



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



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

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

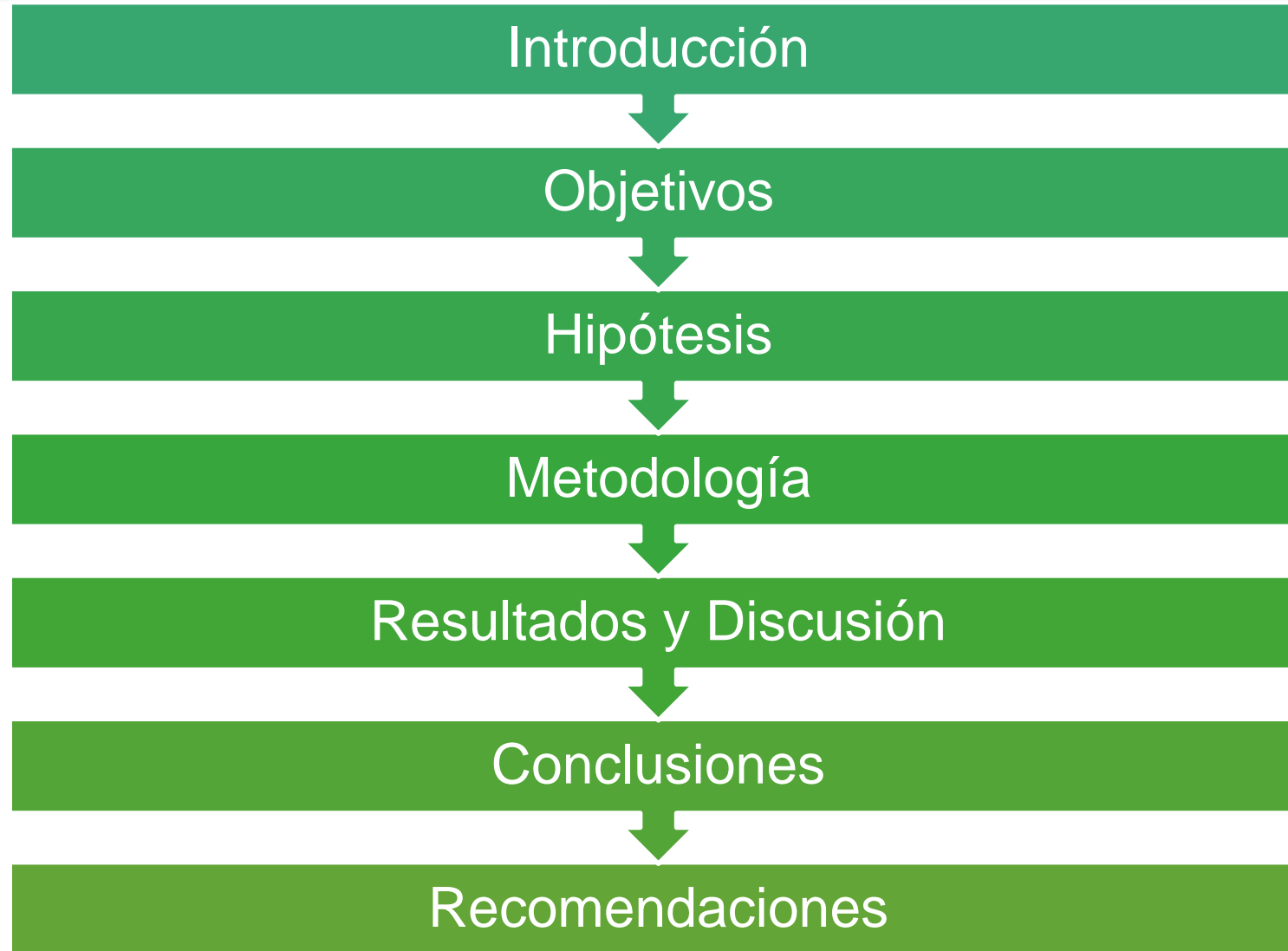
**“Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen *SIX* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1).”**

