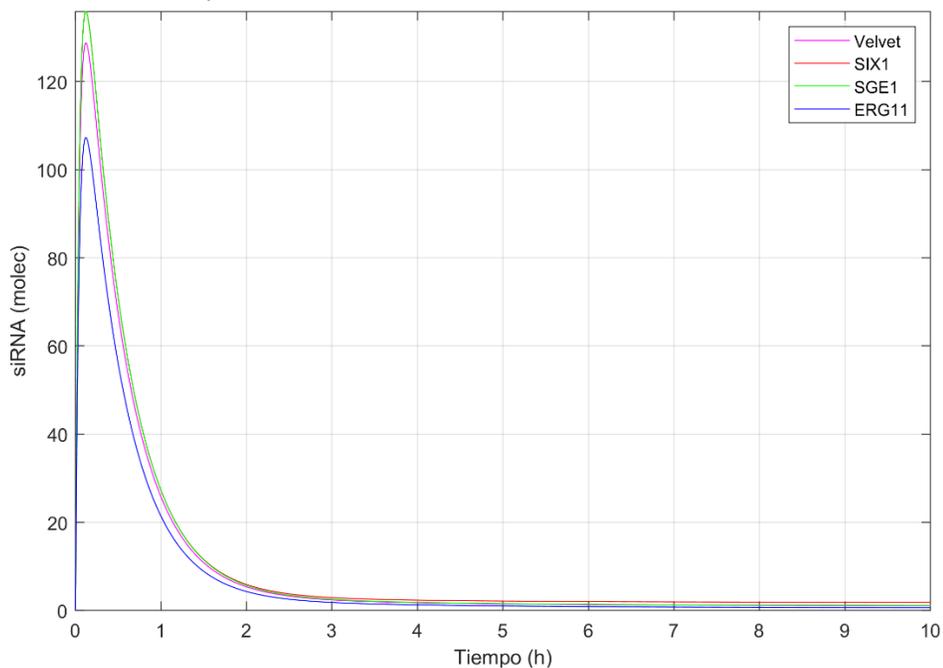
Comparación de modelamientos de los cuatro genes objetivo: Velvet, SIX1, SGE1 y ERG11; con relación al comportamiento del dsRNA vs. tiempo



Nota. Simulación computacional con concentración inicial de dsRNA de 100 moléculas.

**Figura 4**

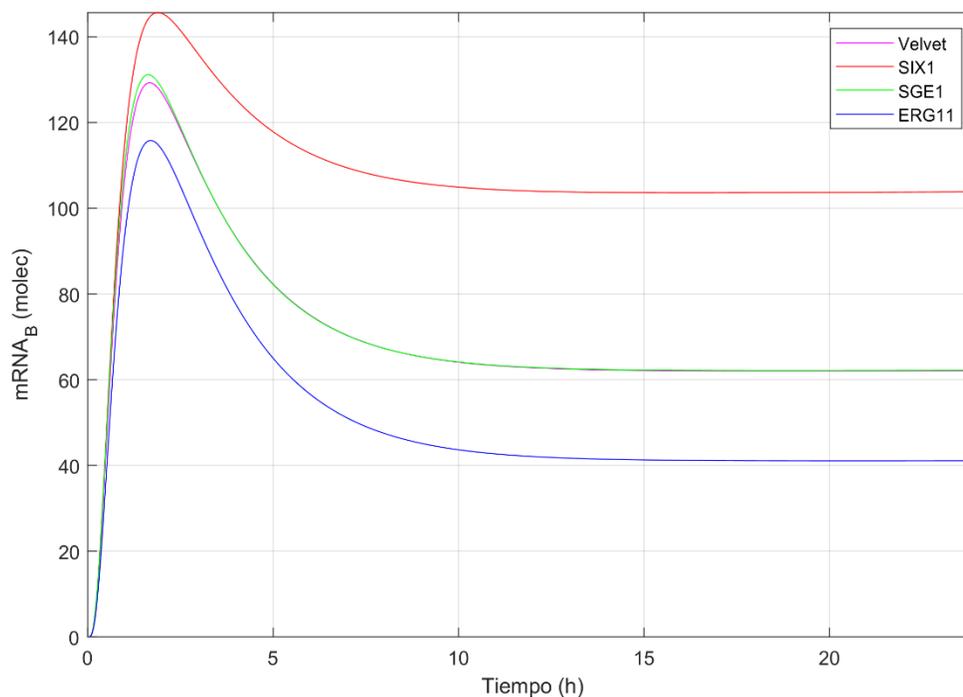
Comparación de modelamientos de los cuatro genes objetivo, con relación al comportamiento del siRNA vs. tiempo



Nota. Simulación computacional con concentración inicial de dsRNA de 100 moléculas.

