



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

Velandia Revelo, Camila Ivonne

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



04 de marzo del 2021



Document Information

Analyzed document C:\Velandia_paraUrkund.txt (D97107619)
Submitted 3/3/2021 4:02:00 PM
Submitted by
Submitter email fjflores2@espe.edu.ec
Similarity 0%
Analysis address fjflores2.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	5- Libro completo Biotecnología Vegetal.docx Document 5- Libro completo Biotecnología Vegetal.docx (D63264241)	 1
W	URL: https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8471/tesis435.pdf;seque ... Fetched: 6/21/2020 9:33:07 AM	 1



Escaneo autorizado por:
**FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR**



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación “**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**”, fue realizado por **Velandia Revelo, Camila Ivonne** ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud; por lo tanto cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, de modo que, me permito acreditarlo y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 04 de marzo del 2021



Firmado electrónicamente por:
FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR

Flores Flor, Francisco Javier PhD.
DIRECTOR



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo **Velandia Revelo, Camila Ivonne** con cédula de ciudadanía n° 1718946856, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **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** fue realizado por **Velandia Revelo Camila Ivonne**, 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, 04 de marzo de 2021

Firma

Velandia Revelo, Camila Ivonne

C.C.: 1718946856



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Velandia Revelo, Camila Ivonne** con cédula de ciudadanía n° 1718946856, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **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** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 04 de marzo de 2021

Firma

Velandia Revelo, Camila Ivonne

C.C.: 1718946856

Dedicatoria

A mi amado padre Julio, por siempre creer en mí y nunca dudar de mis capacidades, por consentirme y apoyarme en cada paso de mi vida, por su esfuerzo y sacrificio para que nunca nos falte nada y por estar siempre para mí con su amor incondicional.

A mi hermosa madre Elba, por enseñarme a luchar por mis sueños, por guiarme en cada paso de mi vida, por ser mi consuelo y soporte en los momentos difíciles, por siempre estar para mí con su amor incondicional, por levantarme cuando he fallado y por reiniciar mi vida con sus abrazos.

A mi hermana Vero, por ser mi guía y confidente, mi ejemplo a seguir, mi soporte, por estar siempre para mí cuando lo he necesitado, por demostrarme su amor de hermana en cada palabra, en cada detalle en cada consejo y por ser la mejor hermana mayor del mundo.

A mi hermana Juli, por tu compañía a lo largo del desarrollo de la tesis, por tu dulzura y amor, por escucharme, por estar conmigo cuando te he necesitado, por enseñarme cada día a como ser una mejor hermana, por tus consejos y por qué siempre estaré para ti cuando me necesites.

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a Dios que me ha llenado de bendiciones a lo largo de mi carrera universitaria, por cuidarme y guiarme en cada paso de mi vida.

A mis padres Julio y Elba, por ser mi soporte y motivarme siempre a seguir adelante, gracias papitos por enseñarme a ser perseverante para conseguir mis sueños y sobre todo por su infinito amor que lo he sentido siempre presente en mi corazón y que me ha servido para cumplir todos mis objetivos. Este logro es para ustedes, quiero algún día recompensar todo lo que han hecho por mí y mis hermanas, siempre estaré infinitamente agradecida por haberme brindado todas las facilidades para que hoy pueda subir un escalón más en el camino de la vida y todo gracias a ustedes. ¡Los amo!

A mis hermanas Vero y Juli, gracias por su apoyo, amor y compañía, toda la vida estaremos juntas porque el lazo que nos une es inquebrantable.

A mi director Francisco Flores, gracias por sus enseñanzas a lo largo de la carrera, por ser mi mentor en el desarrollo de la tesis y excelente ser humano, por sus consejos para superarnos profesionalmente, gracias Doc. por confiar en mí y en sus estudiantes, siempre apoyándonos en cada idea, realmente es un profesor ejemplar, lo admiro mucho.

A Alma Koch, por el aprendizaje y consejos brindados dentro y fuera de aulas, por la confianza y ayuda lo largo de la carrera.

A Andrés Jarrín, quien me ha guiado y apoyado en el desarrollo de la tesis, gracias por cada consejo, por escucharme y entenderme cuando no tenía a quien explicar mi duda, has sido una excelente guía en la ejecución de mi trabajo. Tu amor

y compañía fueron muy importantes en este proceso y te agradezco mucho por eso amor.

A mi familia, (Amenaza Revelo) y amigos (Jackie, Negra, Jenny, Tefa, Sasha, Jany, Tefi Paredes, Paul) por acompañarme y motivarme en mi carrera universitaria, gracias por cada palabra de aliento, consejo y risas. Han sido fundamentales en mi vida, muchas gracias por el cariño.

Índice de Contenido

Hoja de resultados de la herramienta URKUND	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenido	9
Índice de Tablas	12
Índice de figuras.....	13
Abreviaturas.....	14
Resumen	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción	18
Formulación del problema.....	18
Justificación del problema	19
Objetivos	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos	22
Capítulo II: Marco teórico	23
Genero <i>Fusarium</i>	23
Características de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	24

Razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i>	24
Síntomas	25
Ciclo de la enfermedad	25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	29
Gen	29
Promotor	30
Sitio de unión a ribosoma (RBS)	30
Secuencia codificante (CDS)	30
Terminador	30
Plásmido	31
Ensamblaje molecular RFC10	31
Transcripción	32
Modelo matemático determinista	33
Aproximación quasi estacionaria	34
Células competentes y transformación celular	35
Factor de transcripción PbrA	37
Sideróforos	38
Regulación de la producción de pioverdina	41
Proteína Fur	43
Hipótesis	44
Capítulo III: Metodología	45
Búsqueda de secuencias para el diseño de casete genético	45
Diseño del constructo genético para la producción de pioverdina en <i>Pseudomonas fluorescens</i>	45
Desarrollo del Modelo matemático determinista para la predicción de pioverdina producida por <i>Pseudomonas fluorescens</i> recombinante	49
Ecuaciones para modelo de expresión constitutiva según (Picó et al., 2015)	50
Búsqueda bibliográfica para definir protocolo de transformación de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	51
Capítulo IV: Resultados	53
Secuencia de gen PbrA encontrada en base de datos del NCBI	53
Constructo genético para <i>Pseudomonas fluorescens</i> mediante ensamblaje RFC10	55

Resultado de Casete de expresión para el gen PbrA desarrollado en el software Benchling	56
Resultado de clonación del casete de expresión para el gen PbrA en el plásmido pUC-19.	57
Resultados de simulación del modelo matemático determinista en el software Matlab... ..	58
Análisis de resultados de simulación en Matlab:.....	59
Protocolo para la transformación del casete de expresión diseñado en <i>Pseudomonas fluorescens</i>	59
Protocolo de transformación de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	61
Capítulo V: Discusión	65
Capítulo VI: Conclusiones.....	73
Capítulo VII: Recomendaciones	75
Capítulo VIII: Bibliografía	76

Índice de Tablas

Tabla 1 Biobricks utilizados para el constructo genético de la proteína PbrA	47
Tabla 2 Datos teóricos para modelamiento de expresión constitutiva en plásmido pUC-19.....	51
Tabla 3 Materiales y reactivos para elaboración de células competentes	60
Tabla 4 Materiales y reactivos para la transformación de <i>P. fluorescens</i>	62
Tabla 5 Tratamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> con <i>P. fluorescens</i> en plántulas de tomate, % Incidencia de enfermedad y % Control de la enfermedad.....	63

Índice de figuras

Figura 1 Corte transversal de pseudotallo de banano y cultivo de <i>Musácea</i> infectada con FOGR4T	26
Figura 2 Representación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en medio de cultivo.	27
Figura 3 Circuito genético diseñado en programa Tinker cell.....	38
Figura 4 Cultivo de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en medio King B	39
Figura 5 Factores de transcripción involucrados en la síntesis de pioverdina	40
Figura 6 Vías reguladoras clave para la producción de pioverdina en respuesta a la falta de hierro.	42
Figura 7 Secuencia consenso de la caja Fur	44
Figura 8 Expresión constitutiva de gen PbrA	50
Figura 9 Secuencia del gen PbrA	54
Figura 10 Unión de Biobricks para formación de casete de expresión del gen PbrA	55
Figura 11 Constructo genético para la expresión constitutiva del gen PbrA.....	56
Figura 12 Constructo genético clonado en plásmido pUC-19 con ensamblaje tipo RFC10.....	57
Figura 13 Resultados del modelo matemático para transcripción constitutiva de gen PbrA	58
Figura 14 Inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> frente a sideróforos producidos por <i>P. fluorescens</i> en presencia de diferentes concentraciones de hierro.....	64

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxi ribonucleico
Bp	Pares de bases
°C	Grados centígrados
CDS	Secuencia codificante
CLA	Agar Clavel
FOC	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i> cubense</i>
FOCRT4	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i> cubense</i> raza tropical 4
G	Gramo
iGEM	International Genetically Engineered Machine
LB	Caldo Luria Bertani
L	Litro
mL	Mililitro
min	Minuto
mRNA	Ácido ribonucléico mensajero
mM	Mili molar
ng	Nanogramo
nmol	Nano mol
PDA	Agar papa dextrosa
PGPB	Bacteria promotoras de crecimiento vegetal

pH	Cantidad de iones de hidrógeno presentes en una solución.
QSSA	Aproximación quasi-estacionaria
RFC10	Ensamblaje estándar de la organización iGEM
RBS	Sitio de unión a ribosoma
RT4	Raza tropical 4
Seg	Segundos
ST4	Raza subtropical 4
SNA	Agar de Spezieller Nährstoff-farmer
T°	Temperatura
μL	Microlitro
μmol	Micromol

Resumen

La producción de banano en Ecuador es considerada base de la seguridad alimentaria del país y es el segundo producto más importante de exportación, solamente después del petróleo. Actualmente, este se encuentra amenazado por la fusariosis de banano, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), la cual es una enfermedad que ocasiona la muerte de la planta. Lamentablemente, no existe tratamiento efectivo, afectando a aproximadamente 12.3 millones de habitantes que dependen económicamente del cultivo de banano. Una alternativa ecológica y novedosa para enfermedades fúngicas es el biocontrol empleando *Pseudomonas fluorescens*. El objetivo de la presente investigación es el diseño de un biocontrol orientado en el hongo FOC, empleando *P. fluorescens* recombinante para la sobreexpresión del sideróforo pioverdina, el cual es un compuesto que secuestra el hierro cuando hay bajas concentraciones de este metal en el ambiente. Se diseñó un constructo genético para expresar constitutivamente PbrA, una proteína reguladora importante en la biosíntesis de pioverdina. En este sentido, se realizó un modelo matemático determinista para predecir la cantidad de proteína generada. La simulación fue ejecutada en Matlab generando 666 600 moléculas de PbrA en 8,33 horas. Siguiendo con la transformación de *P. fluorescens* se investigó protocolos de acuerdo a: la eficiencia de transformación evaluada en *Pseudomonas* sp., nivel de complejidad de trabajo, equipo a utilizar y tiempo empleado. Las investigaciones realizadas han demostrado el potencial de los sideróforos de *P. fluorescens* como biocontrol para FOC, suprimiendo el crecimiento en un 75%. En este sentido, la sobreexpresión del gen PbrA permitiría biosintetizar mayores cantidades de pioverdina, limitando la capacidad de crecimiento de FOC debido a la baja disponibilidad de hierro en el ambiente.

Palabras clave:

- **BIOCONTROL**
- **SIDERÓFOROS**
- **CONSTRUCTO GENÉTICO**

Abstract

Banana production in Ecuador is considered the basis of the country's food security and is the second most important export product, only after oil. It is currently threatened by banana fusarium blight, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), which is a disease that causes the death of the plant. Unfortunately, there is no effective treatment, affecting approximately 12.3 million people who depend economically on banana cultivation. An ecological and novel alternative for fungal diseases is biocontrol using *Pseudomonas fluorescens*. The objective of the present research is the design of a biocontrol oriented on the fungus FOC, using recombinant *P. fluorescens* for the overexpression of the siderophore pyoverdine, which is a compound that sequesters iron when there are low concentrations of this metal in the environment. A genetic construct was designed to constitutively express PbrA, an important regulatory protein in pyoverdine biosynthesis. In this sense, a deterministic mathematical model was performed to predict the amount of protein generated. The simulation was run in Matlab generating 666 600 PbrA molecules in 8.33 hours. Following with the transformation of *P. fluorescens*, protocols were investigated according to: transformation efficiency evaluated in *Pseudomonas* sp., level of complexity of work, equipment to be used and time employed. The research carried out has demonstrated the potential of *P. fluorescens* siderophores as a biocontrol for FOC, suppressing growth by 75%. In this sense, overexpression of the PbrA gene would allow biosynthesizing greater amounts of pyoverdine, limiting the growth capacity of FOC due to the low availability of iron in the environment.

KEYWORDS

- **SIDEROPHORES**
- **BIOCONTROL**
- **GENETIC CONSTRUCT**

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

En América Latina, el consumo de banano representa entre 90 y 95 millones de toneladas al año. La presencia de una enfermedad fúngica ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, podría llegar a afectar a 12.3 millones de habitantes que viven directamente del cultivo de banano (Sotomayor, 2012).

En Ecuador, la producción y comercialización de banano juega un papel importante ya que representa el segundo producto más significativo después del petróleo. Existen aproximadamente 163.960 hectáreas de producción de banano en las provincias de Guayas, Los Ríos y El Oro, mientras que la mayor producción de plátano se localiza en El Carmen, provincia de Manabí (Agrocalidad, 2013). Desde el primer brote de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) raza tropical 1 en Ecuador, este hongo ha afectado a 170 mil hectáreas de la variedad Gros Michel (Saltos, 2019).

Hoy en día, es un hecho que la producción ecuatoriana de banano se encuentra amenazada por una nueva raza de FOC, denominada raza tropical 4. Se hace necesario resaltar la inexistencia de variedades de banano resistentes a esta nueva cepa; únicamente se requiere una planta infectada con el hongo para diseminar la infección a todas las existentes a su alrededor (Palou, 2019).

La infección por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* se caracteriza por la marchitez vascular de las plantas infectadas ocasionando estancamiento de los vasos del xilema, entonces el agua y los nutrientes no son accesibles en la planta generando su muerte (Siamak & Zheng, 2018).

Debido a que el hongo es difícil de tratar, se espera la llegada inminente de la nueva raza RT4 al país. Se han tomado algunas medidas preventivas como la aplicación de antifúngicos en las plantas, siembra con semillas sanas y campos libres del patógeno (López & Zapata, 2019).

También se ha enfatizado en las medidas de control y prevención brindado por el Manejo Integrado de Enfermedades (MIE) en el que se encuentran los principios de erradicación del patógeno, escape de la infección, desarrollo y uso de la resistencia genética, protección de las plantas y reducción de la incidencia de la enfermedad (Castaño, 2009).

Justificación del problema

La producción de banano en Ecuador se considera base de la seguridad alimentaria del país y una fuente importante generadora de empleo y divisas a través de su exportación (Molina & Gavilanes, 2017). Sin embargo, actualmente existe la amenaza de la fusariosis de banano, producida por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC), la cual ya ha llegado a la región suramericana. En Ecuador, las condiciones ambientales y la siembra en monocultivo clonal del banano, presentan un escenario excepcional para el desarrollo de la enfermedad.

A pesar de lo mencionado, al momento no existen medidas efectivas de control químico para el marchitamiento del banano (causado por FOC) de las variedades producidas en Ecuador, como son: Gros Michel, Cavendish, entre otros (Parducci, 2019). En un intento de controlar este patógeno, se ha considerado emplear fungicidas sintéticos. Sin embargo, el uso de fungicidas es un serio problema debido a la acumulación de compuestos químicos en el ecosistema y, sobre todo, porque trae consecuencias en el desarrollo de cepas fúngicas resistentes (Siamak & Zheng, 2018).

Estudios como los de Pérez et al., (2015), han demostrado que una solución alternativa para el control de la enfermedad puede darse a través de biocontroles, los cuales se refieren a las interacciones entre microorganismos antagonistas y patógenos de plantas. Son de naturaleza generalizada y pueden utilizarse para controlar o reducir enfermedades fúngicas de plantas. Adicionalmente, los biocontroles han sido de gran interés en los últimos años en el control de enfermedades como la del *Moko* y *Sigatoka negra* en cultivos de banano (Garrido, 2013), que tienen una sintomatología similar a la del FOC (Dita, 2020).