**Elaborado por:** Cornejo Rosado, Anahí Grace

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

Sangolquí, Septiembre 2022



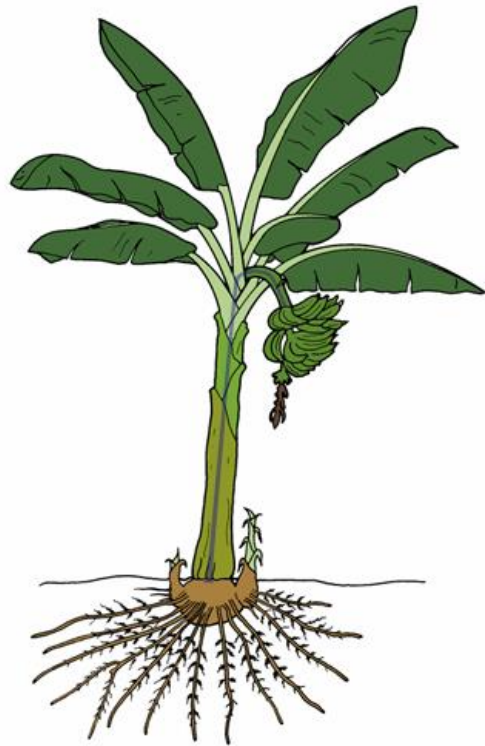


# INTRODUCCIÓN



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

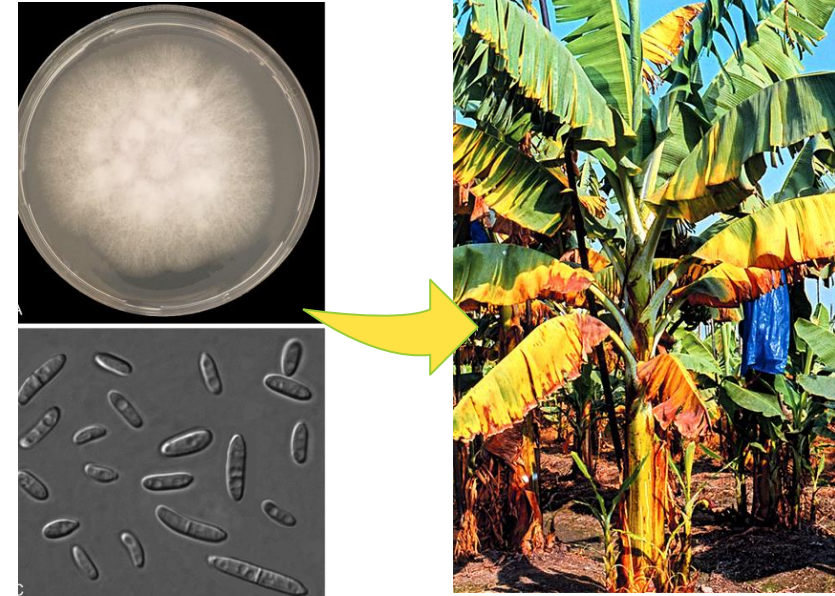
## Banano- Importancia económica en Ecuador



Familia: Museceae

- Entre los cultivos de mayor consumo, después del arroz y el maíz.
- 2016-2018: Ecuador primer exportador a nivel mundial (FAO, 2019).
- 36% producción global

## *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc)



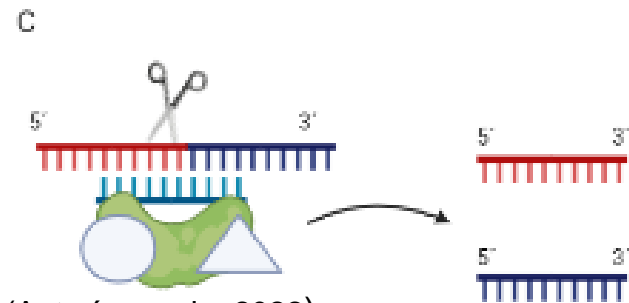
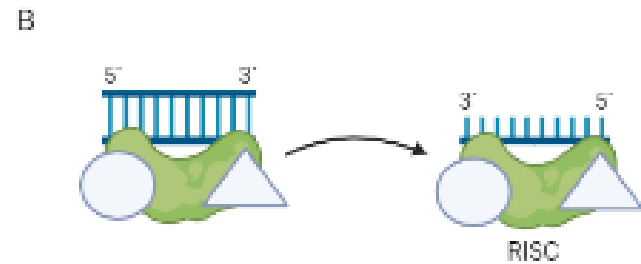
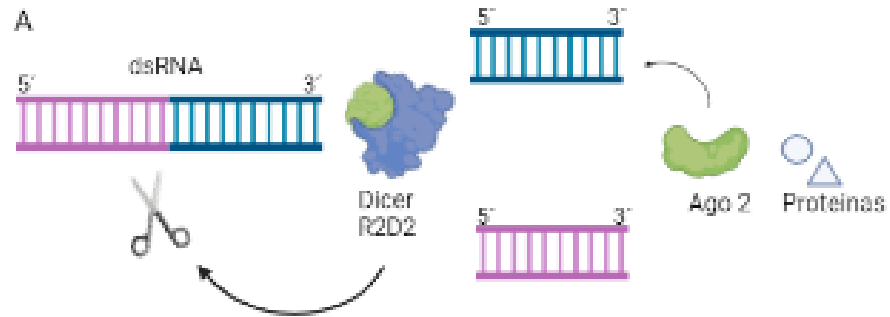
- Foc R1: Atacó a Gros Michel – Reemplazo con Cavendish
- Foc R4: Atacó a Cavendish – ¿Solución?