**Figura 5**

Comparación de modelamientos de los cuatros genes objetivo, con relación al comportamiento del mRNA basura vs. tiempo



**Nota.** Simulación computacional con concentración inicial de dsRNA de 100 moléculas.

En la Figura 6, el análisis de Dosis vs. Efecto sobre mRNA del gen SIX1, se evidenció que a mayor concentración de dsRNA más rápido se da el proceso de silenciamiento y con concentración de dsRNA de cero, no se activa o inicia el mecanismo de silenciamiento. También se observa que todas dosis convergen en un estado de equilibrio, que lo determinaremos como el máximo nivel de inhibición que alcanzan los sistemas.

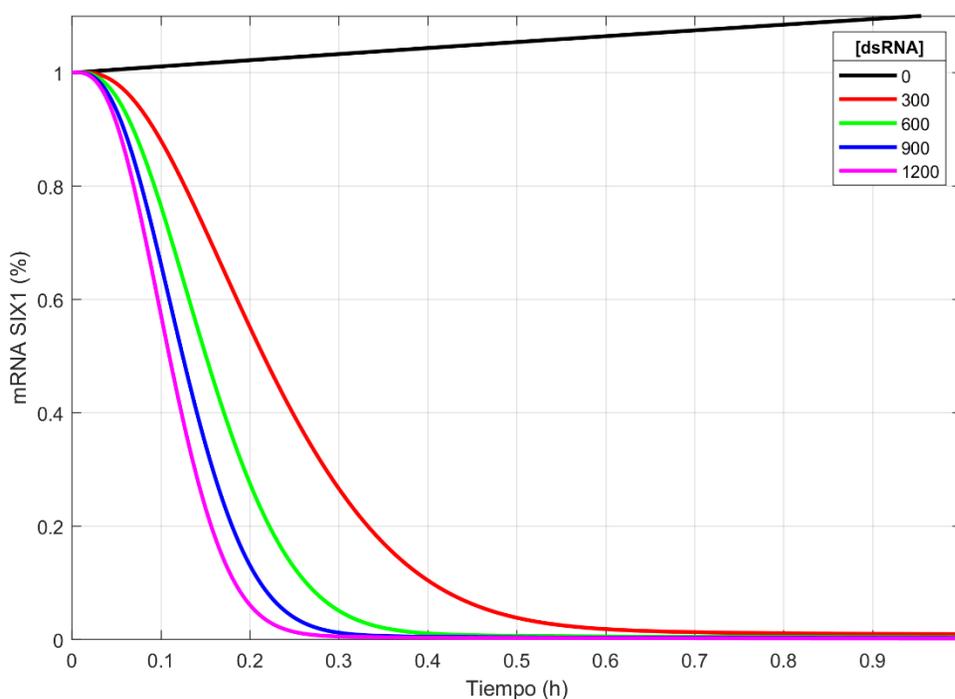
Para encontrar las dosis requeridas en cada modelamiento, donde la concentración de mRNA objetivo alcance un 99.99% de nivel de inhibición, se tomó en consideración un tiempo de 5 días, ya que es el tiempo de incubación *in vitro* de FOC donde se ha evidenciado experimentalmente el efecto de silenciamiento del ARN objetivo (Ghag *et al.*, 2014); además se evaluó entre un rango de 100 a 3000 moléculas. Se encontró que la dosis más elevada de dsRNA

necesaria para estas condiciones fue de 2630 moléculas para el modelo del gen SIX1, seguido con el dsRNA de Velvet de 1670 moléculas, 1560 moléculas para SGE1 y 1350 moléculas para ERG11 (**Figura 7**).