En el uso conveniente de biocontroles para enfermedades fitopatógenas, Álvarez (2019), sugiere la combinación de agentes de biocontrol, en mezcla con fungicidas químicos, permitiendo reducir la cantidad de fungicida a aplicarse, significando una disminución de los efectos negativos que los controles químicos, puedan causar a la planta.

Estos dos tratamientos (biocontroles y fungicidas) pueden utilizarse de manera intercalada. En tal sentido, el control biológico ofrece una alternativa ecológica al pesticida químico para el manejo sostenible de enfermedades en plantas. Entre los tipos de biocontroles existentes se encuentran las bacterias *Pseudomonas*, usadas para enfermedades fúngicas debido a su metabolismo adaptativo y su capacidad para producir una gama de compuestos antifúngicos (Santacruz, 2012). Este género bacteriano constituye un ejemplo de antagonismo directo e inducción de resistencia en la planta, frente a fitopatógenos generando un efectivo control biológico (Pérez et al., 2015).

Entre las especies más reconocidas para proteger a las plantas de infecciones fúngicas están: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* (Islam et al., 2018). Específicamente *P. fluorescens* es de interés, en el campo del control biológico por promover el crecimiento vegetal y suprimir el crecimiento de patógenos de raíz.

Las *Pseudomonas* son conocidas como bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR), muy utilizadas en diferentes cultivos para prevenir la introducción de enfermedades (Pérez et al., 2015). Estas bacterias producen metabolitos como sideróforos y bacteriocinas, los cuales participan en el biocontrol de diversos fitopatógenos (Sivamani & Gnanamanickam, 1987).

Particularmente, los sideróforos bacterianos han despertado interés científico en los últimos años (Santacruz et al., 2012), ya que se ha propuesto que estos compuestos pueden secuestrar el hierro del ambiente rizosférico, impidiendo que esté disponible para los patógenos. Así, las *Pseudomonas fluorescens* que sintetizan sideróforos tendrán ventajas para ocupar nuevos espacios, desplazando la microbiota patógena del suelo (Santoyo et al., 2010).

En este sentido, Valencia et al. (2005), menciona que los sideróforos producidos por *Pseudomonas fluorescens* inducen resistencia sistémica de la planta como mecanismo de defensa frente a varios patógenos. Por ejemplo, los sideróforos han sido efectivos como control de la enfermedad de marchitamiento del rábano, causado por el hongo del género *Fusarium*, como también para el patógeno de la podredumbre del carbón *Alternaria* sp., (Sumei Yu, 2017). Sin embargo, debido a la incapacidad de producción de esporas de *Pseudomonas* sp. se ha limitado su estudio para fines comerciales (Pérez et al., 2015).

Por tal motivo, mediante la implementación de Biología Sintética, una ciencia que consiste en la modificación de sistemas biológicos naturales para usos prácticos útiles (Morange, 2008), se pretende diseñar genéticamente a *Pseudomonas fluorescens*, con el objetivo de mejorar la vía metabólica de síntesis de sideróforos para su efecto inhibitorio en *F. oxysporum* (Peng Xu et al., 2012).

Objetivos

Objetivo General

Diseñar 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.

Objetivos Específicos

- Diseñar un casete de expresión que potencie la producción de sideróforos en *Pseudomonas fluorescens*.
- Desarrollar un modelo matemático capaz de predecir la sobreexpresión de sideróforos en *Pseudomonas fluorescens*.

- Definir un protocolo para la transformación del casete de expresión diseñado en *Pseudomonas fluorescens*.
- Inferir, con base en la evidencia científica disponible, el efecto de sideróforos de *Pseudomonas fluorescens* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Capítulo II: Marco teórico

Genero *Fusarium*

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos considerados oportunistas debido a su capacidad de crecer a 37°C y amplia distribución en suelo y plantas. Existen más de 100 especies de *Fusarium* descritas y solo 12 se consideran patógenas para el humano (EcuRed contributors, 2020). Debido a la complejidad taxonómica de *Fusarium*, Tapia & Amaro (2020), recalcan que para una correcta clasificación del género, se requiere de la experiencia del observador al microscopio. Tomando en cuenta características como: “largo, ancho, curvatura, septos, esporodoquios y detalles de la célula (apical y pie) de los macroconidios” (Tapia & Amaro, 2020).

El crecimiento *in vitro* de *Fusarium* no presenta mucha complejidad y existen varios medios de crecimiento como: agar papa dextrosa (PDA), agar Sabouraud, agar Clavel (CLA), agar de Spezieller Nährstoff-farmer (SNA) y agar avena. Hay algunos medios como el agar PDA y Sabouraud que permiten observar el diámetro de la colonia, morfología y pigmento (café, rojo, violeta, naranja, gris, blanco) (Hernández et al., 2019).

Características de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Fusarium oxysporum es una especie de hongo saprófito causante de la fusariosis de banano o “Mal de Panamá” en cultivos de plátanos y bananos. Generalmente ingresa a la planta por la raíz y posee tres tipos de esporas capaces de resistir 40 años en el suelo (Martínez, 2012). El crecimiento del hongo se favorece en climas cálidos-húmedos.

Logra esparcirse dentro de la planta y por aire. Su mecanismo de infección es mediante el ingreso del micelio a la planta impidiendo el flujo normal de savia, produciendo marchitez y muerte de los cultivos infectados (EcuRed contributors, 2020).

Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (FOC) es originario del sudeste de Asia. En la actualidad, se ha identificado cuatro razas, FOCR1, FOCR2, FOCR3, FOCRT4, FOCST4. Cada una afecta a diferentes variedades de banano y plátano como se muestra a continuación (Saltos, 2019).

Raza 1: Gros Michel y Manzano (AAB)

Raza 2: cultivos como Guineo, Topocho, Chatos (ABB)

Raza 3: Heliconias (*Heliconia* L.)

Raza 4: Cultivos resistentes a las razas 1, 2 como el tipo Cavendish.

Dentro de la raza 4, se ha identificado la raza tropical (RT4) y la subtropical (ST4). La primera, causa enfermedad en trópicos y subtrópicos y, la segunda, solo en el subtrópico (López & Zapata, 2019)

Síntomas

Uno de los primeros síntomas generalmente es el amarillamiento en las hojas que va progresando hacia la parte superior de la misma. Las hojas adultas se tornan amarillas y gradualmente avanzan hacia las hojas jóvenes. Estas se marchitan y permanecen adheridas a la planta. Las raíces principales y la base del tallo presentan necrosis vascular (EcuRed contributors, 2020).

Otro síntoma muy común es el síndrome de la hoja verde, en el que las hojas aparecen verdes hasta que el peciolo se dobla y colapsa. La evidencia de sintomatología se da entre 5-6 meses luego de la infección, caracterizado por la muerte de las plantas y pérdida de producción (López & Zapata, 2019).

Ciclo de la enfermedad

En cultivares susceptibles, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* penetra la planta directamente por la cofia de la raíz, la infección es favorecida por la estimulación de las esporas del hongo a partir de compuestos orgánicos liberados por la raíz de la planta (Koppert, 2020).

Con la ayuda de algunas enzimas degradativas o el mismo crecimiento intercelular, se procede a la colonización de la planta iniciando por el ápice de la raíz y avanzando por todo el tejido vascular, ocasionando la sintomatología mencionada (Dita, 2020).

Figura 1

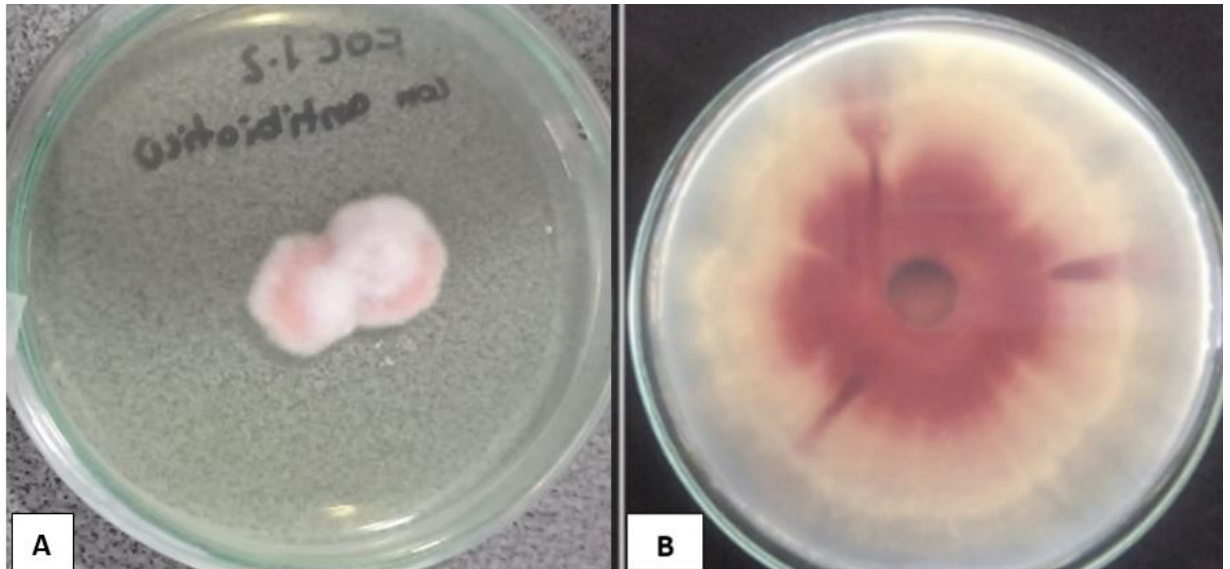
Corte transversal deseudotallo de banano y cultivo de Musácea infectada con FOCR4T



Nota: A) Planta sana, seudo tallo blanco y haces vasculares uniformes B) Necrosis continua de haces vasculares y seudotallo, coloración se torna café debido a la infección C) Cultivo joven de orito (Pisang Mas, AAA) amarillamiento, necrosis y hojas cerrada en forma de paraguas. Tomado de Dita, M. (2020). *Jornada Fitosanitaria*. Obtenido de Marchitez por Fusarium de las Musáceas: <https://www.oirsa.org/>

Figura 2

Representación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en medio de cultivo.



Nota: A) Colonias de crecimiento rápido, crecimiento aproximado de 7 días, diámetro de 2cm. B) FOC produce micelio de color blanco y con el tiempo se va creando un fondo rojizo en forma elíptica. Tomado de Dita, M. (2020). *Jornada Fitosanitaria*. Obtenido de Marchitez por *Fusarium* de las Musáceas: <https://www.oirsa.org/> Gaona, V. iGEM-Ecuador. (2021). *Fusarium oxysporum R1 inoculado en medio PDA*. Quito.

Manejo de la enfermedad

A pesar de las diferentes prácticas desarrolladas para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, este hongo posee estructuras de resistencia que complican el tratamiento de control con fungicidas sistémicos, de hecho, los productos químicos son una amenaza debido al aumento de la resistencia del patógeno (Bravo, Larriva, & Minchala, 2012).

El manejo de la enfermedad para todas las razas de FOC, incluida R4T, incluyen principalmente disminuir el inóculo inicial considerando aspectos como: aplicación de fumigantes, delimitación de áreas de acceso y eliminación de plantas infectadas (Manosalvas, 2010).

El aislamiento en forma de cuarentena es uno de los factores que más eficacia tiene en los “planes nacionales de FOCCR4T” generado por varios países de la región, como Colombia, Perú, Ecuador y Panamá. Este mecanismo constituye la primera barrera ya que, una vez introducido el patógeno en los cultivos, su erradicación es imposible (FAO, 2020).

La vigilancia constante es fundamental para detectar sintomatología temprana y aislar focos de la enfermedad. Todas estas medidas deben ser coordinadas entre trabajadores, productores, exportadores e importadores mediante la comunicación continua y cooperación entre instituciones gubernamentales involucradas (Aneberries, 2018).

Es muy importante considerar expertos en el área como especialistas en micología, para evitar los falsos positivos e identificar correctamente el patógeno y, sobre todo, investigadores para mejorar el desarrollo de técnicas de diagnóstico más eficientes (Vásquez & Castaño, 2017).

La regulación sobre el material de propagación del hongo, tránsito de material infectado y la llegada de personas extranjeras donde el hongo ya se encuentra posicionado deben ser estrictamente controlados. Con el fin de ayudar a la implementación de estrategias de manejo más eficientes para la enfermedad y control sobre una posible llegada de FOCCR4T al país (López & Zapata, 2019).

Pseudomonas fluorescens

P. fluorescens, es una especie se puede encontrar en varios ambientes, acuáticos y terrestres. Son bacilos Gram-negativos ligeramente curvados, sus condiciones óptimas de crecimiento consisten en temperatura de 25-30°C, aunque también resisten hasta 42°C y pH neutro; no crecen en ambientes ácidos (Sivamani & Gnanamanickam, 1987).

La fluoresceína es el pigmento característico de esta especie. Sin embargo, cuando el cultivo es muy antiguo o muy reciente, la bacteria no muestra su fluorescencia característica (Pérez et al., 2015).

Por ser identificadas como biocontroladoras de fitopatógenos, se clasifican en el grupo de Bacteria Promotoras del Crecimiento Vegetal (PCGB), debido a la producción de metabolitos secundarios o incrementando resistencia natural de la planta frente a patógenos. Algunos de los beneficios que produce esta especie son: síntesis de fitohormonas, fijación biológica de nitrógeno y promueve crecimiento radicular (Sumei Yu et al., 2017).

Gen

El gen es la unidad básica de la herencia, algunos producen proteínas y están formados por ADN. Cada gen es diferente y varían en tamaño de acuerdo a la cantidad de nucleótidos conformados. Los alelos de un mismo gen presentan pequeñas diferencias en la secuencia de ADN, las diferencias dan paso a distintas características en el fenotipo resultante (MedlinePlus, 2020).

Promotor

En la regulación genética, un promotor es una secuencia de ADN a la que se une la ARN polimerasa y se ubica a una distancia específica aguas arriba del inicio de la transcripción (World Library of Science, Glossary Promoter, 2020).

Sitio de unión a ribosoma (RBS)

El Sitio de unión a ribosoma es una secuencia de ARN que se encuentra en el ARNm mensajero para que los ribosomas se unan e inicien la traducción. La secuencia de RBS generalmente se localiza a seis nucleótidos cadena arriba de un codón de inicio en el ARNm. El RBS debe estar antes de la secuencia que será traducida. La traducción empieza desde el codón de inicio y continúa aguas abajo por toda la secuencia del gen (iGEM Organization, Parts iGEM, 2020).

Secuencia codificante (CDS)

La región de codificación de un gen o CDS por sus siglas en inglés, es una secuencia de nucleótidos que corresponde a una secuencia de aminoácidos en la formación de una proteína. Empieza por un codón de inicio ATG y termina con un codón de parada. Un CDS también puede ser un subconjunto de un marco de lectura (ORF) (Masaaki Furuno et al., 2003).

Terminador

El fin de la transcripción es el paso final de la expresión génica y se da gracias a una secuencia de nucleótidos que juegan un rol importante en la terminación de un ARN sin afectar la expresión génica (Cramer, 2013). Existen dos categorías de terminadores en procariontes, independientes de rho y dependientes de rho (World Library of Science, 2020).

Los más comunes y utilizados son los independientes de rho, compuestos por una secuencia palindrómica rica en “GC” seguido de varias bases “T” que formarán un bucle para dar por finalizada la transcripción (iGEM Organization, Parts iGEM, 2020).

Plásmido

Un plásmido es un molécula de ADN de doble hebra diferente al ADN cromosómico, existen naturalmente en bacterias y en algunos eucariotas. Sirven como transportadores de genes que proporcionan ventajas genéticas a los hospederos, como la resistencia a antibióticos (Green, 2020).

En la división celular, los plásmidos se copian de manera que cada célula hija recibe una copia de cada uno también pueden transferirlos mediante la conjugación (Monroe, 2014).

Los plásmidos son ampliamente utilizados como herramientas de clonación y manipulación genética o más conocidos como vectores. En los vectores se insertan fragmentos de ADN y el plásmido recombinante es insertado en bacterias mediante un proceso denominado transformación celular con el objetivo de que las bacterias sirvan como fábricas de expresión del gen insertado (Scitable, 2020).