(Maymon *et al.*, 2020)



## RNA de interferencia (iRNA)

Mecanismos de acción de siRNA.



(Autoría propia, 2022)

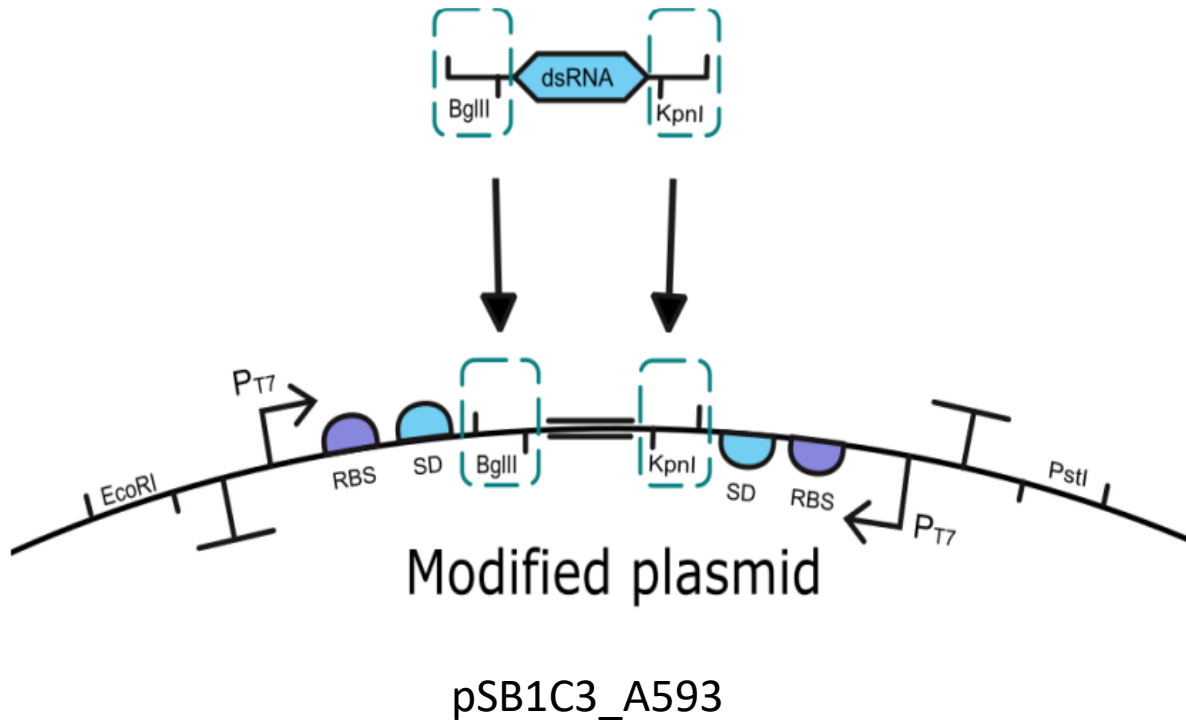
iRNA se puede usar para el desarrollo de **bioplaguicidas** que silencien de manera específica genes de virulencia o viabilidad del hongo.



## Genes *SIX* (Secreted in Xylem)

- Gen envuelto en la patogenicidad del hongo
- Usado exitosamente usado en ensayos de RNAi
- Presentar homología entre Foc R4 y Foc R1

**Figura 1.**  
Diseño de la plataforma modular AgroBactory 593.



**Tabla 1.**  
Partes básicas utilizadas en el diseño de la plataforma modular AgroBactory 593.


Nombre	Descripción	Repositorio iGEM
Backbone	pSB1C3	
Shine-Dalgarno -SD	Ayuda al ribosoma a encontrar su posición de inicio antes del codón de inicio	BBa_K3893000 BBa_K3893021 (reverso)
Sitio de unión al ribosoma -RBS	Lugar de unión del ribosoma al ARNm	BBa_B0034 BBa_K3893019 (reverso)
Promotor T7	Promotor específico que transcribe solo por la ARN polimerasa T7	BBa_I712074 BBa_K3893020 (reverso)
Secuencia de codificación -CDS	Secuencia que va a ser usada para la producción de dsRNA que silencie al gen <i>SIX</i>	BBa_K3893004
Terminador	Punto de finalización de la transcripción	BBa_K3893006
Sitios de restricción	Puntos de corte usados para ingresar el CDS (BglII y KpnI)	

# OBJETIVOS




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


## Objetivo general

 Ensamblar un plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen *SIX* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1).

## Objetivos específicos

 Obtener un biobrick del gen *SIX* mediante ensamblaje de restricción y ligación.