### **Figura 6**

*Relación de la expresión del mRNA del gen SIX1 frente a varias concentraciones de dsRNA*

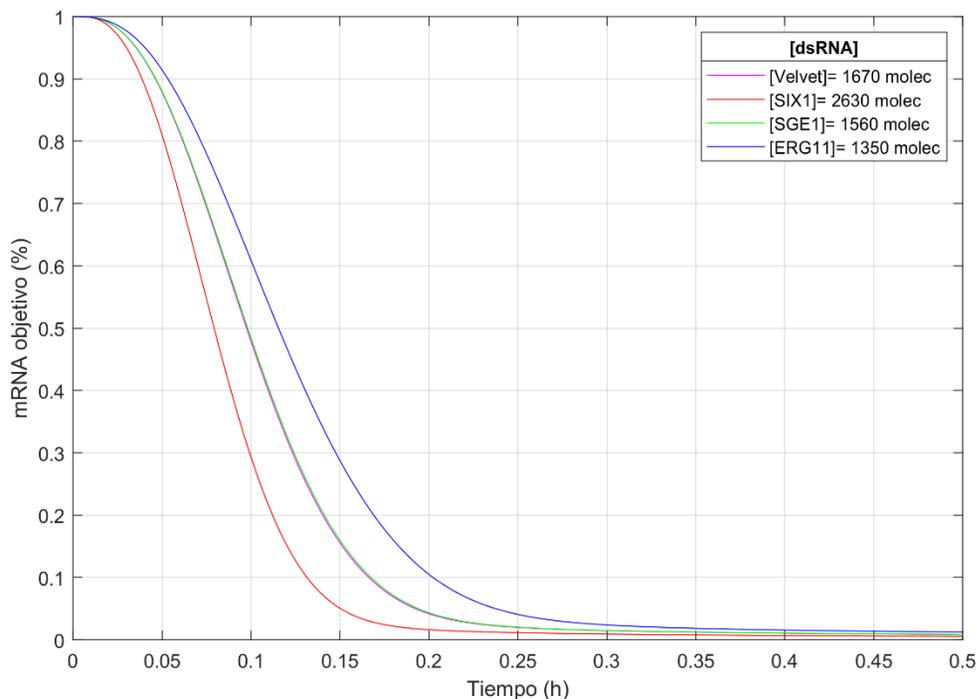
*(Relación Dosis –Respuesta)*



*Nota.* Relación entre las dosis de dsRNA que ingresan al sistema como condiciones iniciales vs. la concentración de mRNA objetivo en porcentaje, para observar el efecto de silenciamiento sobre el gen SIX1.

**Figura 7**

Relación de la dosis necesaria de dsRNA de cada gen objetivo hasta alcanzar un máximo nivel de inhibición en un tiempo definido (Relación Dosis –Respuesta)



*Nota.* Simulación computacional de los distintos modelamientos tomando en consideración la dosis necesaria para alcanzar un efecto de silenciamiento del 99.99% en un tiempo de 5 días; pero para facilitar la observación se graficó hasta 30 minutos.

### Capítulo V: Discusión

El modelo presentado se caracteriza de ser lo más aproximado al mecanismo de silenciamiento para hongos filamentosos en etapa asexual, ya que *Fusarium oxysporum* se caracteriza por su reproducción asexual. Este mecanismo en hongos es llamado “Quelling” y en el proceso donde la proteína Dicer divide el dsRNA, la rompe en fragmentos de aproximadamente 25 nucleótidos a diferencia en otros organismos con tamaños desde 20 nt

(Dang *et al.*, 2011). El paso más trascendental que varía con respecto al mecanismo en mamíferos, es la síntesis de dsRNA; ya que su proteína RdRP no prioriza la amplificación utilizando mRNA como cebador o plantilla, sino la síntesis a través de aRNA (Makeyev & Bamford, 2002).

La absorción de dsRNA sintético supuesta a través de la endocitosis mediada por clatrina (Wytinck *et al.*, 2020a) puede ser modelada por medio de la cinética enzimática (Birtwistle & Kholodenko, 2009) como podemos observar en la Ecuación 15. Esta ODE resultante no fue considerada dentro del modelamiento ya que no hay estudios experimentales que hayan calculado los parámetros  $V'_{max}$  y  $K'_m$  que respalden las etapas de este proceso para dsRNA.

$$\frac{d[dsXi]}{dt} = \frac{V'_{max} [dsX]}{K'_m + [dsX]} \quad (15)$$

Donde:  $[dsXi]$  es la concentración de dsRNA sintético internalizado en el organismo,  $[dsX]$  es la concentración de dsRNA externo,  $V'_{max}$  es la tasa de internalización máxima y  $K'_m$  es la concentración de dsRNA en que la velocidad de internalización es la mitad de  $V'_{max}$  (Birtwistle & Kholodenko, 2009).