Ensamblaje molecular RFC10

BioBrick RFC 10 fue desarrollado por Tom Knight. Este ensamblaje es un estandar que funciona mediante el uso de prefijo y sufijo que aseguran compatibilidad entre piezas de ADN, creando nuevas piezas más largas y complejas.

El prefijo y sufijo poseen sitios de restricción, utilizados con enzimas de restricción específicas y ADN ligasa, permitiendo unir piezas de ADN (Knight, 2003). Las especificaciones técnicas constan de una secuencia denominada prefijo, ubicada al inicio del constructo genético, posee sitios de restricción para EcoRI, NotI y XbaI. Al finalizar el constructo genético, se debe colocar la otra secuencia consenso denominada sufijo, con sitios de restricción para SpeI, NotI y PstI. El Biobrick RFC10 es bien probado y documentado (Knight et al., 2020).

Las cicatrices o SCARS son pequeñas secuencias que deja este tipo de ensamblaje al momento de unir las piezas de ADN. Existen dos tipos, la primera cicatriz TACTAGAG, siempre se coloca entre dos partes ADN.

SCAR 1: 5' [part A] TACTAGAG [part B] 3'. La cicatriz número dos se utiliza únicamente entre el RBS y la región codificante de la proteína. SCAR2: 5' [RBS] TACTAG [CDS] 3' (Knight, 2003).

Transcripción

Para iniciar con la transcripción, un gen debe estar compuesto por la parte de ADN a transcribir y regiones reguladoras para que el proceso se desarrolle correctamente. La polimerización de ribonucleótidos es catalizada por la enzima ARN Polimerasa. El ADN se separa y la cadena 3'-5' es la indicada como molde para la polimerización (Clancy & Brown, 2008).

El punto de crecimiento empieza en el extremo 3' y continúa a medida que la ARN polimerasa se mueve a lo largo de la región transcrita. Finalmente, la transcripción de ARN se desprende del ADN y el proceso se repite múltiples veces a partir de un gen (Augustyn, 2019).

La transcripción constitutiva de un gen se da porque los genes siempre están activos, es decir que su transcripción debe ser continua ya que la célula así lo requiere. Sin embargo, la transcripción se vuelve iducible cuando los genes no necesitan ser transcritos todo el tiempo, únicamente para algunas actividades de la célula (Sarge et al., 1991).

La transcripción de genes es regulada por la unión de proteínas al promotor, favoreciendo o reprimiendo a la ARN polimerasa y, por lo tanto, la transcripción del gen. Estas proteínas se las conoce como “proteínas reguladoras de genes” dependiendo del desempeño al momento de la transcripción. Se pueden unir a más de un gen y así controlar simultáneamente la actividad transcripcional (Gandhi, Zenklusen, & Singerobert, 2018).

Modelo matemático determinista

Al modelar matemáticamente seres vivos, las reacciones dentro de las células pueden representar modelos estocásticos (se toma en cuenta la naturaleza probabilística de las reacciones) o determinísticos, que en su lugar consideran la cantidad de moléculas transformadas para cada especie química, velocidades y estequiometría de reacción (Picó et al., 2015).

Los modelos matemáticos determinísticos son una subclase de sistemas polinomiales de ecuaciones diferenciales. Su aplicación se puede desarrollar en modelos dinámicos y en modelos continuos (Artzrouni, 2005).

Se ha observado que en modelos dinámicos su aplicación ha sido muy útil debido a que son sistemas que evolucionan con el tiempo. Una vez entregados los distintos parámetros que aparecerán en el modelos, se puede conocer el

estado transcurrido del sistema cada cierto tiempo (Aerts, Reniers, & Mousavi, 2017).

Los modelos continuos se aplican cuando se observa que el sistema presenta continuidad en el tiempo y, en este caso, el uso de ecuaciones diferenciales, ayudan a deducir cómo cambian las propiedades del sistema biológico al variar parámetros (Universidad de Jaén, 2009). En conclusión, las matemáticas aplicadas en modelos deterministas son :

- Ecuaciones diferenciales (ordinarias y parciales)
- Teoría de bifurcaciones
- Análisis numérico
- Ecuaciones en diferencias.

Aproximación quasi estacionaria

Las aproximaciones Quasi estacionarias (QSSA) por sus siglas en inglés, consideran la separación de escalas temporales entre las diferentes dinámicas del sistema. En los modelos bioquímicos se puede aplicar QSSA para obtener relaciones algebraicas entre estados de un sistema (Picó et al., 2015).

Se considera a esta técnica como métodos de perturbaciones singulares o colección de métodos para obtener soluciones analíticas aproximadas de ecuaciones algebraicas o diferenciales, en las que se incluye un parámetro pequeño ϵ . En la teoría de perturbaciones se pretende reducir un problema difícil a uno más fácil (Vega de Prada & Liñán, 2016).

En sistemas biológicos generalmente el parámetro ϵ está definido en un intervalo:

$$I = (0, \epsilon_0)$$

$$F = (x, \epsilon) = 0$$

Donde x es la variable real y resolviendo la función se obtiene una solución perturbada, es decir, la solución de la ecuación es:

$$F = (x, 0) = 0$$

Esta demostración es brindada por el teorema fundamental de la teoría de perturbaciones que indica que cuando $\epsilon \rightarrow 0$ y $P(x(\epsilon)) = 0$, entonces $A_i = 0$.

En la práctica se usa la teoría de perturbaciones para verificar resultados numéricos o para darle el primer paso en la resolución de un método numérico. (Sánchez et al., 2004).

La dinámica de las reacciones de enlace en procesos moleculares se suele asumir como muy rápidas, en comparación con las reacciones de elongación y degradación (Picó et al., 2015).

Con esta herramienta se busca que las relaciones algebraicas no varíen en el sistema, es decir que, en un sistema de reacciones la combinación lineal de los estados del sistema será constante en el tiempo. A este tipo de combinaciones lineales, que representan las concentraciones en la reacción se las conoce como quasi- especies invariantes (Campos, 2017).

Células competentes y transformación celular

Las células competentes son aquellas que tienen la capacidad de absorber ADN extracelular de su entorno. Existe competencia natural y celular. La natural está determinada genéticamente, es decir que la célula tiene predisposición a tomar material genético libre (BioLabs, 2021).

En la competencia natural, el ADN tomado no siempre se incorpora en el genoma de la célula. Generalmente el ADN incorporado es utilizado con fines nutricionales. La manera en el que el ADN es utilizado, depende de las necesidades celulares. El estado de competencia natural no es constante, la regulación natural de estado de competencia y transformación a menudo ocurre por señales ambientales y bioquímicas (Martin, 2021).

La competencia artificial es inducida mediante técnicas como electroporación o competencia química. Esta herramienta ha sido utilizada por científicos para clonar, introduciendo nuevo material genético en una célula. El organismo más utilizado y con mejores resultados para realizar clonación artificial es *Escherichia coli* aunque esta especie no sea naturalmente competente (Martin, 2021).

La transformación bacteriana es el proceso mediante el cual se introduce ADN extraño en una célula. Este mecanismo se realiza a través de plásmidos, en tal sentido, las bacterias sirven como maquinaria biológica para almacenar y replicar plásmido. Poseen un origen de replicación bacteriano y un gen de resistencia a antibióticos para su uso como marcador seleccionable en bacterias. (Green & Sambrook, 2020).

Los científicos han realizado muchas modificaciones genéticas para crear cepas bacterianas que se pueden transformar con mayor facilidad y ayuden a mantener estable el plásmido (Higuchi, Morisaki, & Numata).

Además, se han descubierto tratamientos específicos que aumentan la eficiencia de la transformación y hacen más susceptibles a las bacterias a la transformación química o eléctrica, generando lo que comúnmente se conoce como "células competentes" (Betancor et al., 2012).

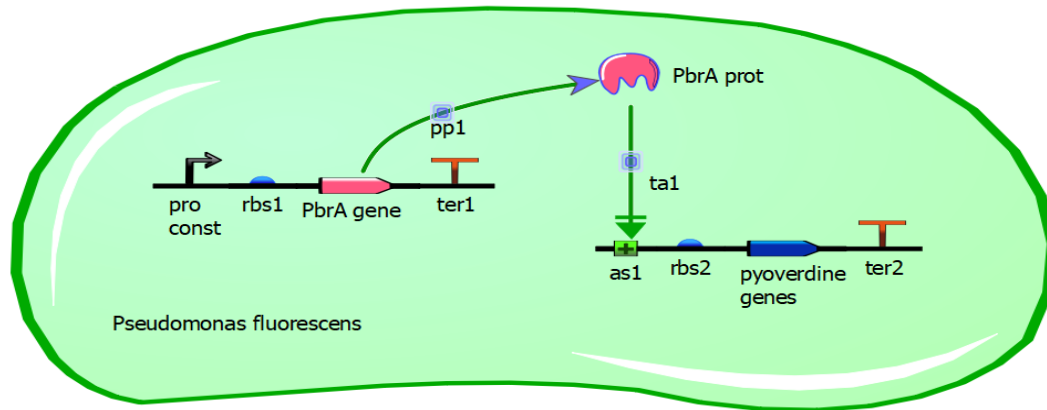
Factor de transcripción PbrA

El gen PbrA, por sus siglas en inglés (*Pseudobactin regulation activation*), es parte de la familia de reguladores transcripcionales ECF (función extracitoplasmática). Su secuencia de aminoácidos muestra dominios con homología significativa con varios reguladores transcripcionales de la familia del factor sigma σ^{70} , una clase de reguladores transcripcionales ambientalmente sensibles. Cada factor ECF controla un regulón en respuesta a señales ambientales extracelulares específicas. PbrA es un regulador de la activación de genes para la biosíntesis de sideróforos fluorescentes en *Pseudomonas* (Sexton et al., 1995 a).

Según Ambrosi et al. (2005), ECF es un factor sigma necesario para la expresión de genes de biosíntesis de pioverdina, también denominadas pseudobactinas y otros genes relacionados con la virulencia. Las secuencias cadena arriba del gen PbrA sugieren que la transcripción de PbrA puede estar regulada por hierro (Ringel & Brüser, 2018).

Figura 3

Circuito genético diseñado en programa Tinker cell



Nota: Diseño de circuito genético para la expresión de gen PbrA. El circuito genético está diseñado para producir la proteína PbrA, que es un activador de la transcripción de genes para la síntesis del sideróforo pioverdina. El casete de expresión está constituido por un promotor constitutivo, sitio de unión a ribosoma, secuencia codificante del gen PbrA y un terminador de la transcripción representado en un sistema de expresión bacteriano (*Pseudomonas fluorescens*).

Sideróforos

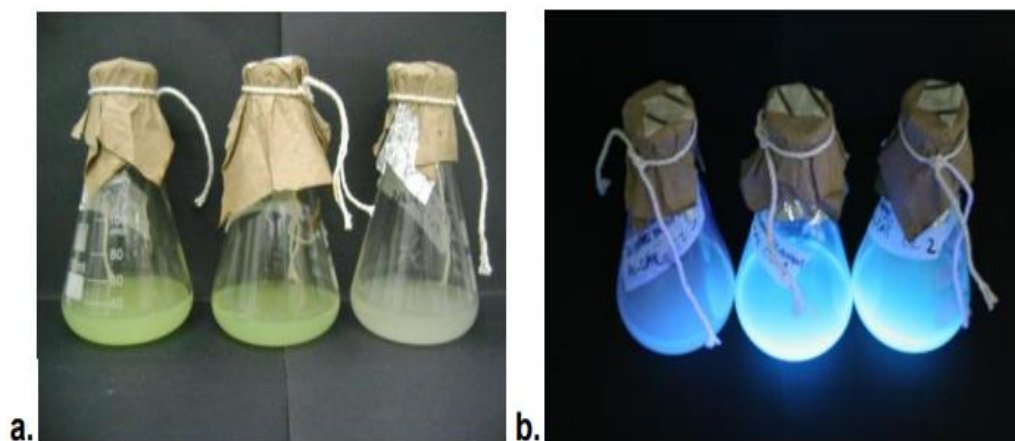
Los sideróforos son quelantes que se encuentran naturalmente en algunas bacterias, producidos mayoritariamente en condiciones limitantes de hierro. La palabra sideróforo, proviene del griego que significa "portador de hierro". Poseen bajo peso molecular (400 a 1000 kDa) y tienen alta afinidad por el hierro (Yanes, 2020).

Estos compuestos, se pueden clasificar en catecolatos, fenolatos, hidroxamatos (o carboxilatos) y los tipos mixtos (Saha et al., 2012). La pioverdina del tipo mixto (hidroxamatos-catecolatos) (Yanes, 2020), es el principal sideróforo

sintetizado por especies de *Pseudomonas fluorescens*, su color es verde en el medio de cultivo y, bajo irradiación ultravioleta, se puede observar su fluorescencia.

Figura 4

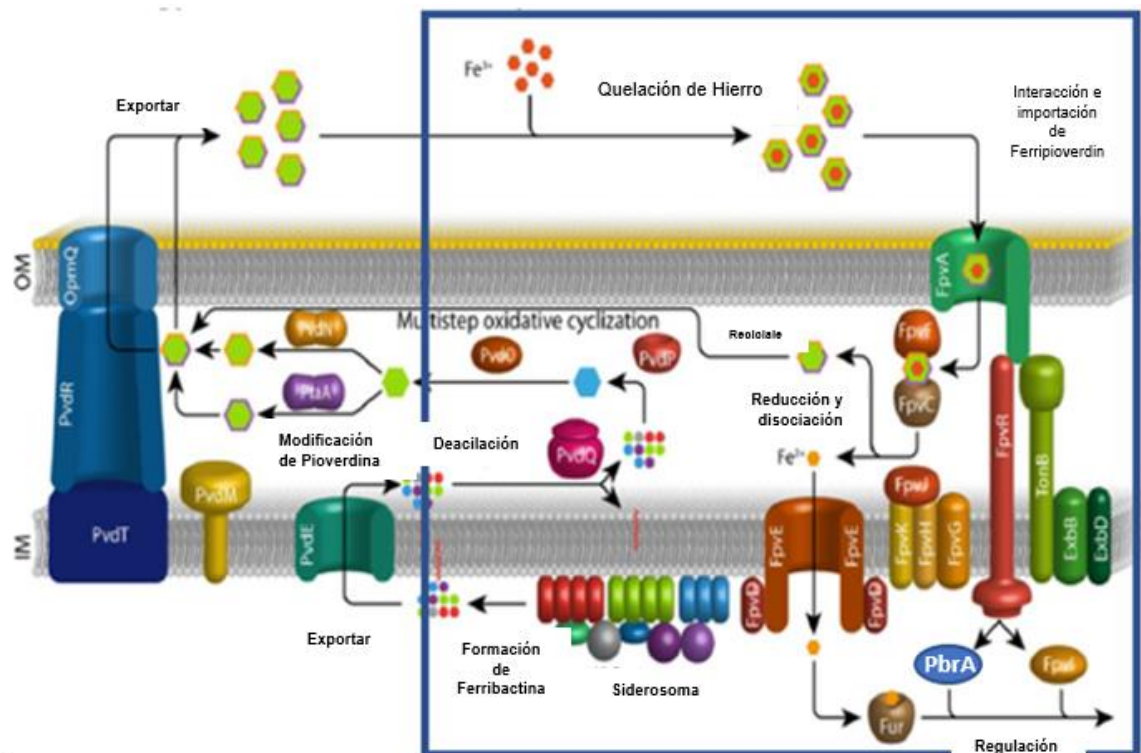
Cultivo de Pseudomonas fluorescens en medio King B



Nota: a) La pigmentación verde es por la producción de pioverdinas. b) Exposición del medio de cultivo a luz UV para la observación de fluorescencia Tomado de Venner, C., & Hernández, M. J. (2009). *AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EN CULTIVOS DE UCHUVA (Physalis peruviana L.) CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA FRENTE A Fusarium sp.* Obtenido de Repositorio UniversidadJaveriana:<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8471/tesis435.pdf>

Figura 5

Factores de transcripción involucrados en la síntesis de pioverdina



Nota: La quelación forma el complejo ferrioverdina que es importado hacia el citoplasma para ser utilizado por la célula en forma de hierro y también ser reciclado para la formación basal de ferrioverdina, necesario para la regulación de genes involucrados en la biosíntesis de pioverdina. La regulación mediada por Fur inicia cuando detecta iones de hierro en el citoplasma y reprime los genes implicados en la absorción de hierro como los que codifican las proteínas reguladoras FpvR, FpvI y PbrA. PbrA es un factor sigma necesario para la expresión de genes de biosíntesis de pioverdina, FpvI es un factor sigma necesario para los genes que codifican el importador de pioverdina. FpvA, y FpvR se unen e inactivan a PbrA y FpvI. Tomado de Ringel, M., & Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microbial Cell*. doi:10.15698/mic2018.10.649.