 Ensamblar el plásmido para la producción de dsRNA mediante técnicas de restricción y ligación.

 Transformar *Escherichia coli* cepa HT115 con el plásmido ensamblado para producir dsRNA objetivo.





# HIPÓTESIS



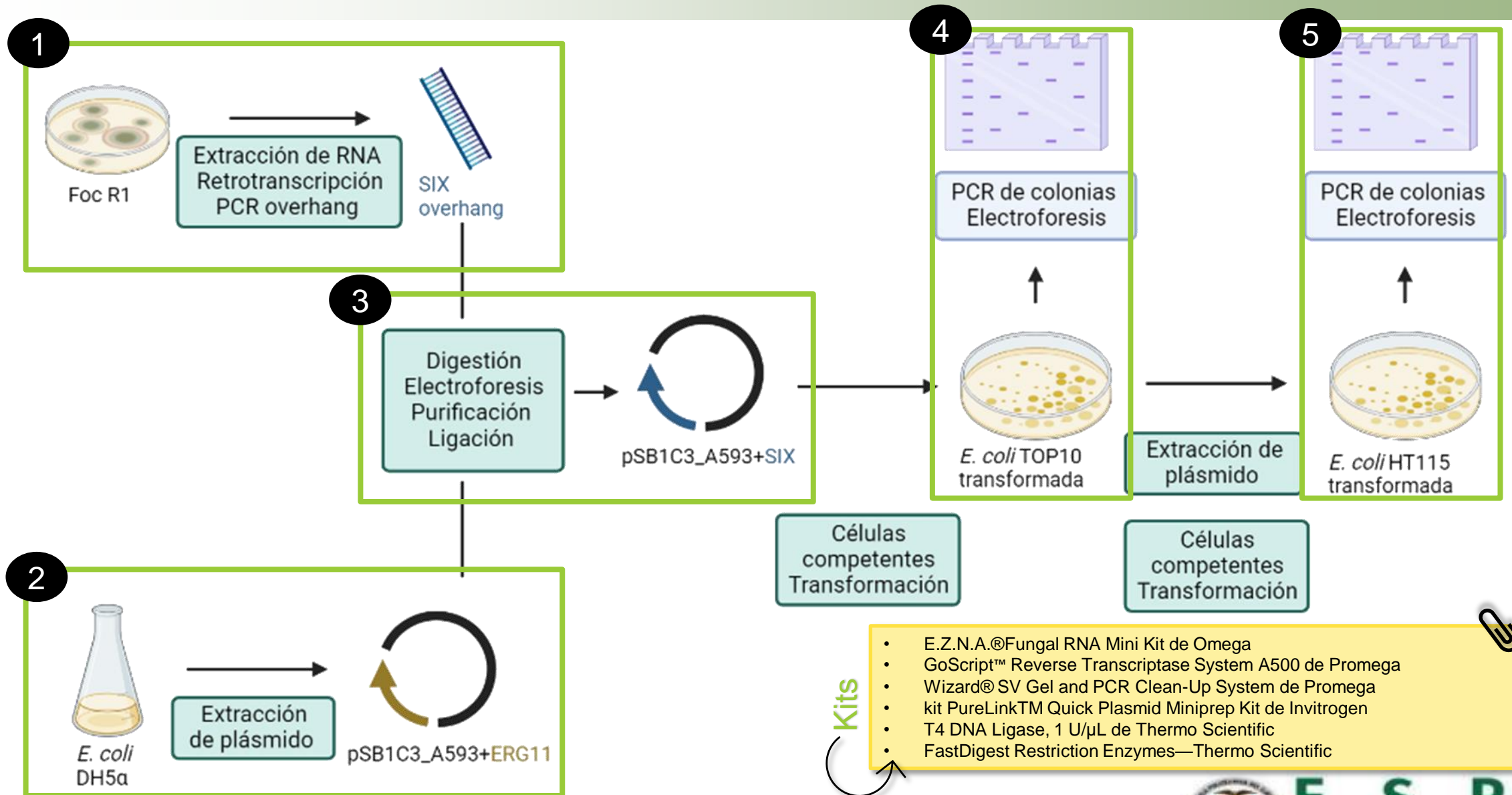
**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## Hipótesis de investigación

La eficiencia de transformación presenta diferencias significativas al variar la masa de plásmido pSB1C3\_A593+SIX añadido a las células competentes de *Escherichia coli* para su posterior transformación.