Se ha observado experimentalmente que existe un efecto de saturación del sistema de ARNi, que se logra expresar en nuestros modelos matemáticos en forma de equilibrios (Cuccato *et al.*, 2011). En otros estudios se ha sugerido que dicha saturación, está relacionada con el complejo RISC u otras maquinarias influyentes en el proceso (Makeyev & Bamford, 2002). Dentro del modelamiento actual la especie que podría provocar esta característica, es el complejo RISC-siRNA que aumenta progresivamente su concentración, además que se va acumulando por el reciclaje del complejo después de la degradación del mRNA objetivo; probablemente la cantidad del complejo RISC-siRNA acabe siendo más elevada a la del mRNA

objetivo, causando saturación en el paso del ensamblaje del complejo RISC-siRNA-mRNA (Khan *et al.*, 2009).

Los modelos matemáticos de cada gen varían en función de sus dos parámetros estimados: la tasa de transcripción de mRNA y moléculas siRNA generadas por Dicer. Ésta última constante influye proporcionalmente en la concentración máxima que puede alcanzar vs. el tamaño del dsRNA que ingresa al sistema. En la cinemática del mRNA degradado o basura, la concentración varía en función de la tasa de transcripción, es decir que mientras más mRNA objetivo se produce, existe mayor concentración de mRNA basura.

Como enuncia Groenenboom (2005), dosis elevadas de dsRNA desencadenan respuestas mayores, más veloces que con dosis bajas y se establecen más rápidamente. Por lo tanto, la amplificación del efecto depende del flujo de dsRNA y su proceso es estable a pesar de que el organismo esté realizándose un auto-silenciamiento, también encontrado en datos experimentales (Cuccato *et al.*, 2011).

Para analizar la relación dosis-efecto se tomó en cuenta un tiempo de 5 días, porque con este tiempo de incubación del hongo FOC, se ha evidenciado experimentalmente a nivel *in vitro* la acción del silenciamiento de ARN al reducir su conteo de esporas (Ghag *et al.*, 2014). Comparando los modelamientos de los distintos genes, el dsRNA sintético más eficiente es ERG11 porque necesita menos concentración (1350 moléculas) con respecto a los otros dsRNAs, para alcanzar un máximo nivel de inhibición de 99.99% del mRNA. Posiblemente su eficiencia se deba a su menor tasa de transcripción y al menor tamaño de dsRNA.

Relacionando que FOC TR4 necesita de 2 a 3 semanas para diseminarse 50 cm en la planta y que dentro del modelamiento se requiere concentraciones pequeñas (máximo  $4.3673 \times 10^{-9}$  pmol de dsRNA contra gen SIX1) para silenciar un 99.99% del gen objetivo esencial de FOC en 5 días; es muy probable que se pueda evitar fácilmente la infección de FOC

antes que llegue a diseminarse en la planta. Además, que tal vez ni se necesite alcanzar un porcentaje tan elevado de inhibición en la transcripción de los genes esenciales, para causar un efecto en el metabolismo vital del hongo.

## Capítulo VI: Conclusiones

Las reacciones bioquímicas formuladas del mecanismo de silenciamiento “Quelling”, se aproximan al mecanismo supuestamente utilizado por *F. oxysporum*, por sus rasgos como hongo filamentoso con reproducción asexual. Y se consideran: la producción de siRNA en segmentos de aproximadamente 25 nt y la amplificación de dsRNA por parte de QDE-1 a través del RNA aberrante; que son características distintivas del mecanismo en hongos frente a mamíferos e insectos. Además, los modelamientos matemáticos de cada gen son específicos, por la aplicación de los parámetros únicos de cada mRNA objetivo.

A partir de las reacciones bioquímicas se desarrolló un modelo matemático base en forma de un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias, donde con el cambio de la tasa de transcripción de mRNA objetivo y cantidad de siRNA, producto de la acción de la enzima Dicer; permitió adecuar el modelo para cada dsRNA sintético diseñado por iGEM Ecuador.

La simulación computacional de cada modelo matemático resultante se realizó a través del programa MATLAB, donde se identificó el mismo efecto de saturación encontrado en experimentación *in vivo*; posiblemente relacionado con la producción continua y reciclaje de complejo RISC-siRNA, afectando a todo el sistema. A mayor concentración de dsRNA, mayor el efecto de silenciamiento que desencadena en el sistema.