Regulación de la producción de pioverdina

La falta de hierro y el regulador Fur son la señal clave para la producción de pioverdina. El regulador Fur está involucrado en la represión dependiente del hierro de varios genes ya que detecta los iones de hierro ferroso en el citoplasma y reprime los genes implicados en la absorción y codificación de hierro (Ambrosi et al., 2005). Se encuentra en varias especies de *Pseudomonas* sp. como en la especie *fluorescens* en la cual la proteína Fur reprime la expresión del gen PbrA (Visca et al., 2007).

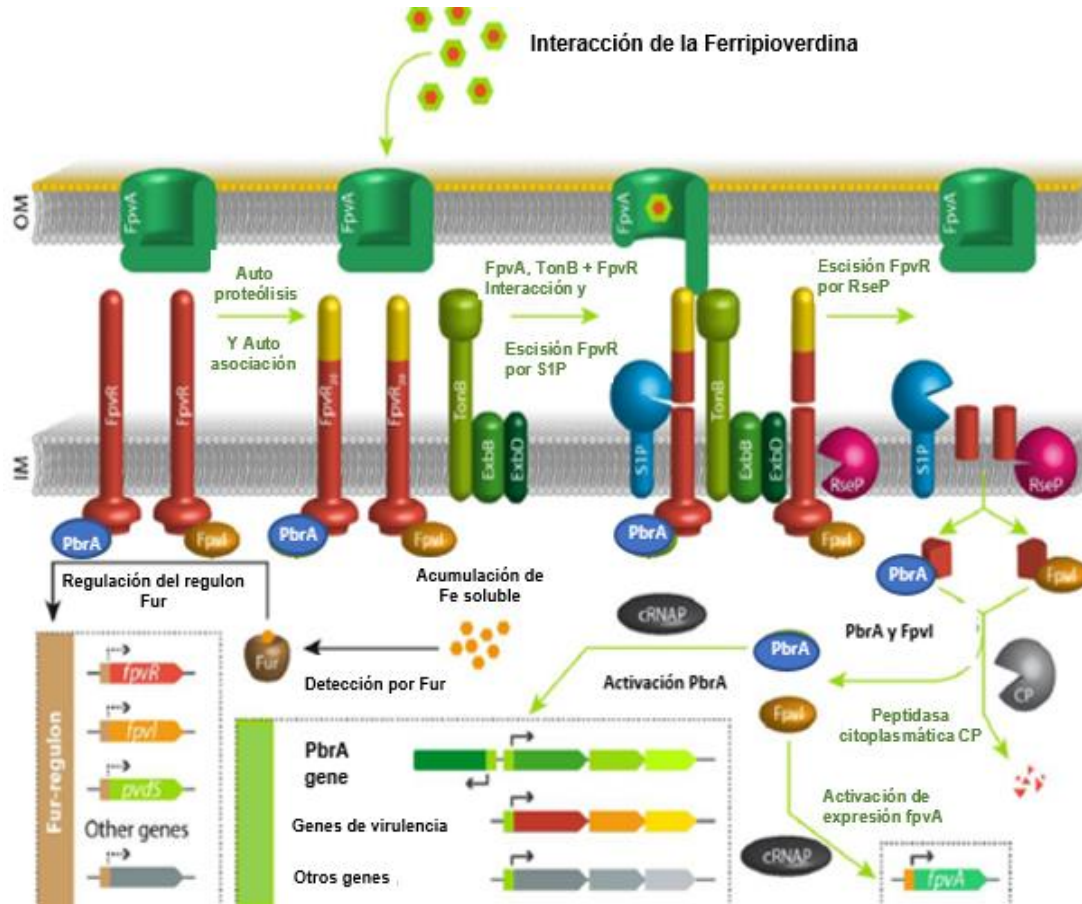
PbrA en *Pseudomonas fluorescens*, PvdS en *Pseudomonas aeruginosa*, PfrI y PupI de *Pseudomonas putida* y Fecl de *Escherichia coli*, están controlados por el represor Fur y activan la transcripción de genes para la biosíntesis o la captación de sideróforos (Leoni et al., 2000).

Para la biosíntesis de pioverdina es necesaria una concentración inicial del ferripioverdina. Ver Figura 5. La expresión basal es necesaria para la vía de detección dependiente de pioverdina, si no hubiese esta concentración inicial, el sistema se ajustaría a un nivel basal de expresión génica dependiente de PbrA y Fpvl (Ringel & Brüser, 2018).

Es importante enfatizar que las vías reguladoras para la producción de pioverdina juegan papeles importantes más allá de la producción de pioverdina (Moon et al, 2008). Por ejemplo, el regulón PvdS en *P. aeruginosa* es el gen regulador en la biosíntesis de pioverdina, pero también puede contribuir en la virulencia de esta especie (Rédly & Poole, 2003).

Figura 6

Vías reguladoras clave para la producción de pioverdina en respuesta a la falta de hierro.



Nota: Fpvi es un factor sigma necesario para los genes que codifican el importador de pioverdina en la membrana externa FpvA, y FpvR son factores anti-sigma que se une e inactivan PbrA y Fpvi. FpvR se escinde si no entra en contacto con FpvA unido a ferritioverdina. Cuando se produce este contacto FpvR / FpvA, que implica la actividad de TonB (proteína de la membrana interna que energiza el transporte), otros eventos proteolíticos que involucran a la proteasa RseP dan como resultado la liberación de PbrA y Fpvi y la activación de sus genes reguladores. Tomado de Ringel, M., & Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microbial Cell*. doi:10.15698/mic2018.10.649.

Proteína Fur

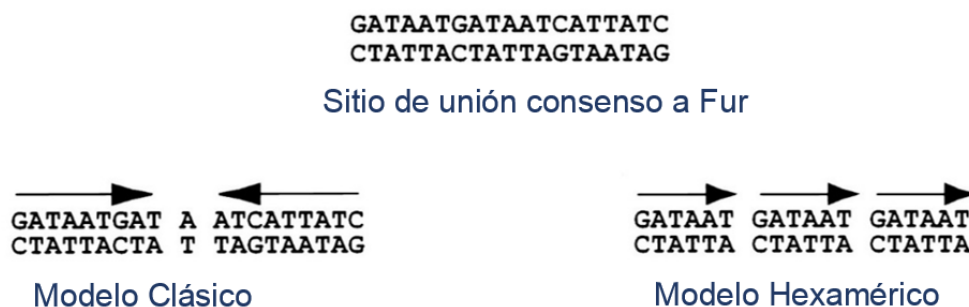
La proteína Fur es un represor transcripcional y su correpresor es el ion ferroso. Cuando los niveles de hierro exceden los requeridos para las funciones celulares, Fur reprime una mayor absorción de hierro para prevenir la sobrecarga de hierro y toxicidad (Troxell & Hassan, 2013).

En presencia de iones ferrosos, Fur se une a la “Caja de hierro”, una secuencia de ADN conservada ubicada dentro de las regiones promotoras de genes regulados por hierro (Kaushik et al., 2015).

Baichoo & Helmann (2002) mencionan que la "Caja Fur" de *E. coli* tiene una secuencia consenso de GAT AATGATAATCATTAT C. Sin embargo, esta secuencia exacta rara vez se encuentra en otros procariontes. De hecho, se ha sugerido que el reconocimiento mínimo de la unión al hierro es GATAAT. Cabe recalcar que la “Caja Fur” puede ser muy variable, incluso en genes de una bacteria determinada. Por citar algunos ejemplos, la secuencia de la caja Fur en genes como *peID* y *peIE* de *Erwinia chrysanthemi* son GATAAAATTAATCAGCCTC y ATTAATAAAAACCATGTC, respectivamente, demostrando las diferentes secuencias en genes de una misma especie (Kipngetich et al., 2017).

Figura 7

Secuencia consenso de la caja Fur



Nota: Se muestra el sitio de unión Fur consenso de 19 pb para *E. coli* y varios modelos de reconocimiento. La secuencia superior muestra el sitio de unión de Fur. La secuencia inferior izquierda muestra el modelo clásico de unión en el que cada monómero se une a una repetición invertida de 9 pb (mostrada como flechas) del consenso. La secuencia inferior derecha muestra el modelo hexámero, también descrito, siendo la unidad de reconocimiento la secuencia 5'-GATAAT-3' (mostrada como flechas). Es incierto cómo Fur uniría esta secuencia; algunos han sugerido que cada hexámero es reconocido por un solo dímero. Tomado de Lavrrar, J. L., & McIntosh, M. A. (2003). Architecture of a Fur Binding Site: a Comparative Analysis. *American Society for Microbiology*. doi:10.1128/JB.185.7.2194-2202.2003

Hipótesis

El desarrollo de un modelo matemático determinista permite aproximar la cantidad de proteína PbrA generada por *Pseudomonas fluorescens* recombinante que sirve como precursor importante para la síntesis de pioverdina.

Capítulo III: Metodología

Búsqueda de secuencias para el diseño de casete genético

Se realizó una búsqueda en la base de datos de NCBI de la secuencia del gen PbrA, en donde se encontró la secuencia de la caja de hierro y la secuencia codificante, necesarias para el diseño del casete de expresión.

Se realizó un análisis de predicción de promotores mediante el uso del software iPro54-PseKNC, que utiliza algoritmos bioinformáticos probabilísticos. Ver Anexo 3.

Diseño del constructo genético para la producción de pioverdina en *Pseudomonas fluorescens*.

Para el diseño del constructo genético se utilizó las partes básicas para diseño de genes sintéticos, obtenidas del registro oficial de iGEM, las cuales son: PROMOTOR-RBS-CDS-TERMINADOR; siendo RBS el sitio de unión al ribosoma y CDS secuencia codificante (iGEM Organization, 2020).

Para la clonación del casete de expresión se utilizó el ensamblaje RFC-10 Assembly debido a su compatibilidad con las piezas de ADN. Se empleó las secuencias consenso (prefijos, sufijos y cicatrices) y se unió todas las partes biológicas investigadas (Knight, 2003).

Con el objetivo de identificar cada una de las partes del casete se las diferenció con colores en el siguiente orden: Promotor (verde)- RBS (naranja)- CDS (amarillo)- TERMINADOR (verde oscuro). La secuencia inicial y final del diseño genético representa los prefijos y sufijos (celeste). Ver Tabla 1.

Mediante el uso del software Benchling, una herramienta universal de fácil uso especializada en Biología molecular y Biología sintética, se realizó la clonación con la opción “Digestión y ligación con enzimas de restricción” (Shields, 2021). En la **Tabla 1** se puede observar las partes utilizadas para el casete de expresión.

Tabla 1

Biobricks utilizados para el constructo genético de la proteína PbrA

PARTE	DESCRIPCIÓN DE PARTE	SECUENCIA	REFERENCIA
PROMOTOR BBa_J23102	Promotor constitutivo fuerte del grupo Anderson. Comúnmente usado para ajustar el nivel de expresión de partes constitutivamente. Muestra en stock, 104 usos	ttgacagcta gctcagtcct aggtactgtg ctagc	(Anderson, 2006)
SITIO DE UNIÓN A RIBOSOMA RBS BBa_B0030	Sitio de unión a ribosoma fuerte, muestra en stock, 1001 usos de la secuencia.	attaaagagg agaaa	(Mahajan, Voichita, Chow, Wissner, & Carr, 2003)
SECUENCIA CODIFICANTE (CDS) GenBank: X79908.1	Secuencia codificante del gen de la proteína PbrA, tamaño de 555 pb, proviene de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; Factor de activación de la transcripción regulado por hierro	atgacggaacaagtatccacaagcaagtgcgattcaccgctactcatgcattcgtcgac aatcgactgattctggtcaagattgcagcccgcattaccggctgccgttcgpcgcccgaag atgtggtgcaggatgcgtttttccgactgcaatcggcgcaccgatcacgtcgtcgatcaa ggctcaactgagctatctgttccagatcgtgcgaacctcgccatcgatcactaccgcaa caggcgttgagcagaagtactccggccctgaagaggaagggctgaatgtggtcatcca gggtgcttcgcccgaacctcgcatatcaatttctcgaccctggaaaacatcgccgacgc gttgaccgaactgcccagccgacgcgctatgcgttcagatgtaccgctgcacggcgtg ccgaaaaggacatcgccaaggaactggcggtttcgccaaccctggtaacttcattgatt cgtgatgcactggtgcactgccgaaggtgtcgggcagtcggcgggatgcggtagccgt gggtcgtcgttaa	(Sexton <i>et al.</i> , 1995a),
TERMINADOR BBa_B0010	Terminador transcripcional que consta de un tallo-bucle de 64 pb. Muestra en stock 1064 usos	ccaggcatca aataaaaacga aaggctcagt cgaaagactg ggccttctgt tttatctgtt gtttgtcgtt gaacgctctc	(Rettberg, 2003)

Prefijo Ensamblaje RFC10	Secuencia consenso para ensamblaje RFC10	GAATTCGCGGCCGCTTAGAG	(Knight, 2003)
Sufijo Ensamblaje RFC10	Secuencia consenso para ensamblaje RFC10	TACTAGTAGCGGCCG CTGCAG	(Knight, 2003)
SCARS Promotor-RBS; CDS-Terminador	Pequeña secuencia consenso generada por el ensamblaje RFC10, se ubica entre Promotor-RBS; CDS-Terminador	TACTAGAG	(Knight, 2003)
SCARS RBS-CDS	Pequeña secuencia consenso generada por el ensamblaje RFC10, se ubica entre RBS- CDS	TACTAG	(Knight, 2003)

Nota: Las piezas de ADN utilizadas siguen el orden de cada parte del diseño genético, cada color representa los diferentes

Biobricks utilizados para el diseño del constructo genético.

Desarrollo del Modelo matemático determinista para la predicción de pioverdina producida por *Pseudomonas fluorescens* recombinante

Para el desarrollo del modelo matemático de transcripción constitutiva del gen se empleó la Ley de Acción de Masas (LAM), la cual es ampliamente utilizada para expresar las velocidades de cada sistema de reacciones, según el proceso planteado por Picó et al. (2015).

Las ecuaciones aplicadas fueron obtenidas mediante un proceso de reducción de modelos bioquímicos, aplicando la teoría de “*Aproximaciones Quasi Estacionaria*” (QSSA) para la obtención de relaciones algebraicas entre sistemas (Vega de Prada & Liñán, 2016).

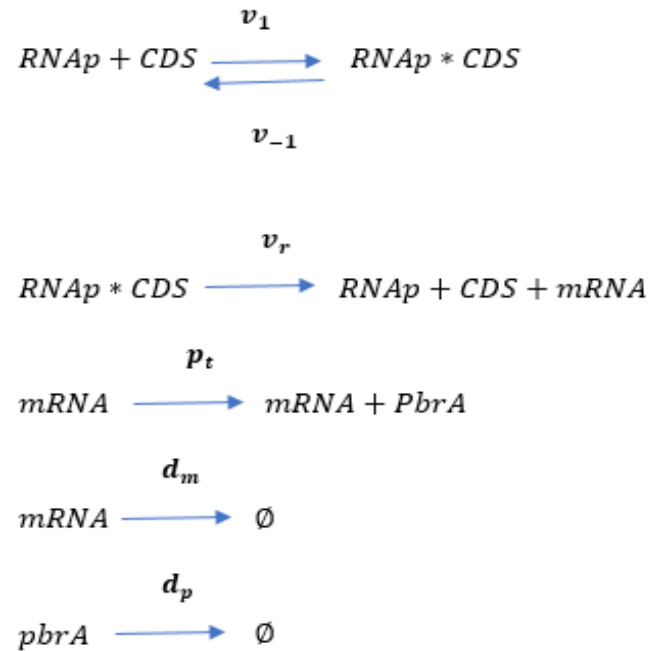
El resultado de las expresiones representa los modelos de transcripción genética constitutiva más utilizadas. La demostración de las expresiones matemáticas utilizadas se encuentran en el Anexo 4. Se utilizó el software MATLAB para la simulación computacional.