# METODOLOGÍA

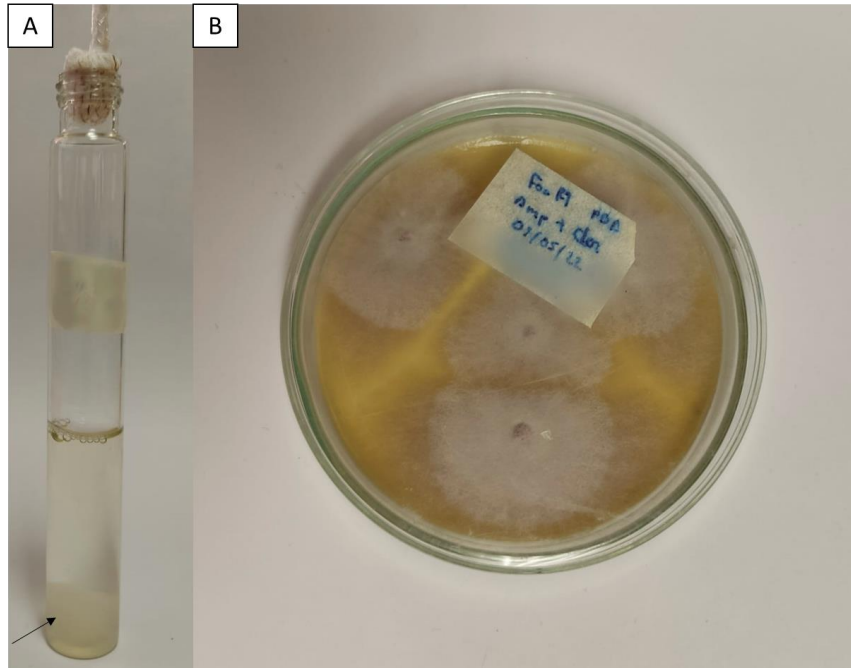


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

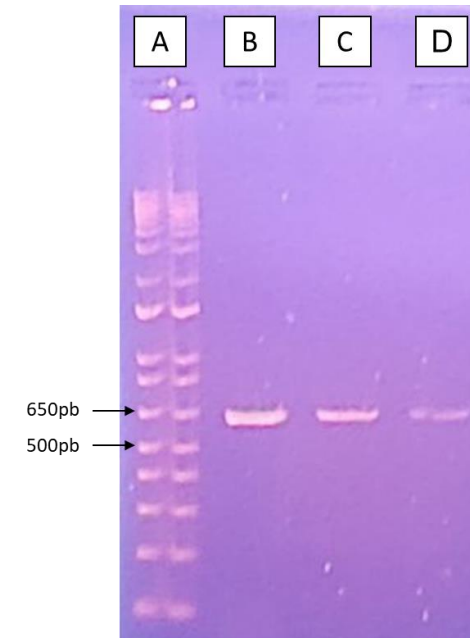


## 1. Crecimiento Foc R1, Extracción RNA, Retrotranscripción , PCR overhang

**Figura 2.** Crecimiento de Foc R1 en A) PDB B) PDA



**Figura 3.** Amplificación gen SIX overhang a diferentes temperaturas de annealing



**Tabla 2.** Concentración y pureza de muestras de cDNA obtenido de Foc R1

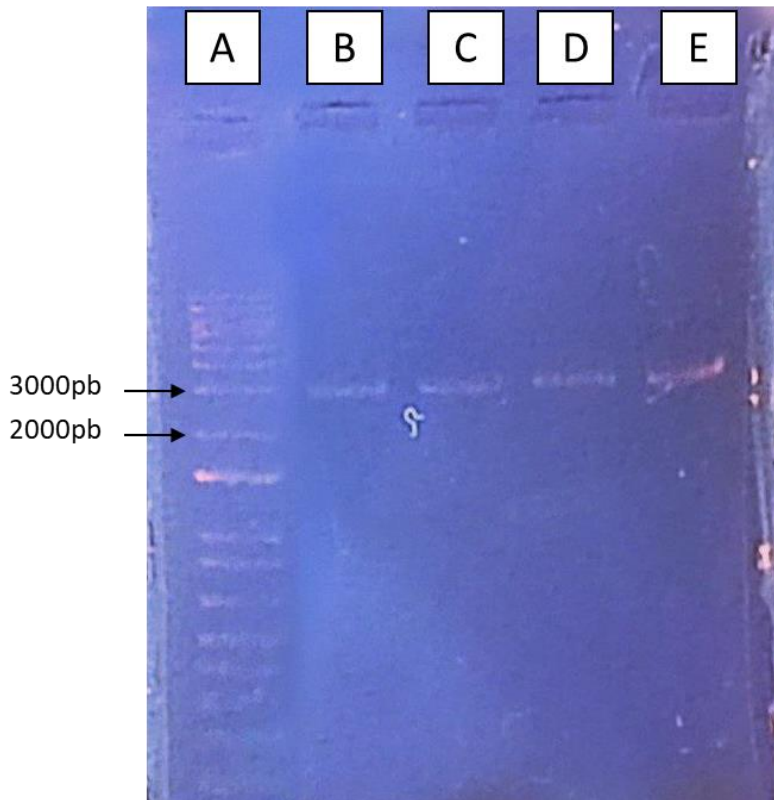
Muestra cDNA	Concentración (ng/ul)	A260	A280	260/280	260/230
cDNA Foc R1	873.3	17.46	10.788	1.62	1.96
cDNA Foc R1 dilución 1	298	5.959	3.642	1.64	1.90