La tasa de transcripción de mRNA objetivo dependiente del tamaño del ADN codificante de cada gen, y la cantidad de siRNA producidos por acción de Dicer, dependiente del tamaño del dsRNA diseñado, influyen en el silenciamiento de ARN en hongos. Esto se evidenció en el

comportamiento de las concentraciones de siRNA y mRNA basura en función del tiempo, además de las variaciones en dosis necesarias para causar una respuesta deseada en un tiempo definido. En la relación de dosis efecto con la producción de mRNA, se constató que el dsRNA más eficiente fue del gen ERG11, posiblemente debido a su menor tasa de transcripción y menor tamaño de dsRNA. Además, todos los modelos alcanzaron niveles de inhibición de más del 99.99% de mRNA de los genes esenciales en un tiempo de 5 días con concentraciones menores de  $5 \times 10^{-9}$  pmol de dsRNA sintético; alcanzando probablemente a evitar la infección de FOC RT4, por afectar su metabolismo vital.

### Capítulo VII: Recomendaciones

Debido al poco estudio de endocitosis mediada por clatrina y la producción de mRNA o proteínas por parte de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza tropical 4, no se lograron obtener los parámetros de adsorción de dsRNA sintético y sólo se pudieron estimar las tasas de transcripción aproximadas de los mRNA objetivos; por lo cual se recomienda realizar experimentos en laboratorio para definir adecuadamente dichos parámetros y ajustar el modelo con estos para que se acerque más a la realidad.

Se recomienda que, para realizar una comparación experimental con el modelo matemático, se reduzca la reacción de producción del siRNA y en lo posible reducir la derivada del complejo RISC-siRNA-mRNA; para que en la práctica sea más manejable el obtener las constantes o tasas necesarias que actúan en el sistema biológico por medio de la experimentación (Campos, 2017). Este proceso se lo puede realizar aplicando la denominada *Aproximación Quasi-Estacionaria* (QSSA por las siglas en inglés) en las EDOs de reacciones bioquímicas rápidas con respecto a otras, y se obtiene relaciones algebraicas entre las especies del sistema (Picó *et al.*, 2015).

Bibliográficamente este sistema también puede ser expresado a través de la reacción enzimática de Michaelis – Menten, donde el complejo RISC-siRNA cargado sería la enzima activa con concentración constante, el ARNm sería sustrato y como producto tendríamos el mRNA basura (Cuccato *et al.*, 2011). No se utilizó esta representación ya que no toma en consideración la formación del complejo RISC-siRNA que depende de forma estequiométrica por la constante  $X$ , de la longitud del dsRNA sintético ingresado. Pero dentro del modelamiento podría aplicarse en el caso de la formación del complejo RISC-siRNA-mRNA, tomando este último como producto, complejo RISC-siRNA como enzima y como sustrato la hebra pasajera que se escinde del dúplex siRNA; según Dang *et al.* (2011).

### Capítulo VIII: Referencias

- AGROCALIDAD. (2020). *Guía de medidas fitosanitarias para la prevención del ingreso de Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 tropical (R4T) a sitios de producción de musáceas en el Ecuador*. Resolución Ministerial 0110 - Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2021/06/ACTUALIZACION-DE-RESOLUCION-110.pdf>
- Bartlett, D. W., & Davis, M. E. (2006). Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Research*, 34(1), 322. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKJ439>
- BCE. (2021). *Información Estadística Mensual No. 2029 - Marzo 2021: Exportaciones por grupo de productos*. <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/IEMensual/m2029/IEM-312-e.xlsx>