Se realizó el desarrollo de la función `mcsimple.m`, que describe el sistema de ecuaciones diferenciales, y el script `mm.m` donde se encuentra los parámetros definidos en Anexo 1.

Para la simulación en Matlab del modelo determinista, se realizó una investigación bibliográfica para determinar los valores teóricos de cada parámetro propuesto en las expresiones matemáticas resultantes (ver Tabla 2), mediante la función `ode45` se resolvió el sistema de ecuaciones diferenciales, con el método de orden medio se obtuvo los resultados de la simulación.

Figura 8

Expresión constitutiva de gen *PbrA*



Nota: Reacciones bioquímicas para modelo de expresión constitutiva

Ecuaciones para modelo de expresión constitutiva según (Picó et al., 2015)

$$\frac{d[mRNA]}{dt} \rightarrow \dot{mRNA} = v_r - d_m mRNA$$

$$\frac{d[PbrA]}{dt} \rightarrow \dot{PbrA} = p_t mRNA - d_p PbrA$$

Tabla 2

Datos teóricos para modelamiento de expresión constitutiva en plásmido pUC-19

Parámetro	Descripción	Unidades	Valor	Referencia
v_r	Tasa de transcripción constitutiva de mRNA $k_r = 2.5 \text{ min}^{-1}$ multiplicado por el número de copias del plásmido PUC-19. Número medio de copias de plásmido PCN: 500 $v_r = k_r * C_n$	de min^{-1}	$v_r = 1250$	(Jahn et al., 2016) (Picó et al., 2015)
p_t	Tasa de traducción de mRNA	min^{-1}	2.4	(Boada, Vignoni, & Picó, 2017)
d_m	Tasa de degradación de mRNA	min^{-1}	0.25	(Picó et al., 2015)
d_p	Tasa de degradación de la proteína	min^{-1}	0.018	(iGEM-Valencia_UPV, 2018)

Nota: Parámetros investigados bibliográficamente para desarrollo de Modelo matemático para la expresión constitutiva de gen PbrA.

Búsqueda bibliográfica para definir protocolo de transformación de *Pseudomonas fluorescens*.

Posteriormente, el diseño, construcción y clonación del casete de expresión, se inició la búsqueda de protocolos para la transformación de *Pseudomonas fluorescens*.

Para la transformación eficiente de *Pseudomonas fluorescens* se necesita una cantidad representativa de plásmido, por lo que se debe primero replicar el casete de expresión de PbrA en *E. coli*, por ser una bacteria con maquinaria

óptima para la producción de proteínas recombinantes, considerada una buena estrategia para obtener una cantidad significativa de plásmido (Cunningham et al., 2009).

Para la elaboración de células competentes y transformación de *E. coli* se escogió el protocolo de “*Células competentes y Transformación*” (iGEM Organization, 2020).

Una vez que se obtiene una cantidad significativa de plásmido clonado, se debe transformar en *P. fluorescens*, por lo que se escogió el protocolo para la elaboración de *Pseudomonas* competentes y Transformación según Chuanchuen et al. (2002).

Este método es eficaz y se encuentra documentado para preparar células de *Pseudomonas* altamente competentes y su posterior transformación química. Este procedimiento tiene eficiencias de transformación comparables a las observadas cuando se usa electroporación (Chuanchuen et al., 2002).

Búsqueda de evidencia científica, sobre el efecto de sideróforos de *Pseudomonas fluorescens* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Se buscó la evidencia científica verificando en la revisión bibliográfica el mecanismo antagónico de los sideróforos frente a *Fusarium oxysporum*. Se escogió los artículos científicos con resultados relacionados en el antagonismo de sideróforos producidos por *P. fluorescens* frente a FOC.

Los siguientes autores presentaron resultados comparables: Neha Arya et al. (2018), Santoyo et al. (2010), Valencia et al. (2005), Gaber et al. (2020) con

una inhibición de 75%, 70%, 70%, 80% frente *Fusarium oxysporum* respectivamente.

Capítulo IV: Resultados

Secuencia de gen PbrA encontrada en base de datos del NCBI

El gen PbrA, tiene un tamaño de 806 pb, está dividido en promotores, caja de hierro o Fur Box (secuencia donde la proteína Fur se une e inhibe la transcripción del gen PbrA) y secuencia codificante (CDS). Ver Figura 9.

Se confirmó que la caja de hierro y los promotores naturales del gen, se encuentran desde la posición 1 hasta la 251 de la secuencia de nucleótidos. Los resultados de la predicción de promotores se pueden encontrar en el Anexo 3.

Además, los sitios de unión a la proteína Fur se encuentran aguas arriba de la secuencia codificante que empieza desde el nucleótido 252 hasta el final del gen, específicamente desde el nucleótido 149 hasta el 184 (Sexton et al., 1995a). Es por esta razón que, únicamente se utilizó el CDS del gen PbrA para el diseño del casete de expresión.

Figura 9

Secuencia del gen *PbrA*

ORIGIN

```

1  cggggttg  cgccggaac  cattaccaa  tgagaacgga  tgacgtctg  aaataattag
61  tcggcgggca  ggagcgccaa  tgcggccggg  gtgcggcggc  atgtcgcagt  ttcagaacg
121  cacttttgta  ggcattact  tctcttttc  aattgacaat  cattatcatt  caacataatt
181  tgtcgtcga  tgtgtaggac  gcccctctc  caaggcgccc  cacgaaccta  tttggcagca
241  aggtgatttc  catgacggaa  caagtatcca  caagcaagtg  cgattaccg  ctacttcatg
301  cattcgtcga  caatcgactg  attctggcca  agattgcagc  cgcattacc  ggctgccgtt
361  cgcgcgccga  agatgtggtg  caggatgctg  tttccgact  gcaatcggcg  ccaccgatca
421  cgtcgtcga  caaggctcaa  ctgagctatc  tgtccagat  cgtgcgcaac  ctgccatcg
481  atcactaccg  caaacaggcg  cttgagcaga  agtactccgg  ccctgaagag  gaagggctga
541  atgtggtcat  ccagggtgct  tcgccgaaa  cctcgcatat  caatttctcg  accctggaaa
601  acatcgccga  cgcgttgacc  gaactgcca  gccgcacgcg  ctatcgttc  gagatgtacc
661  gcctgcacgg  cgtgccgcaa  aaggacatcg  ccaaggaact  gggcgtttcg  ccaaccctgg
721  tcaacttcat  gattcgtgat  gactgggtgc  actccgcaa  ggtgtcgggc  agtcggcggg
781  atgcggtagc  cgtgggtcgt  cgtaa

```

→ “FUR BOX”

Secuencia
codificante de la
proteína pbrA
(CDS)

//

Nota: azul) secuencia de la caja de hierro del gen *PbrA*. café) Secuencia codificante del gen *PbrA*. Tomado de Sexton R., G. P. (1995a). *GenBank: X79908.1*. Obtenido de Iron-responsive gene expression in *Pseudomonas fluorescens* M114: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X79908>

Constructo genético para *Pseudomonas fluorescens* mediante ensamblaje RFC10

La construcción del casete de expresión se diseñó uniendo las piezas de ADN escogidas, mediante ensamblaje RFC10.

Figura 10

Unión de Biobricks para formación de casete de expresión del gen PbrA

```

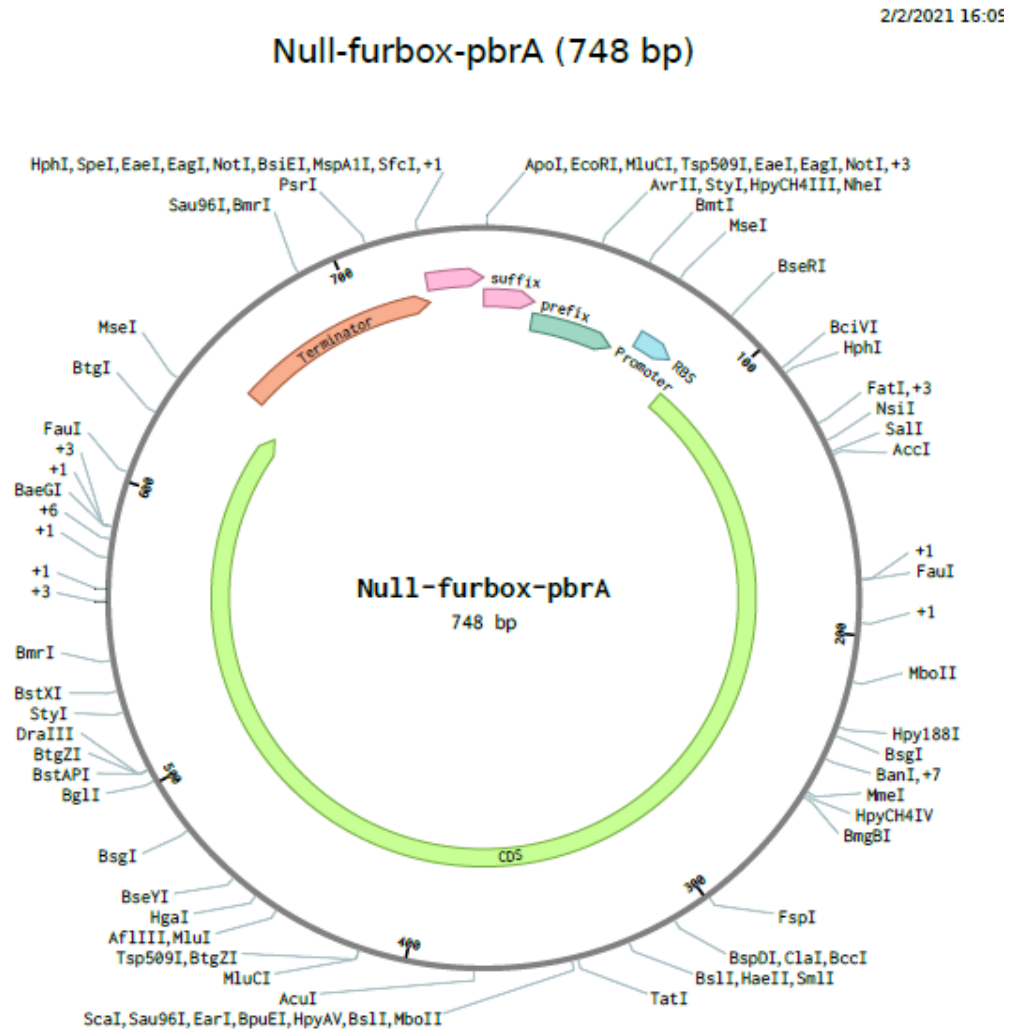
GAATTCGCGCCGCTTCTAGTtgacagctagctcagctcagtagtactgtgctagcTACTAGAGgataaaga
gg agaaaTACTAGatgacggaa caagatccacaagcaagtgcgattcaccgctacttcatgcattcgtcgacaategactg
attctggtcaagattgcagcccgcattaccggctgccgttcgcgcgccgaagatgtgggtgcaggatgcgttttccgactgcaatcg
gcg ccaccgatcacgtcgtcgat caaggctcaa ctgagctatc tgtccagat cgtgcgcaac ctcgccatcgactactaccg
caaacaggcg cttgagcaga agtactccgg ccctgaagag gaagggtgaatgtggtcat ccagggtgct tcgccgaaa
cctcgcatacaattctcgaccctgaaaacatcgccgacgcgttgaccgaactgccagccgcacgcgctatgcgttcgagatgt
accgctgcacgg cgtgccgcaa aaggacatcg ccaaggaact gggcgtttcg ccaacctggtcaactcatgattcgtgat
gcactggtgcactgccgcaaggtgtcgggcagtcggcgggatgcggtagccgtgggtcgtcgttaaTACTAGAGccagg
catcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgtttatctgtgtttgctgggtgaacgctctcTACTAGTAG
CGGCCGCTGCAG
  
```

Nota: Unión de piezas de ADN (Biobricks) para formación de constructo genético, cada color representa diferentes piezas de ADN, todas las especificaciones se encuentran en la Tabla 2.

Resultado de Casete de expresión para el gen PbrA desarrollado en el software Benchling

Figura 11

Constructo genético para la expresión constitutiva del gen PbrA



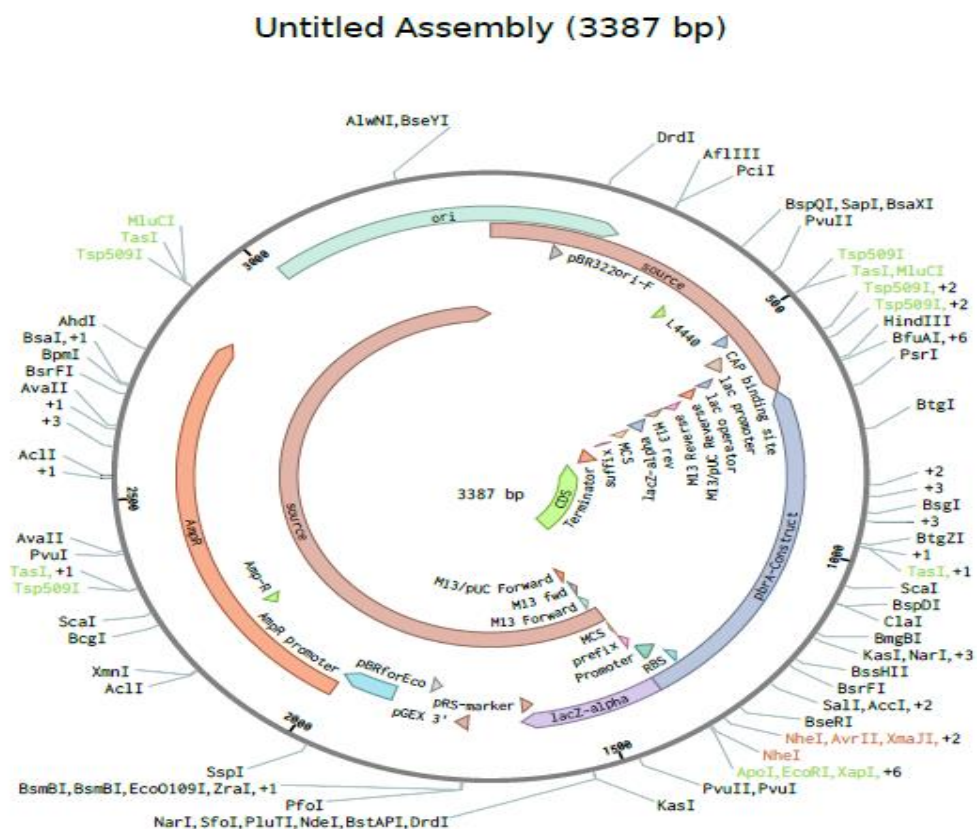
Nota: Constructo genético para la expresión de gen PbrA, cada color en el plásmido representa los Biobricks utilizados. Posee un tamaño final de 748 pb

Resultado de clonación del casete de expresión para el gen PbrA en el plásmido pUC-19.

Se utilizó la herramienta “Digestión y ligación” del software Benchling para generar la clonación en el plásmido pUC-19. Debido a la afinidad del plásmido al tipo de ensamblaje, no se presentó errores el momento de clonar el casete genético, generando un nuevo plásmido que consta de 3387 bp.