**Tabla 3.** Primers utilizados para la PCR overhang

Nombre	Secuencia de oligonucleótido	Sitio de Restricción
dsRNA_SIX1_F_2	5'AAA <b>AGATCT</b> AGACACACATCTAGGCGA3'	BglII
dsRNA_SIX1_R_2	5'AA <b>GGTACC</b> ACCTTGAGCAATTCGACC3'	KpnI

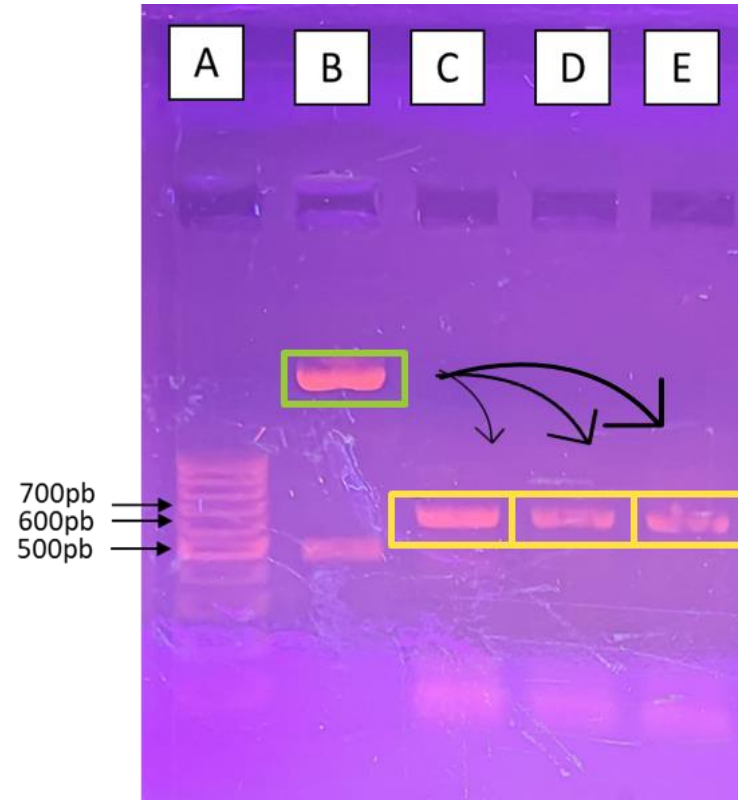
## 2. Extracción del plásmido

**Figura 4.** Extracción del plásmido *pSB1C3\_A593+ERG11*



## 3. Digestión plásmido *pSB1C3\_A593+ERG11* y *SIX* overhang

**Figura 5.** Digestión del plásmido *pSB1C3\_A593+ERG11* y genes *SIX*

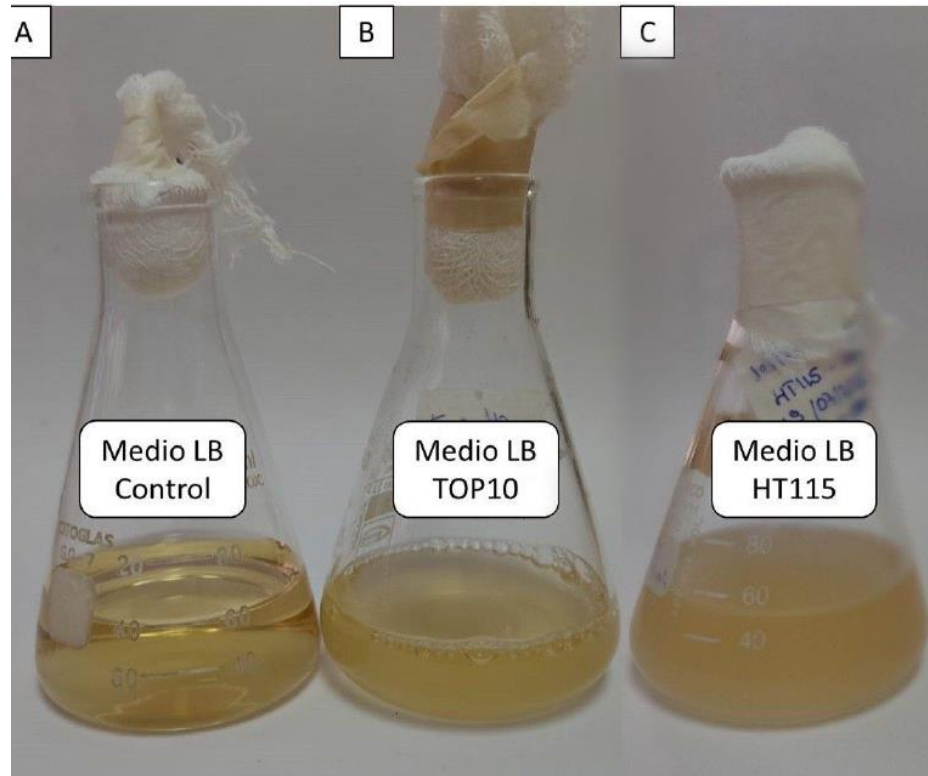