- Birtwistle, M. R., & Kholodenko, B. N. (2009). Endocytosis and signalling: A meeting with mathematics. *Molecular Oncology*, 3(4), 308.  
<https://doi.org/10.1016/J.MOLONC.2009.05.009>
- Boada, Y., Vignoni, A., Alarcon-Ruiz, I., Andreu-Villarraig, C., Monfort-Llorens, R., Requena, A., & Picó, J. (2019). Characterization of Gene Circuit Parts Based on Multiobjective Optimization by Using Standard Calibrated Measurements. *ChemBioChem*, 20(20), 2653–2665. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201900272>
- Campos, F. A. (2017). *Distribuciones Cuasi-Estacionarias para el proceso de Bessei en el intervalo (0,1)*. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/145793>
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.01.035>
- Chamba, A., Montoya, A., Granda, A., & Quezada, T. (2021). Evolución en las exportaciones de banano e impacto del desarrollo económico, provincia de El Oro 2011 - 2020, pre-pandemia, pandemia; aplicando series de tiempo. *Polo Del Conocimiento*, 6(8), 257–277.  
<https://www.polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/2936>
- Cheng, C., Liu, F., Sun, X., Tian, N., Mensah, R. A., Li, D., & Lai, Z. (2019). Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 (Foc TR4) responsive miRNAs in banana root. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50130-2>
- Cuccato, G., Polynikis, A., Siciliano, V., Graziano, M., di Bernardo, M., & di Bernardo, D. (2011). Modeling RNA interference in mammalian cells. *BMC Systems Biology*, 5.  
<https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-19>
- Curry, C. (2022, June 8). *Fusarium oxysporum f.sp. cubense tropical race 4 (Foc TR4)*. CAB International. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/59074053>

- Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., & Liu, Y. (2011). RNA Interference in Fungi: Pathways, Functions, and Applications. *Eukaryotic Cell*, *10*(9), 1148–1155. <https://doi.org/10.1128/EC.05109-11>
- Dou, T., Shao, X., Hu, C., Liu, S., Sheng, O., Bi, F., Deng, G., Ding, L., Li, C., Dong, T., Gao, H., He, W., Peng, X., Zhang, S., Huo, H., Yang, Q., & Yi, G. (2020). Host-induced gene silencing of Foc TR4 ERG6/11 genes exhibits superior resistance to Fusarium wilt of banana. *Plant Biotechnology Journal*, *18*(1), 11. <https://doi.org/10.1111/PBI.13204>
- FAO. (2020). *Análisis del mercado del banano*. <https://www.fao.org/3/ca9212es/ca9212es.pdf>
- FEDEXPOR. (2022). Expordata Especial 2021. *EXPORdata*.  
<https://drive.google.com/file/d/1askCvr-1TofNiopRUWtpDUV1Vg2LN-y-/view>
- Galindo, E. (2010). *Matemáticas Superiores* (ProCiencia Editores, Ed.; 3era ed.).
- Gallego Eduardo, & Sánchez José. (2006). *Estructuras vegetativas*. MYCO-UAL.  
<https://w3.ual.es/GruposInv/myco-ual/vegetat.htm>
- Ghag, S. B., Shekhawat, U. K. S., & Ganapathi, T. R. (2014). Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against Fusarium wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal*, *12*(5), 541–553.  
<https://doi.org/10.1111/PBI.12158>
- Groenenboom, M. A. C., Marée, A. F. M., & Hogeweg, P. (2005). The RNA Silencing Pathway: The Bits and Pieces That Matter. *PLoS Computational Biology*, *1*(2), 0155–0165.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.0010021>
- Gurdaswani, V., Ghag, S. B., & Ganapathi, T. R. (2020). FocSge1 in Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 1 is essential for full virulence. *BMC Microbiology*.  
<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12866-020-01936-y.pdf>

- Horn, T., & Boutros, M. (2010). E-RNAi: a web application for the multi-species design of RNAi reagents—2010 update. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl\_2), W332–W339.  
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKQ317>
- iGEM Ecuador. (2021). *Team:Ecuador - 2021.igem.org*. International Genetically Engineered Machine (iGEM) Foundation. <https://2021.igem.org/Team:Ecuador>
- iGEM Foundation. (2022). *Protein coding sequences - parts.igem.org*.  
[https://parts.igem.org/Protein\\_coding\\_sequences](https://parts.igem.org/Protein_coding_sequences)
- INEC. (2021). *Documento metodológico de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC)*. [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2020/Metodologia%20ESPAC%202020.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Metodologia%20ESPAC%202020.pdf)
- Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E., & López-Malo, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 14–23. [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4\(2\)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4(2)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf)
- Kanehisa Laboratories. (2021, April 3). *KEGG PATHWAY: Endocytosis - Fusarium oxysporum*. KEGG. <https://www.genome.jp/pathway/fox04144>
- Khan, A. A., Betel, D., Miller, M. L., Sander, C., Leslie, C. S., & Marks, D. S. (2009). Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nature Biotechnology*, 27(6), 549–555. <https://doi.org/10.1038/nbt.1543>
- Lahoz-Beltrá, R. (2004). *Bioinformática : simulación, vida artificial e inteligencia artificial* (Ediciones Díaz de S...). Díaz de Santos.  
<https://books.google.com/books/about/Bioinform%C3%A1tica.html?hl=es&id=1Lxt1Eviy8cC>