Figura 12

Constructo genético clonado en plásmido pUC-19 con ensamblaje tipo RFC10

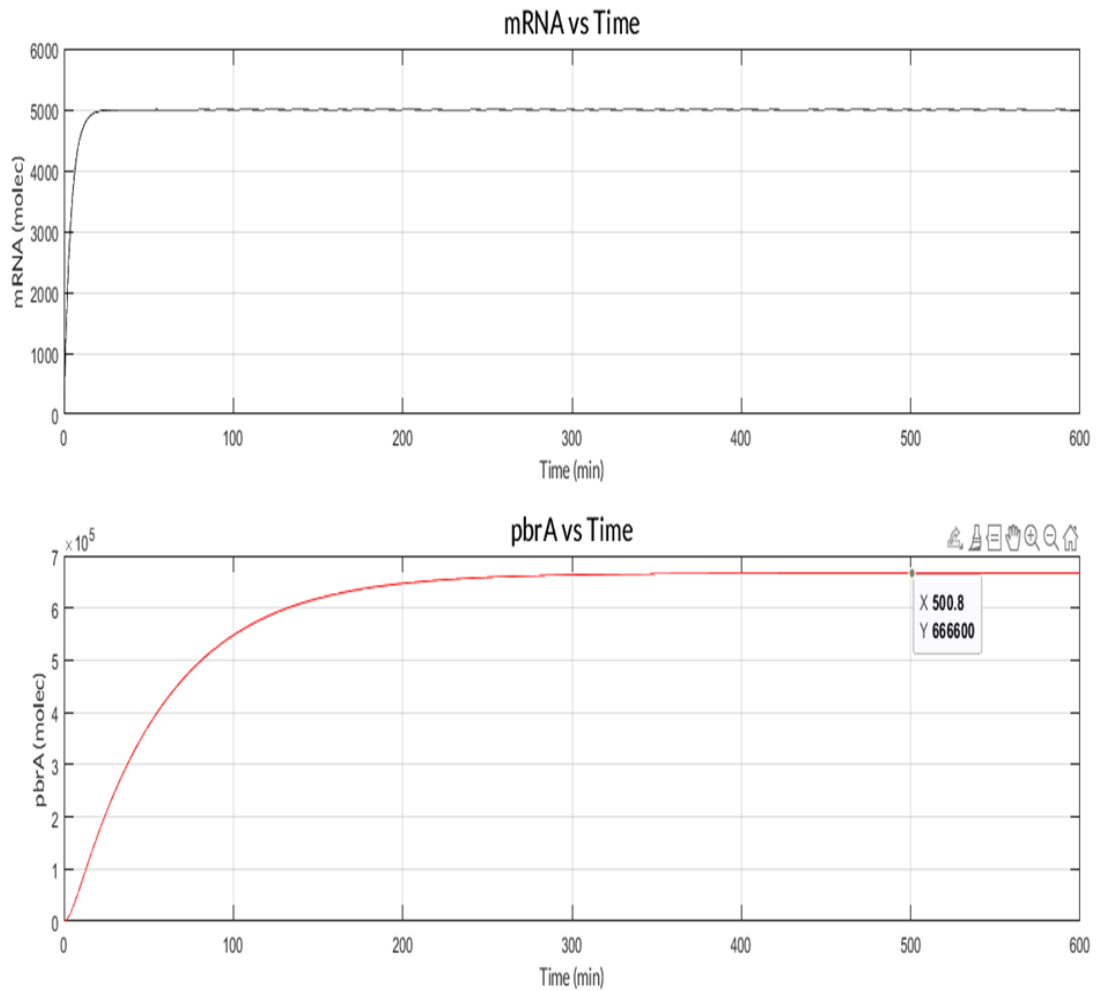


Nota: Al realizar el ensamblaje RFC 10 se verificó y se cortó al plásmido *in silico* con las enzimas EcoRI y XbaI y para el constructo genético se cortó la pieza de ADN con EcoRI y SpeI, debido a que el prefijo y sufijo está formado por sitios de restricción específicos de estas enzimas de restricción.

Resultados de simulación del modelo matemático determinista en el software Matlab

Figura 13

Resultados del modelo matemático para transcripción constitutiva de gen PbrA



Nota: Datos obtenidos a partir del software MATLAB para producción de proteína PbrA. En el primer gráfico se observa la cantidad de moléculas generadas de mRNA en el tiempo. En el segundo gráfico se puede observar la cantidad de moléculas generadas de proteína PbrA a lo largo del tiempo, llegando a un punto máximo de producción de 666600 moléculas en 8,33 horas.

Análisis de resultados de simulación en Matlab:

$$\text{moleculas } pbrA = 666600 \text{ molec} \frac{1 \text{ mol}}{6,022 \times 10^{23} \text{ molec}} = 1.1069 \times 10^{-18} \text{ mol}$$

Según Askeland & Morrison (1983), la cantidad de células viables de *Pseudomonas fluorescens* en 8,33 horas es de: $8.7 \log_{10}$ células viables/ml por lo tanto multiplicamos la cantidad de células por las moles resultantes de modelo y obtendremos la concentración de proteína de interés por cada ml de medio inoculado con *Pseudomonas fluorescens* recombinante.

$$1.1069 \times 10^{-18} \text{ mol} \times 8.7 \log_{10} \text{ células viables/ml} = 0.555 \text{ nmol/ml}$$

Protocolo para la transformación del casete de expresión diseñado en *Pseudomonas fluorescens*.

Para la preparación de las células competentes de *Pseudomonas fluorescens* y transformación de las mismas se utilizará protocolo según Chuanchuen et al. (2002), elaborado en *Colorado State University Fort Collins, CO, USA*. Los pasos a seguir se nombran a continuación:

- Cultivar células de *Pseudomonas fluorescens* en 4 ml de caldo LB a 37°C durante la noche. Todos los pasos siguientes, excepto las centrifugaciones, se realizarán con los tubos sentados en hielo.
- Coger un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y preenfriar sobre hielo durante 3-5 minutos.
- Mediante una corta centrifugación de 30 segundos Tomar alícuotas de 1 mL del cultivo pre-incubado durante la noche de *Pseudomonas fluorescens* y transferir las células cosechadas a los tubos de microcentrífuga refrigerados. El protocolo recomienda no centrifugar más

de 30 segundos porque podría haber una reducción significativa de la eficiencia de transformación.

- Los gránulos de células se deben resuspender con la punta de una pipeta en 1 mL de frío (aproximadamente 4°C) de 0,1 M $MgCl_2$. La suspensión celular se centrifugará de nuevo a aproximadamente 13 000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender los gránulos celulares en 1 mL de sales de transformación en frío con una solución de glicerol (sales TG) conformado por (75 mM $CaCl_2$, 6 mM $MgCl_2$, 15% de glicerol).
- Las suspensiones celulares se deberán incubar en hielo durante 10 minutos. Posteriormente centrifugar aproximadamente 13 000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- Decantar el sobrenadante, y resuspender los pellets con la punta de una pipeta en 200 mL de solución salina TG fría y se mantiene en hielo hasta su uso.

Tabla 3

Materiales y reactivos para elaboración de células competentes

MATERIALES	REACTIVOS
Centrífuga	Caldo Luria-Bertani (LB)
Tubo de micro centrifuga de 1,5 ml	Glicerol
Micropipeta	$CaCl_2$
Cepa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	$MgCl_2$
Tubos de ensayo	Hielo

Nota: Materiales y reactivos necesarios para la elaboración de *Pseudomonas fluorescens* competentes

Protocolo de transformación de *Pseudomonas fluorescens*

- Transferir alícuotas (100 μL) de las células competentes a tubos de vidrio de borosilicato de pared-fina (13 x 100 mm) pre-refrigerados en el hielo.
- Colocar alícuotas de 2,5 μL que contiene el 100-1000 ng de plásmido clonado previamente purificado y suspendido en 10 mM de Tris-HCl (pH 8,5) o agua estéril se añadirá a las células. (Un control negativo recibirá agua estéril en lugar de ADN de plásmidos)
- Incubar en hielo la mezcla de ADN y células durante 15 minutos.
- Calentar la mezcla a 37°C durante 2 min, e inmediatamente añadir 500 μL de caldo Luria Bertani (LB).
- Incubar con agitación los tubos a 37°C durante 1 hora.
- Después de la incubación, tomar una alícuota de 200- μL de cada suspensión celular y colocar en agar LB preparado con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con ampicilina.
- Transferir el contenido restante de cada tubo a tubos de microcentrífuga, y recoger las células por centrifugación a aproximadamente 13000x g durante 1 minuto.
- Resuspender en 200 μL de medio LB (a temperatura ambiente), y luego esparcir en una placa de LB-ampicilina.
- Incubar las placas a 37°C durante 20-24 horas antes de contar las colonias.

Tabla 4

Materiales y reactivos para la transformación de P. fluorescens

MATERIALES	REACTIVOS
Tubo de vidrio borosilicato de pared-fina (13 x 100 mm)	Caldo y agar Luria-Bertani (LB)
Plancha de calentamiento	Ampicilina
Incubadora	Células competentes
Tubos de microcentrífuga	Plásmido purificado
Centrífuga	Hielo
Cajas Petri	Agua estéril
Micropipeta	Tris-HCl

Nota: Materiales y reactivos necesarios para la transformación de *Pseudomonas fluorescens* competentes.

Una vez elaborada la transformación se debe sembrar las bacterias transformadas en medio King B, que permite la detección de síntesis de pioverdina, como la cepa pertenece a *P. fluorescens*, los resultados de pigmentación según Biorad (2009), en el medio de cultivo serán amarillo verdoso débil ver Figura 4.

Resultado en base a evidencia científica, del efecto de sideróforos de *Pseudomonas fluorescens* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Tabla 5

Tratamiento de Fusarium oxysporum con P. fluorescens en plántulas de tomate, % Incidencia de enfermedad y % Control de la enfermedad

	Tratamiento	% Incidencia de Enfermedad	% Control de la enfermedad
T1	Control	-	-
T2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa SPs9	-	-
T3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa SPs20	-	-
T4	<i>Fusarium oxysporum</i>	75	25
T5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SPs9 + <i>F. oxysporum</i>	0	100
T6	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SPs20 + <i>F. oxysporum</i>	25	75
T7	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SPs9 + <i>F. oxysporum</i> + Hierro	100	0
T8	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SPs20 + <i>F. oxysporum</i> + Hierro	75	25

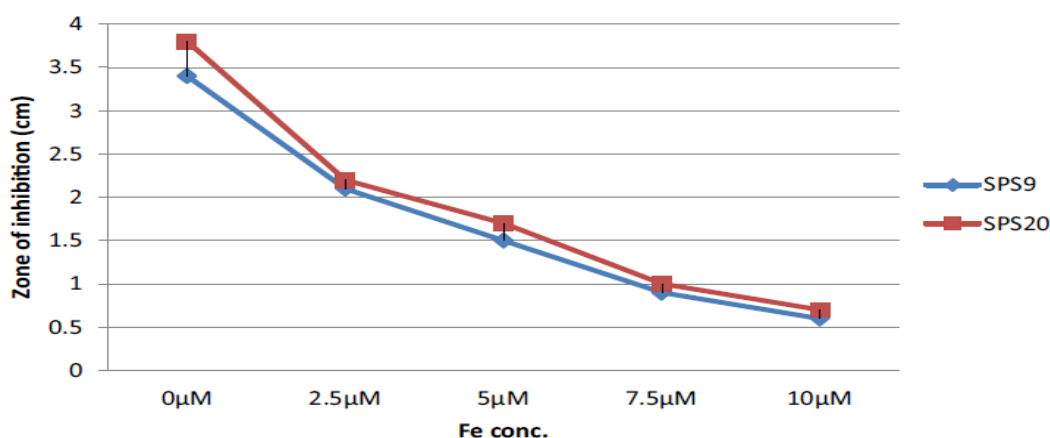
Nota: Los datos presentados en la tabla, representan el efecto de *Pseudomonas fluorescens* productora de sideróforos contra *Fusarium oxysporum* en un total de 8 tratamientos. Tomado de Neha Arya, A. R. (2018). Biocontrol Efficacy of Siderophore Producing Indigenous *Pseudomonas* Strains Against *Fusarium* Wilt in Tomato. *The National Academy of Sciences, India* 2018.

Con base en a la bibliografía investigada se consideró el estudio de Neha Arya et al. (2018), en la cual realizó tratamientos con *P. fluorescens* y FOC en plántulas de tomate para analizar el efecto de los sideróforos frente a *Fusarium oxysporum*.

Los ensayos fueron realizados en dos semanas permitiendo observar que las plántulas inoculadas con *P. fluorescens*, controlaban la infección causada por FOC. También se determinó que, en presencia de hierro, la efectividad de *P. fluorescens* para producir sideróforos disminuyó considerablemente (Neha Arya et al., 2018).

Figura 14

Inhibición de Fusarium oxysporum frente a sideróforos producidos por P. fluorescens en presencia de diferentes concentraciones de hierro.



Nota: Se puede observar que la zona de inhibición de FOC va disminuyendo a medida que se incrementa las concentraciones de hierro. Las líneas representan las cepas productoras de sideróforos que van decreciendo, hasta que en la concentración máxima de hierro de $10 \mu\text{M}$, la inhibición de FOC mediada por *P. fluorescens*. Se ve afectada en su totalidad. Tomado de Neha Arya, A. R. (2018). Biocontrol Efficacy of Siderophore Producing Indigenous Pseudomonas Strains Against *Fusarium Wilt* in Tomato. *The National Academy of Sciences, India* 2018.

Capítulo V: Discusión

El casete está diseñado para expresar el factor sigma PbrA, esencial para la síntesis de pioverdina en *Pseudomonas fluorescens*. La expresión de PbrA se reprime en condiciones ricas de hierro de una manera dependiente de Fur (Sexton et al., 1995 a). Kipngetich et al. (2017), menciona que en presencia de iones ferrosos la proteína Fur se une naturalmente a una secuencia de ADN denominada “Caja Fur”, que en este caso está ubicada en la región promotora del gen PbrA. En este sentido, Sexton et al. (1996 b), indica que “*todos los promotores regulados por hierro en P. fluorescens requieren la presencia del factor sigma alternativo PbrA para activar la respuesta génica en condiciones de bajo hierro*” y que la expresión constitutiva de PbrA permitirá la biosíntesis de pioverdina en condiciones de alto contenido de hierro (Sexton et al., 1996b).

Según Sexton et al. (1995a), la caja Fur en el gen PbrA, fue encontrada aguas arriba de la región codificante y se han descrito tres posibles sitios de unión para esta proteína ubicados en la región 5' de PbrA. Se conforman de 19 pb cada uno y tienen homología del 53-74% con la secuencia consenso de la caja Fur de *E. Coli*. El primer sitio de unión (TCAATTGACAATCATTATCA 149-168); presentó el mayor porcentaje de similitud 74%, el segundo (GACAATCATTATCATTCAAC 155-174) 68% y el tercero (ATCATTCAACATAATTTGTC 165-184) 53% (Sexton et al., 1995a). Se ha demostrado que la proteína Fur tiene afinidad por las 6 primeras bases para unirse a la caja de hierro (Baichoo & Helmann, 2002).

Como se puede observar en la Figura 9, la secuencia de la caja FUR se encuentra aguas arriba de la región codificante del gen o CDS. De este modo, para el diseño del constructo genético se utilizó únicamente la región codificante del gen PbrA que empieza con el codón de inicio en el nucleótido 252.

Para tal efecto, mediante el software iPro54-PseKNC se identificó que la mayoría de la secuencia de ADN anterior, a la región codificante, pertenecían a secuencias similares a promotores σ^{54} con una puntuación de similitud mayor a 0,5 y también regiones no promotoras menores a 0,5 como la secuencia de la caja Fur. Ver Anexo 3. En consecuencia, el casete de expresión para el gen PbrA consta de 748 pb como se muestra en la Figura 11, está formado inicialmente por las secuencias consenso (prefijos y sufijos) otorgados por el tipo de ensamblaje RFC10 que, en la actualidad, es el tipo de ensamblaje más utilizado para unir piezas de ADN de la base de datos de (iGEM Organization, 2020).

Seguido del prefijo, se encuentra un promotor constitutivo fuerte BBa_J23102 del grupo Anderson de promotores constitutivos, separado de una secuencia de ADN corta llamada cicatriz o scar (TACTAGAG), que es un subproducto del ensamblaje RFC10 causada por las enzimas de restricción XbaI y SpeI, las cuales poseen extremos cohesivos y compatibles generando cicatrices al momento de la ligación, debido a esto, no pueden ser escindidas por ninguna enzima de restricción (Peng Xu et al., 2012).

Las cicatrices siempre se las debe colocar al unir dos partes de ADN, como la unión entre promotor y RBS o CDS y terminador, mientras que la cicatriz es más pequeña (TACTAG) en la unión exclusivamente del RBS con la secuencia codificante (Knight, 2003).