**Tabla 4.** Tamaños obtenidos tras la digestión del plásmido *pSB1C3\_A593+ERG11* y gen *SIX*

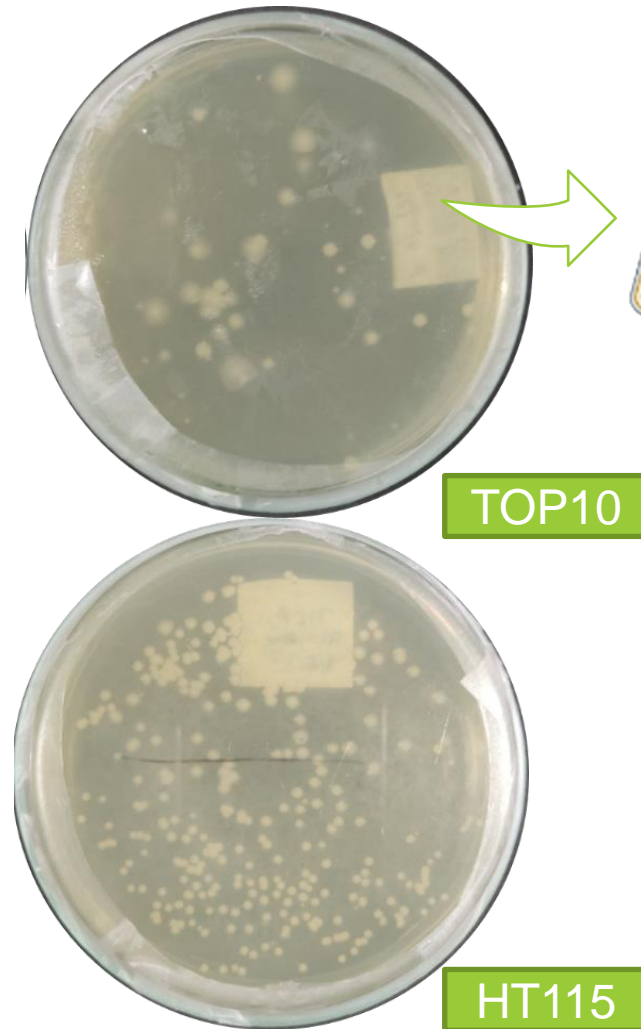
Fragmento	Tamaño (pb)
<i>pSB1C3_A593+ERG11</i>	2857
<i>pSB1C3_A593+ERG11</i> digerado (banda grande)	2386
<i>pSB1C3_A593+ERG11</i> digerado (banda pequeña)	471
Amplicón <i>SIX</i> overhang digerado	631

## 4, 5. Preparación de células competentes y transformación en *E. coli* TOP10 y HT115

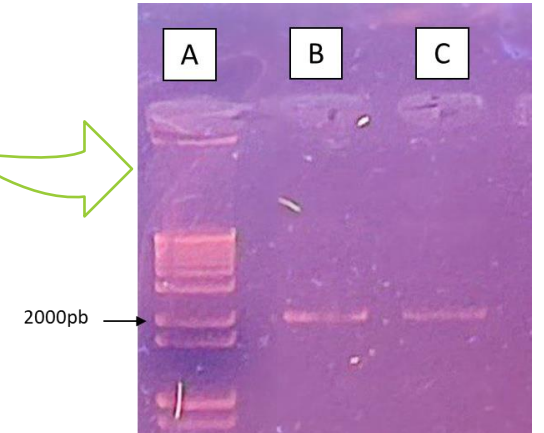
**Figura 6.** Cultivos de *E. coli* usados en la preparación de células competentes



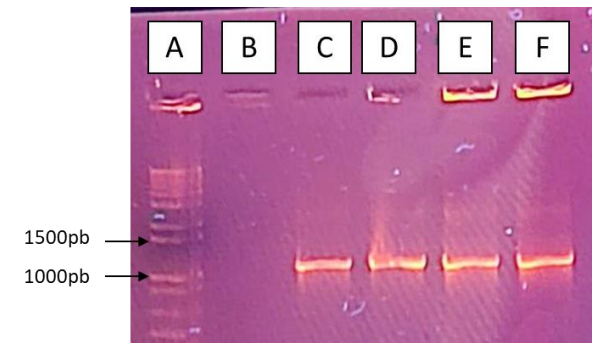
**Figura 7.** Transformaciones en *E. coli*