- Makeyev, E. v., & Bamford, D. H. (2002). Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes. *Molecular Cell*, *10*(6), 1417–1427. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00780-3/ATTACHMENT/46D7C603-8719-4F27-B4FE-C003DFC36FC1/MMC4.JPG](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00780-3/ATTACHMENT/46D7C603-8719-4F27-B4FE-C003DFC36FC1/MMC4.JPG)
- Martínez-Cruz, J., & Rueda, A. B. (2017). El estudio de los efectores, ¿La vía para descubrir nuevas dianas para fitoterapias antioidios? Studying effectors, a way to discover new targets for anti-powdery mildew phytotherapies? *Encuentros En La Biología*, *10*(163), 237–239.
- Meng, H., Wang, Z., Wang, Y., Zhu, H., & Huang, B. (2017). Dicer and Argonaute Genes Involved in RNA Interference in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium robertsii*. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(7). <https://doi.org/10.1128/AEM.03230-16>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2019, September 9). *Agricultura, la base de la economía y la alimentación*. <https://www.agricultura.gob.ec/agricultura-la-base-de-la-economia-y-la-alimentacion/>
- Muñoz-Miranda, L. A., Higuera-Ciapara, I., Gschaedler-Mathis, A. C., Rodríguez-Zapata, L. C., Pereira-Santana, A., Figueroa-Yáñez, L. J., Muñoz-Miranda, L. A., Higuera-Ciapara, I., Gschaedler-Mathis, A. C., Rodríguez-Zapata, L. C., Pereira-Santana, A., & Figueroa-Yáñez, L. J. (2019). Breve Descripción de la Biología Sintética y la Importancia de su Relación con otras Disciplinas. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, *40*(1), 1–7. <https://doi.org/10.17488/RMIB.40.1.9>
- National Human Genome Research Institute. (2022, July 21). *Transcripción*. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Transcripcion>
- Noriega, D., Valencia, A., & Villegas, B. (2016). ARN DE INTERFERENCIA (ARNi): UNA TECNOLOGÍA NOVEDOSA CON POTENCIAL PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA. *Rev.*

*U.D.C.A. Act & Div. Cient.*, 19(1), 25–35.

<http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v19n1/v19n1a04.pdf>

Ogata, K. (2003). Ingeniería de control moderna. In *Pearson Educación* (4th ed.). Pearson Educación.

[https://books.google.com/books/about/Ingenier%C3%ADa\\_de\\_control\\_moderna.html?hl=es&id=QK148EPC\\_m0C](https://books.google.com/books/about/Ingenier%C3%ADa_de_control_moderna.html?hl=es&id=QK148EPC_m0C)

Pegg, K. G., Coates, L. M., O'Neill, W. T., & Turner, D. W. (2019). The Epidemiology of Fusarium Wilt of Banana. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01395>

Picó, J., Vignoni, A., Picó-Marco, E., & Boada, Y. (2015). Modelado de sistemas bioquímicos: De la Ley de Acción de Masas a la Aproximación Lineal del Ruido. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial RIAI*, 12(3), 241–252.

<https://doi.org/10.1016/J.RIAI.2015.06.001>

Ploetz, R. C. (2000). Panama Disease: A Classic and Destructive Disease of Banana. *Plant Health Progress*, 1(1), 10. <https://doi.org/10.1094/PHP-2000-1204-01-HM>

Ploetz, R. C. (2006). Fusarium Wilt of Banana Is Caused by Several Pathogens Referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*, 96(6), 653–656.

<https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0653>

Raviolo, A., Garritz, A., & Sosa, P. (2011). *Sustancia y reacción química como conceptos centrales en química. Una discusión conceptual, histórica y didáctica*. Revista Eureka de Divulgación y Enseñanza de Las Ciencias.

<https://rid.unrn.edu.ar/handle/20.500.12049/6434>

Rivera, J. (2008). *Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias*.