El sitio de unión a ribosoma RBS BBa_B0030 que es el responsable del reclutamiento del ribosoma, fue escogido de acuerdo a la caracterización de su fuerza. Según Mahajan et al. (2003), comparó la fuerza de unión entre otros tres RBS de la misma familia (B0031, B0032, B0034), presentado mayor fuerza relativa y eficiencia del 60% el RBS B0030.

Debido al promotor constitutivo, el RBS fuerte y la delección de la caja Fur en el casete de expresión, se espera que la expresión de PbrA sea constitutiva, ya que siempre estaría disponible como precursor de síntesis de pioverdina en *P. fluorescens* (Sexton et al., 1995a). Cabe recalcar que la proteína Fur afectaría a la cascada de genes necesarios para la síntesis de pioverdina debido a que *Pseudomonas fluorescens* tienen varios sitios de unión a la proteína Fur en su genoma (Ringel & Brüser, 2018).

Para terminar el constructo genético se utilizó el terminador de la transcripción BBa_B0010, que consta de un tallo-bucle de 64 pb, compatible con el ensamblaje RFC10 y 1064 usos, debido a su eficiencia de casi 100% en aislados y sistemas purificados (Rettberg, 2003).

El plásmido pUC-19 fue utilizado debido a su sitio de clonación múltiple, tamaño pequeño, número de copias intermedio a alto (500 de copias de ADN), es compatible con el ensamblaje RFC10 y sobre todo es compatible con varios sistemas de expresión como *Escherichia coli* y *Pseudomonas* sp. también presenta resistencia a ampicilina como marcador de transformación, un antibiótico en el que *P. fluorescens* no es sensible (Schweizer, 1991).

En tal sentido, Valencia et al. (2005), menciona que la producción de sideróforos por *P. fluorescens*, está relacionado por la sensibilidad a algunos antibióticos como: cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina y bacitrina, de los cuales la mayor sensibilidad presentada ha sido por cloranfenicol.

El modelo matemático determinista fue desarrollado mediante la Ley de acción de masas (LAM), la cual establece que en una reacción elemental donde los coeficientes estequiométricos son uno, la velocidad de reacción es proporcional al producto de las concentraciones de los reactivos (Chellaboina et al., 2009).

Asumiendo que las reacciones químicas siguen la ley LAM y que los valores en el sistema de reacciones son invariantes, se aplicó la teoría de *Aproximaciones Quasi-estacionaria (QSSA)*, que se emplea en sistemas de reacciones químicas rápidas para la obtención de relaciones algebraicas (Vega de Prada & Liñán, 2016). Es decir que, bajo el método de QSSA, las reacciones rápidas alcanzan el estado estacionario velozmente.

Vinculado al concepto de que las tasas de reacción de enlace/desenlace de la ARNpolimerasa son mucho más rápidas que las de elongación y degradación, su dinámica se vuelve despreciable, asumiendo así un estado constante. Esto permitió convertir la ecuación diferencial correspondiente a una algebraica (Picó et al., 2015).

Dentro de este marco, el proceso de transcripción constitutiva del gen PbrA, consta de tres etapas, unión reversible de la RNAPolimerasa al promotor del gen, elongación irreversible a lo largo del ADN para formar la copia de mRNA y la degradación irreversible del mRNA, por procesos activos y pasivos (Picó et al., 2015). Ver Figura 8.

El modelo muestra que la síntesis de ARN mensajero aumenta hasta cierto límite si el promotor tiene mucha afinidad por la ARN polimerasa, ya que también se debe considerar las tasas de elongación y el número de copias del gen de la

célula. Por otro lado, también representa la baja síntesis de ARNm. Esto ocurriría si la RNAP libre se consume en otros procesos celulares, es por eso que se considera que la ARN polimerasa y los ribosomas no son factores limitantes en el sistema. Ver Ecuación 7 en Anexo 4. De este modo, el gen PbrA es un valor constante y depende del origen de replicación y número de copias de plásmido donde fue clonado (Vignoni, 2020).

En consecuencia, la transcripción del mRNA es directamente proporcional a la cantidad de proteína generada, es decir a mayor cantidad de mRNA, también mayor cantidad de proteína PbrA. Por consiguiente, en las expresiones matemáticas resultantes se considera que la proteína PbrA generada está relacionada con la cantidad de mRNA transcrito, multiplicado por la tasa de traducción del mRNA mensajero menos la degradación de la proteína PbrA en un intervalo de tiempo (Smadar & Davidson, 2009).

En virtud de los resultados, el constructo genético para la expresión del gen PbrA, se ve reflejado en la tasa de transcripción efectiva v_r , que se obtiene con la tasa de transcripción de ARNm (k_r) multiplicado por el número medio de copias de plásmido (C_n). De acuerdo a la Figura 13, la generación de moléculas de PbrA en 8, 33 horas sería de 666600 moléculas que equivalen a $1,1069 \times 10^{-18} \text{ mol}$, multiplicando por la cantidad de células viables según (Askeland & Morrison, 1983), la concentración de proteína PbrA en 8, 33 horas sería de $0,555 \text{ nmol/ml}$.

El protocolo elaborado por Chuanchuen et al. (2002), es principalmente práctico para la preparación de células competentes y transformación química de *Pseudomonas* sp., debido a su velocidad y eficiencia, resulta ser una alternativa atractiva que otros métodos que consumen más tiempo. Según Rodríguez et al. (2012), el método principal para transformar *Pseudomonas* sp., es por electroporación. Sin embargo, Diver et al. (1990) menciona que es un técnica más costosa y necesita instrumentación más técnica para su ejecución, en comparación la transformación química.

Chuanchuen et al. (2002) indica que con la modificación adecuada del protocolo, se puede adaptar para transformar otro tipo de bacterias, como ya se ha demostrado para *E. coli*, obteniendo una eficiencia de transformación de 1×10^6 transformantes/ $\mu\text{g de ADN}$ y en *Pseudomonas* de 1×10^5 transformantes/ $\mu\text{g de ADN}$ los datos son comparables con los resultados obtenidos de Diver et al. (1990), que al transformar *Pseudomonas* por electroporación obtuvo $1,5 \times 10^5$ transformantes/ $\mu\text{g de ADN}$. Los resultados son semejantes con el método de transformación química.

A pesar de que existe mayor transformación por el método de electroporación, Oswald (2016), señala que la transformación química provee resultados más predecibles y se puede agregar más volumen de ADN en el proceso si la concentración es muy baja. Este protocolo es adecuado para el desarrollo de proyectos de investigación debido a su eficiencia de transformación de *Pseudomonas* sp. y por el tiempo requerido, aproximadamente dos horas desde el inicio de la preparación de las células competentes hasta la siembra de células transformadas (Chuanchuen et al., 2002).

Asimismo, no requiere equipo especializado, fuera de la instrumentación general de un laboratorio de investigación y también es efectivo para la transformación de ADN plasmídico en varias cepas mutantes, análisis de complementación y transferencia de plásmidos (Chuanchuen et al., 2002).

Según la bibliografía investigada, la inoculación con *Pseudomonas fluorescens* en plántulas de *Musa balbisiana*, como biocontrol para la infección *F. oxysporum*, presentó marchitamiento menos severo de las plántulas y mejor crecimiento de las raíces (Sivamani & Gnanamanickam, 1987). En tal sentido, Neha Arya et al. (2018) realizó ensayos *in vivo* e *in vitro* de *P. fluorescens* productora de sideróforos, para inhibir el crecimiento de FOC. Las zonas de inhibición en el ensayo *in vitro* mostraron una disminución de diámetro del hongo en el medio de succinato estándar SSM, que inicialmente fue de 3,8 y disminuyó a 3,4 cm, representando 58% de inhibición.

Por otro lado, en el ensayo *in vivo* se realizó la inoculación del hongo en plántulas de tomate previamente inoculadas con y sin *P. fluorescens* resultando una fuerte decoloración de las raíces debido a la infección (Neha Arya et al., 2018).

Sin embargo, la inoculación previa de *P. fluorescens*, disminuyó significativamente la gravedad de la enfermedad en comparación con las plántulas no tratadas con las bacterias, como lo mencionado por Sivamani & Gnanamanickam (1987). Observando únicamente un leve amarillamiento de las hojas en un 20% de las plántulas tratadas. Además, que la previa bacterización en las plántulas mejoró el crecimiento de raíces (Neha Arya et al., 2018).

Por otro lado, Santoyo et al. (2010) adicionó hierro al medio de cultivo con *P. fluorescens*, e indicó una disminución considerable de la inhibición por FOC, coincidiendo con los resultados planteados por Neha Arya et al. (2018), (Figura 14) que, al adicionar diferentes concentraciones de hierro al medio de cultivo, se pudo notar baja producción de sideróforos al aumentar la concentración de hierro.

Corroborando los resultados presentados por De la Rosa et al. (2007), indicando que con la presencia de hierro soluble ($FeCl_3$) en el medio, la producción de sideróforos por *P. fluorescences*, disminuyó 30% la capacidad inhibitoria frente a FOC. Por lo tanto, a medida que la concentración de hierro aumenta, el crecimiento del hongo también aumenta, siendo una relación exponencial. En tal sentido, *P. fluorescens* productora de sideróforos suprime el marchitamiento de las plantas por competencia, es decir que, en la rizosfera de las plantas, los sideróforos generan una ventaja competitiva por nutrientes y espacio evitando el crecimiento de *F. oxysporum* (Valencia et al., 2005).

En efecto, si la rizosfera es abundante en *Pseudomonas fluorescens*, los hongos fitopatógenos no tienen la cantidad de hierro necesario para su crecimiento, debido a los sideróforos bacterianos que atrapan todo el hierro disponible en la rizosfera y crean una condición de falta de hierro para los patógenos (Neha Arya et al., 2018). Por lo tanto, los hongos fitopatógenos se inhiben en la rizosfera cuando las plantas se tratan con cepas bacterianas colonizadoras de la rizosfera y productoras de sideróforos. La producción de sideróforos depende del contenido de hierro, el pH y la temperatura (Gaber et al., 2020).

Como se pudo observar en varias investigaciones, la inoculación previa de *Pseudomonas fluorescens* suprime los síntomas de la enfermedad y aumenta la biomasa de las plantas, por eso, la aplicación de este tipo de bacterias es una alternativa prometedora para controlar el marchitamiento por *Fusarium* en condiciones de campo (Pérez et al., 2015), además que el uso de bacterias productoras de sideróforos puede aliviar el estrés ambiental por hierro (Visca et al., 2007).

Capítulo VI: Conclusiones

Para el diseño del constructo genético se utilizó únicamente la región codificante de PbrA, descartando la secuencia de ADN desde el nucleótido 1-251, debido a que se identificó que esa parte del gen eran promotores naturales de PbrA y la secuencia de la caja Fur (represor natural de la síntesis de pioverdina). El casete está diseñado para la expresión constitutiva del gen PbrA.

El casete de expresión de PbrA tiene un tamaño de 748 pb y está diseñado para que *Pseudomonas fluorescens* sintetice la proteína de manera constitutiva. El constructo genético fue clonado *in silico* a partir del software Benchling en el plásmido pUC-19 con el ensamblaje RFC10, se consideró la experiencia de clonación del plásmido pUC-19 y el número medio de copias de plásmido (500). No se presentó errores debido a la afinidad del plásmido por el ensamblaje RFC10 y como marcador para la transformación pUC-19 tiene resistencia al antibiótico ampicilina.

El modelo matemático fue realizado como modelo determinista para representar la expresión constitutiva del gen PbrA, utilizando la Ley de Acción de Masas (LAM) en el análisis de los sistemas bioquímicos y la teoría QSSA, en la relación de los sistemas con expresiones algebraicas que permitieron predecir cuantitativamente la cantidad aproximada de PbrA en el sistema de expresión *Pseudomonas fluorescens*. La simulación fue realizada en Matlab con la función ODE45 y los resultados predijeron 666600 moléculas de PbrA en 8,33 horas.

El protocolo para transformar a *Pseudomonas fluorescens* se investigó de acuerdo a la evidencia científica presentada que evaluaba la transformación de *Pseudomonas* sp. y *Escherichia coli*, la transformación entre las dos especies fue comparable. Además, el protocolo resulta ser muy práctico para la elaboración de *Pseudomonas* competentes y es indicado para proyectos de investigación debido a que no requiere equipos sofisticados, es eficiente y el tiempo de trabajo es óptimo.

Según la bibliografía investigada *Pseudomonas fluorescens* es un potencial biocontrolador para el hongo *Fusarium oxysporum* generando una disminución del crecimiento del hongo en un 75%, suprimiendo los síntomas de la enfermedad y aumentando la biomasa de las plantas. Esta especie ayuda a que las plantas no se marchiten por la infección causada por FOC, mediante un mecanismo de competencia. Es decir, que atrapan el hierro del medio y así otros organismos no lo pueden utilizar para sus necesidades biológicas. De acuerdo a la bibliografía investigada se puede concluir que *Pseudomonas fluorescens* es una alternativa prometedora para el control de FOC en condiciones de campo.

Capítulo VII: Recomendaciones

Es importante forjar conocimientos de modelación matemática en sistemas biológicos y el uso de softwares matemáticos para predecir los resultados de experimentación a lo largo de la carrera, ya que estas herramientas permiten tener una aproximación del resultado deseado al momento de la experimentación en el laboratorio. La modelación matemática permite simular resultados deseados, generando claridad al investigador en su proyecto de investigación.

Probar la simulación con modelación estocástica para comparar resultados entre el modelo determinista y el modelo estocástico y así observar la variabilidad de resultados en cada proceso.

Debido a la gravedad de la enfermedad ocasionada por FOC, se deben realizar campañas y capacitaciones continuas, dirigidas a los productores de plátano y banano sobre la llegada de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* al país, asesorando sobre los métodos de prevención y contención de la posible llegada del hongo a Ecuador.

Elaborar constructos genéticos para sistemas de expresión diferente a *Pseudomonas fluorescens* pero que sean organismos autóctonos de la rizosfera de la planta de plátano y banano como algunas especies de *Bacillus* sp.

Sintetizar el constructo genético diseñado para la expresión de PbrA y probar *in vitro* con los protocolos de transformación investigados en una cepa de *Pseudomonas fluorescens*.

Capítulo VIII: Bibliografía

Aerts, Reniers, & Mousavi. (2017). Model-Based Testing of Cyber-Physical Systems. En D. B. Houbing Song, *Cyber-Physical Systems Foundations, Principles and Applications* (págs. 287-304).

Agrocalidad. (2013). *Plan Nacional de Contingencia para Fusarium f.sp. cubense (Foc RT4)*. Obtenido de www.agrocalidad.gob.ec

Álvarez, E. (2019). *CIAT*. Obtenido de Estado del arte y opciones de manejo del Moko y Sigatoka negra en Améric Latina y el Caribe: <http://www.fao.org/3/a-as124s.pdf>

Álvarez, E. (2019). *Estado del arte y opciones de manejo del Moko y Sigatoka negra en Améric Latina y el Caribe*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-as124s.pdf>

Álvarez, E. P. (2019). *Estado del arte y opciones de manejo del Moko y la Sigatoka negra en América Latina y el Caribe*. . Obtenido de www.ciat.cgiar.org

Amaro, C. T. (31 de enero de 2014). *Retrato Microbiológico*. Obtenido de Programa de Microbiología: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n1/art12.pdf>

Ambrosi, C. F. (2005). Involvement of AlgQ in transcriptional regulation of pyoverdine genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*. doi:10.1128/JB.187.15.5097-5107.2005

Anderson, J. (2006). *Registry of standard biological parts*. Obtenido de Parte: BBa_J23102: http://parts.igem.org/Part:BBa_J23102

Aneberries. (2018). *ESTRATEGIA DE MANEJO DE FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. MORI EN ZARZAMORA*. Obtenido de <http://www.aneberries.mx/wp-content/uploads/2018/07/ESTRATEGIA-DE-MANEJO-DE-FUSARIUM-OXYSPORUM-F.-SP.-MORI-EN-ZARZAMORA-1.pdf>

Artzrouni, M. (2005). Mathematical Demography. En K. Kempf, *Encyclopedia of Social Measurement*. ScienceDirect.

Askeland, R., & Morrison, S. (1983). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:0099-2240/83/061802

Augustyn, A. (2019). *Heredity genetics*. Britannica.

Baichoo, N., & Helmann, J. D. (2002). Recognition of DNA by Fur: a Reinterpretation of the Fur Box Consensus Sequence. *Journal of Bacteriology*. doi:10.1128/JB.184.21.5826–5832.2002

Balseca, F. (15 de 07 de 2019). *El Universo*. Obtenido de Colombia sospecha de brote de hongo Fusarium en banano: <https://www.eluniverso.com/noticias/2019/07/15/nota/7426290/colombia-sospecha-brote-hongo-fusarium-banano>

Betancor, L. P. (2012). *GENETICA BACTERIANA*.

BioLabs, N. E. (2021). *Competent Cells*. Obtenido de <https://international.neb.com/products/competent-cells/competent-cells>

Biorad. (2009). *MEDIO DE DIFERENCIACIÓN DE PSEUDOMONAS*. Obtenido de KING B: https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/55278_08_2009_ES.pdf

- Boada, Y., Vignoni, A., & Picó, J. (2017). Engineered Control of Genetic Variability Reveals Interplay among Quorum Sensing, Feedback Regulation, and Biochemical Noise. . *ACS Synthetic Biology*, 6(10), 1903–1912. doi:<https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00087>
- Bravo, C., Larriva, W., & Luis, M. (06 de 2012). *MANEJO INTEGRADO DE LA MARCHITEZ R O FUSARIOSIS (Fusarium oxysporum) EN EL CULTIVO DE BABACO*. Obtenido de <file:///C:/Users/HP/Downloads/MANUALDELBABACO.pdf>
- Campos, A. (2017). *Repositrio Universidad de Chile*. Obtenido de *DISTRIBUCIONES CUASI-ESTACIONARIAS PARA EL PROCESO DE BESSEL EN EL INTERVALO (0, 1]*: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/145793/Distribuciones-Cuasi-Estacionarias-para-el-proceso-de-Bessel-en-el-intervalo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castaño, J. (2009). *Principios básicos de fitopatología*. Cornell University: Zamorano Academic Press, 1994.
- Chuanhuen, R. C. (2002). Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. *Biotechniques*. doi:10.2144/02334bm08
- Clancy, S., & Brown, W. (2008). *Translation: DNA to mRNA to Protein*. Obtenido de <https://www.nature.com/scitable/topicpage/translation-dna-to-mrna-to-protein-393/>
- Cramer, P. (2013). Transcription termination . *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*.

- Croplifela. (2019). *Mál de Pnamá*. Obtenido de Plantaciones de banano en alerta:
<https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/mal-de-panama>
- Cunningham, D. K. (2009). Factors affecting plasmid production in *Escherichia coli* from a resource allocation standpoint. *Microbial Cell*. doi:10.1186/1475-2859-8-27
- De la Rosa, S. G.-P.-A. (2007). Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the Yucatan peninsula. *sfam Society for applied microbiology*. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02185.x>
- Dita, M. (2020). *Jornada Fitosanitaria*. Obtenido de Marchitez por *Fusarium* de las Musáceas: <https://www.oirsa.org/>
- Diver JM, B. L. (1990). Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Anal Biochem*. doi:10.1016/0003-2697(90)90046-c.
- EcuRed contributors. (22 de junio de 2020). *Hongo Fusarium oxysporum*. (EcuRed, Editor) Obtenido de https://www.ecured.cu/index.php?title=Especial:Citar&page=Hongo_Fusarium_oxysporum&id=3508322
- FAO. (2020). *Manejo Integrado de enfermedades*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a1374s/a1374s05.pdf>
- Gaber, A. Z. (2020). Maximización de la producción de sideróforos a partir de agentes de control biológico, *Pseudomonas aeruginosa* F2 y *Pseudomonas fluorescens* JY3 mediante fermentación por lotes y por lotes alimentados exponencia. *MDPI*. doi:<https://doi.org/10.3390/pr8040455>

- Gandhi, S. J., Zenklusen, D., & Singerobert. (2018). Transcription of functionally related constitutive genes is not coordinated. *Nature structure & molecular biology*. doi:10.1038/nsmb.1934
- Gaona, V. i.-E. (2021). *Fusarium oxysporum R1 inoculado en medio PDA*. Quito.
- Garrido, A. (02 de 10 de 2013). *AGROCALIDAD*. Obtenido de Plan Nacional de Contingencia para *Fusarium oxysporum*: <http://www.agrocalidad.gob.ec/documentos/dvf/5aii-plandecontingenciacompletofoc.pdf>
- Green, E. D. (2020). *National Human Genome Research Institute*. Obtenido de Plasmid: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Plasmid>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *Escherichia coli*: "Ultracompetent" Cells. *Molecular Cloning collection*. doi:doi:10.1101/pdb.prot101196
- Hernández, Á. A. (08 de 2019). *Scielo-Perú*. Obtenido de *Aislamiento e identificación de Fusarium oxysporum obtenidos de zonas productoras de "ají paprika" Capsicum annum L. (Solanaceae) en el distrito de Barranca, Perú*: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2413-32992019000200011&script=sci_arttext
- Higuchi, M., Morisaki, K., & Numata, K. (s.f.). Method for the facile transformation of marine purple photosynthetic bacteria using chemically competent cells. *Microbiology Open*. doi:<https://doi.org/10.1002/mbo3.953>
- iGEM Organization. (2020). *Help:Protocols/Transformation*. Obtenido de <https://parts.igem.org/Help:Protocols/Transformation>

- iGEM Organization. (2020). *Parts iGEM*. Obtenido de Ribosome binding sites:
https://parts.igem.org/Ribosome_Binding_Sites
- iGEM-Valencia_UPV. (2018). *WIKI-Printeria*. Obtenido de MODEL :
http://2018.igem.org/Team:Valencia_UPV/Model
- Islam, M. N. (21 de Noviembre de 2018). In vitro study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* volume. doi:<https://doi.org/10.1186/s41938-018-0097-1>
- Kaushik, M. P. (2015). Ferric Uptake Regulator (FUR) protein: properties and implications in cyanobacteria. *Annals of Microbiology*. doi:10.1007/s13213-015-1134
- Kipngetich, C. D. (2017). Influence of the ferric uptake regulator (Fur) protein on pathogenicity in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. *PLOS ONE*. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177647>
- Knight, T. (2003). *Help:Standards/Assembly/RFC10*. Obtenido de <https://parts.igem.org/Help:Standards/Assembly/RFC10>
- Knight, T., Rettberg, R., Chan, L., Endy, D., Shetty, R., & Che, A. (2020). *Open Wetware*. Obtenido de Idempotent vector design for the standard assembly of Biobricks:
<https://openwetware.org/wiki/Special:RecentChanges?hidebots=1&limit=50&days=7&enhanced=1&urlversion=2>
- Koppert. (2020). *Marchitez Vascular*. Obtenido de *Fusarium oxysporum*:
<https://www.koppert.ec/retos/control-de-las-enfermedades/marchitez->

- Martínez, A. (2012). *Repositorio UTA* . Obtenido de Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. para contros biológico de *Fusarium* sp. en maracuya en condiciones in vitro:
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3069/3/BQ.35.pdf>
- Masaaki Furuno, T. K. (2003). CDS Annotation in Full-Length cDNA Sequence. *Genome Research*.
- MedlinePlus. (2020). *¿Que es un gen?* Obtenido de <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/basics/gene/>
- Molina, B., & Gavilanes, Q. (2017). *LAS EXPORTACIONES DE BANANO, SU IMPACTO EN LA ECONOMÍA ECUATORIANA DURANTE LOS AÑOS 2002 AL 2012*. Obtenido de <https://www.bibliotecasdelecuador.com/Record/oai:localhost:123456789-185/Details>
- Monroe, M. A. (14 de 6 de 2014). *What is a plasmid*. Obtenido de <https://blog.addgene.org/plasmids-101-what-is-a-plasmid>
- Moon, C. X.-X. (14 de 01 de 2008). Genomic, genetic and structural analysis of pyoverdine-mediated iron acquisition in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC Microbiology*. doi:10.1186/1471-2180-8
- Morange, M. (2008). La importancia de la biología sintética. *Médecine Sciences*. doi:<https://doi.org/10.1051/medsci/2008245447>

- Neha Arya, A. R. (2018). Biocontrol Efficacy of Siderophore Producing Indigenous Pseudomonas Strains Against Fusarium Wilt in Tomato. *National Academy of Sciences India*. doi:10.1007/40009-018-0630-5
- Ochoa, J. (05 de 2015). *Patogenicidad de Fusarium oxysporum f.sp. quitoense en la sección Lasiocarpa del género Solanum*. Obtenido de <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2445>
- Oswald, N. (26 de 07 de 2016). *E.coli Electroporation vs Chemical Transformation*. Obtenido de <https://bitesizebio.com/10297/ecoli-electroporation-vs-chemical-transformation/>
- Palou, N. (15 de 7 de 2019). *El temido hongo que puede acabar con el banano se expande*. Obtenido de <https://www.lavanguardia.com/natural/si-existe/20190813/464040973876/hongo-mata-banano-bananero-colombia-fusarium-foc-r4t-platano.html>
- Peng Xu, A. V. (2012). ePathBrick: A Synthetic Biology Platform for Engineering Metabolic Pathways in E. coli. *ACS Synthetic Biology*. doi:10.1021/sb300016b
- Pérez, S. O. (2015). Pseudomonas fluorescens Migula, ¿control biológico o patógeno? *Revista de Protección Vegetal*, 30(3), 2.
- Picó, J. A.-M. (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*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.riai.2015.06.001>

- Rédly, G., & Poole, K. (2003). Pyoverdine-Mediated Regulation of FpvA Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a Probable Extracytoplasmic-Function Sigma Factor, Fpvl. *Journal of Bacteriology*. doi:10.1128/JB.185.4.1261-1265.2003
- Rettberg, R. (2003). *Registry of Biological Parts*. Obtenido de Part:BBa_B0010: http://parts.igem.org/Part:BBa_B0010
- Rettberg, R. (2003). *Registry of Standard Biological Parts*. Obtenido de https://parts.igem.org/Part:BBa_B0010
- Ringel, M., & Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microbial Cell*. doi:10.15698/mic2018.10.649
- Rodríguez, J. B. (2012). Simple DNA transformation in *Pseudomonas* based on the Yoshida effect. *Journal of Microbiological Methods*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.02.013>
- Saha, R. N. (2012). Microbial siderophores: a mini review . *Journal of Basic Microbiology*.
- Saltos, A. (14 de 9 de 2019). *Plantaciones de banano en alerta, Mal de Panamá asecha a América Latina*. Obtenido de <https://www.croplifela.org/es/>
- Santacruz, G. B. (2012). *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1). Obtenido de Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802012000100004

- Santoyo, G. . (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana*, 28(1).
- Sarge, Z. H. (1991). Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. doi:10.1101/gad.5.10.1902
- Schweizer, H. (1991). Escherichia-Pseudomonas shuttle vectors derived from pUC18/19. *GENE*.
- Schweizer, H. P. (1997). Design of Bacterial Hosts for lac-Based Expression Vectors. (R. Tuan, Ed.) *Methods in Molecular Biology*, 64. doi:https://doi.org/10.1385/0-89603-480-1:17
- Scitable. (2020). *Nature education* . Obtenido de <https://www.nature.com/scitable/definition/plasmid-plasmids-28/>
- Sexton, R. G. (1996). Transcriptional regulation of the iron-responsive sigma factor gene pbrA. *Molecular Genetics*. doi:Sexton, R., Gill, P. R., Dowling, D. N., & O’Gara, F. (1996). Transcriptional regulation of the iron-responsive sigma factor genepbrA. *MGG Molecular & General Genetics*, 250(1), 50–58. doi:10.1007/bf02191824
- Sexton, R. P. (1995). Iron responsive gene expression im *Pseudomonas fluorescens* M114; cloning and characterization of a transcription activator factor, PbrA. *Molecular Microbiology*. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02244.x.

Sexton., G. P. (1995). *GenBank: X79908.1*. Obtenido de Iron-responsive gene expression in *Pseudomonas fluorescens* M114: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/X79908>

Shields, L. (2021). *Clone using the Digest and Ligate Assembly Wizard*. Obtenido de <https://help.benchling.com/en/articles/671274-clone-using-the-digest-and-ligate-assembly-wizard>

Siamak & Zheng. (2018). Banana Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) Control and Resistance, in the Context of Developing Wilt-resistant Bananas Within Sustainable Production Systems. *Horticultural Plant Journal*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.001>

Sivamani & Gnanamanickam. (1987). Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and Soil* 107, 3-9. doi:[10.1007/BF02371537](https://doi.org/10.1007/BF02371537)

Smadar, T., & Davidson, E. H. (2009). Modeling the dynamics of transcriptional gene regulatory networks for animal development. *Developmental Biology*. doi:doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.043

Sotomayor, I. (2012). *Revista de Ciencia e Investigación*. Obtenido de La raza tropical 4 de Mal de Panamá: Amenaza potencial para la Industria Bananera y Platanera del Ecuador: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3373/1/BD-418.pdf>

Sumei Yu, C. T. (2017). Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Microbiology*, 1. doi:[10.1007/s12275-017-7191-z](https://doi.org/10.1007/s12275-017-7191-z)

- Tapia, C., & Amaro, J. (2020). *Retrato Microbiológico*. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n1/art12.pdf>
- Team:ECUST/Iron_Sensing. (2018). Obtenido de http://2018.igem.org/Team:ECUST/Iron_Sensing
- Troxell, B., & Hassan, H. (2 de 10 de 2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Cellular and Infection Microbiology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00059>
- Universidad de Jaén. (8 de 1 de 2009). *Matema*. Obtenido de Departamento de Matemáticas:
http://matema.ujaen.es/jnavas/web_modelos/pdf_mmb08_09/texto%20completo.pdf
- Universidad Industrial de Santander. (20 de 07 de 2020). *Estequiometría*. Obtenido de <https://www.docsity.com/es/matriz-estequiometrica/5745807/>
- Valencia, E. V. (2005). Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* Zum80. *Terra Latinoamericana*, 23(1). Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/573/57323111.pdf>
- Vanguardia, L. (2019). *El temido hongo que puede acabar con el banano se expande*. Obtenido de <https://www.lavanguardia.com/natural/si-existe/20190813/464040973876/hongo-mata-banano-bananero-colombia-fusarium-foc-r4t-platano.html>
- Vásquez, L., & Castaño, J. (2017). *Repositorio UNAM*. Obtenido de Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión:

<https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-udca-actualidad-divulgacion-cientifica/articulo/manejo-integrado-de-la-marchitez-vascular-del-tomate-fusarium-oxysporum-f-sp-lycopersici-sacc-w-c-snyder-h-n-hansen-una-revision>

Vega de Prada, J. M., & Liñán, A. (20 de 4 de 2016). *Archivo Digital UPM*. Obtenido de <http://oa.upm.es/1007/>: <http://oa.upm.es/1007/>

Venner, C., & Hernández, M. J. (2009). *AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EN CULTIVOS DE UCHUVA (Physalis peruviana L.) CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA FRENTE A Fusarium sp.* Obtenido de Repositorio Universidad Javeriana: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8471/tesis435.pdf?sequence=1>

Vignoni, A. (2020). *Modeling: ODEs and Hill Functions Section 1: ODEs, Law of mass action and the central dogma*. Obtenido de iGEM Measurement Committee Webinar: https://2020.igem.org/wiki/images/a/a5/Webinar_2a_Presentation.pdf

Visca, P. F. (2007). Pyoverdine Synthesis and its Regulation in Fluorescent Pseudomonads. En A. V. Chincholkar, *Microbial Siderophores* (Vol. 12). Springer.

World Library of Science. (2020). *Glossary Promoter*. Obtenido de <https://www.nature.com/wls/definition/promoter-259/#:~:text=Promoter%20sequences%20are%20DNA%20sequences,of%20the%20transcription%20initiation%20site.>

World Library of Science. (2020). *Glossary Terminator*. Obtenido de <https://www.nature.com/wls/>

Yanes, M. (03 de 12 de 2020). *Caracterización de una cepa de Pseudomonas fluorescens promotora del crecimiento vegetal*. Obtenido de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/8857/1/uy24-17276.pdf>

Zapata, S. Z. (17 de Junio de 2019). *Manejo integrado del mal de Panamá [Fusarium oxysporum Schlechtend.].* Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v22n2/0123-4226-rudca-22-02-e1240.pdf>