[http://www.fhia.org.hn/descargas/Departamento\\_de\\_Proteccion\\_Vegetal/hoja\\_tecnica\\_proteccion\\_vegetal01.pdf](http://www.fhia.org.hn/descargas/Departamento_de_Proteccion_Vegetal/hoja_tecnica_proteccion_vegetal01.pdf)

Rodríguez, M. (2019, August). *Fusarium RT4 - CropLife Latin America*.

<https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/el-mayor-enemigo-de-las-musaceas-parece-haber-llegado-al-continente-americano>

Salto Guale, A. (2019). *Mal de Panamá - CropLife Latin America*.

<https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/mal-de-panama>

Sánchez Gil, J. Í., Shingareva, I. K., & García, M. G. (2004). Introducción a la Teoría de Perturbaciones Usando Álgebra Computacional. *XIV Semana Nacional de Investigación y Docencia En Matemáticas*, 149–155. <https://doi.org/10.13140/2.1.1020.6242>

SENASA. (2021). *MIDAGRI: SENASA confirma brote de Fusarium Raza 4 Tropical en Piura - SENASA al día*. <https://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/midagri-senasa-confirma-brote-de-fusarium-raza-4-tropical-en-piura/>

Shampine, L. F., & Reichelt, M. W. (1997). THE MATLAB ODE SUITE. *SIAM Journal on Scientific Computing*, 18, 1–22.

SIPA. (2021). *Comercio Exterior*. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/comercio-exterior>

Smith, M. K., Hamill, S. D., Langdon, P. W., Giles, J. E., Doogan, V. J., & Pegg, K. G. (2006).

Towards the development of a Cavendish banana resistant to race 4 of fusarium wilt: gamma irradiation of micropropagated Dwarf Parfitt (*Musa* spp., AAA group, Cavendish subgroup). *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(1), 107–113.

<https://doi.org/10.1071/EA04175>

Song, M. S., & Rossi, J. J. (2017). Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochemical Journal*, 474(10), 1603–1618.

<https://doi.org/10.1042/BCJ20160759>

Suquilanda Valdivieso, M. B. (2017). *Manejo agroecológico de plagas* (M. D. Villamar & C. Carrión, Eds.; 1st ed.). Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.

<https://balcon.mag.gob.ec/mag01/magapaldia/libro/Manejo%20agroecolo%CC%81gico%20de%20plagas%20MSV.pdf>

The World Bank. (2021, February). *Employment in agriculture (% of total employment) (modeled ILO estimate) - Ecuador | Data*. ILOSTAT Database.

<https://data.worldbank.org/indicator/SL.AGR.EMPL.ZS?locations=EC>

Vaca, E., Gaibor, N., & Kovács, K. (2020). Analysis of the chain of the banana industry of Ecuador and the European market. *Applied Studies in Agribusiness and Commerce*, 14(1–2).

<https://doi.org/10.19041/APSTRACT/2020/1-2/7>

Velandia, C. (2021). *Diseño de un control biológico para el hongo Fusarium oxysporum f.sp. cubense, agente causal del Mal de Panamá, empleando Pseudomonas fluorescens recombinante para la sobreexpresión de sideróforo*.

Vignoni, A. (2021). *Modeling I: ODEs and Hill Functions - 2021 iGEM Engineering Webinars*. iGEM Video Universe. <https://video.igem.org/w/kC1X3vhSxvZMqidkPKtRSZ>

Widinugraheni, S., Niño-Sánchez, J., van der Does, H. C., van Dam, P., García-Bastidas, F. A., Subandiyah, S., Meijer, H. J. G., Kistler, H. C., Kema, G. H. J., & Rep, M. (2018). A SIX1 homolog in *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense tropical race 4 contributes to virulence towards Cavendish banana. *PLOS ONE*, 13(10), e0205896.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205896>

Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013). Molecular Mechanisms of RNA Interference.

<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>, 42(1), 217–239.

<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>

Wytinck, N., Manchur, C. L., Li, V. H., Whyard, S., & Belmonte, M. F. (2020a). dsRNA Uptake in Plant Pests and Pathogens: Insights into RNAi-Based Insect and Fungal Control

Technology. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 1780, 9(12), 1780.

<https://doi.org/10.3390/PLANTS9121780>

Wytinck, N., Sullivan, D. S., Biggar, K. T., Crisostomo, L., Pelka, P., Belmonte, M. F., & Whyard, S. (2020b). Clathrin mediated endocytosis is involved in the uptake of exogenous double-stranded RNA in the white mold phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69771-9>