**Figura 8.** Extracción de plásmido pSB1C3\_A593+SIX



**Figura 9.** PCR de colonias de *E. coli* TOP10





## 6. Diseño Experimental

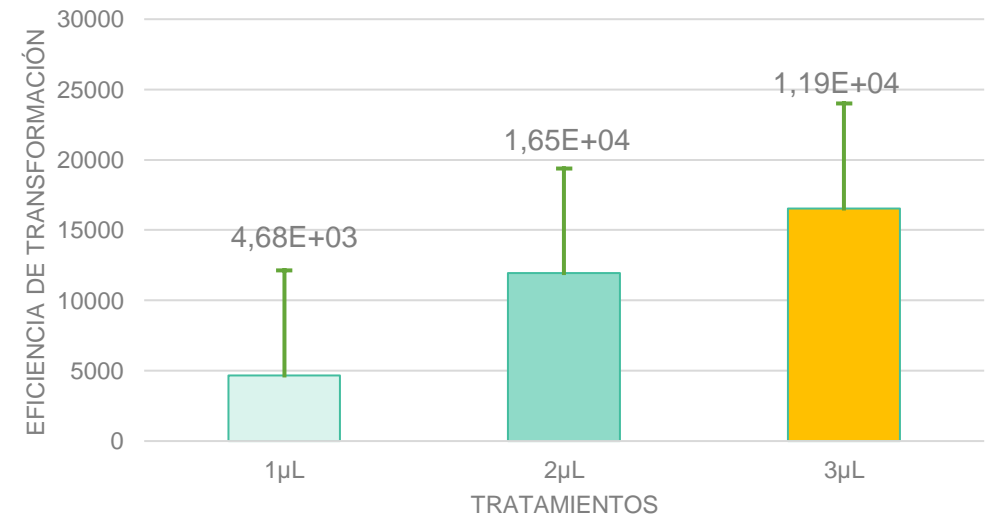
**Tabla 5.** Eficiencia de transformación obtenida para el diseño experimental.

Repetición #	EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN		
	1 ul	2ul	3ul
1	1,31E+03	5,55E+03	1,74E+03
2	0,00E+00	0,00E+00	1,31E+03
3	3,27E+03	2,55E+04	4,35E+04
4	0,00E+00	0,00E+00	1,07E+04
5	0,00E+00	2,94E+03	6,75E+03
6	2,35E+04	6,53E+04	7,62E+03
Control negativo	0	0	0
<b>PROMEDIO</b>	<b>4,68E+03</b>	<b>1,65E+04</b>	<b>1,19E+04</b>

**Tabla 6.** ANOVA de la eficiencia de transformación

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	F TAB	p value
TRATAMIENTO	2	429414510	214707255	0,64299	3,68232	0,53961
ERROR	15	5008797470	333919831			
TOTAL	17	5438211980				

**Eficiencia de transformación**



# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES





Se ensambló un plásmido conformado por el gen de virulencia *SIX* de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raza 1 y el plásmido pSB1C3\_A593 mediante un ensamblaje con la técnica de restricción y ligación. El plásmido generado se lo nombró como pSB1C3\_A593+SIX.



Se utilizó el cDNA extraído a partir de Foc R1 para conseguir un amplicón del gen *SIX* mediante la técnica de PCR overhang, la cual añadió los sitios de restricción para KpnI y BglII a cada extremo del fragmento del gen de interés. De esta manera, el amplicón se volvió compatible con la plataforma modular de AgroBactory 593.





Se transformó por choque térmico la *cepa TOP10 de Escherichia coli* con el plásmido pSB1C3\_A593+SIX. El plásmido se replicó en la bacteria y se extrajo para realizar la segunda transformación. La transformación de *E. coli* cepa HT115 produjo crecimiento de colonias bacterianas en el medio agar LB suplementado con cloranfenicol, sin embargo, la PCR de colonias no generó resultados positivos. Esto pudo ser producto de varios factores como la elección de colonias satélites para realizar la PCR de colonias, la ineficacia del antibiótico usado o la contaminación de los reactivos utilizados.



De acuerdo al análisis de varianza no existe diferencia estadística significativa (valor p: 0,5396) en la eficiencia de transformación de *Escherichia coli* al variar la masa del plásmido pSB1C3\_A593+SIX añadido a las células competentes para su posterior transformación. Esto fue corroborado por la prueba Duncan (alfa: 0.05) que mostró los tres tratamientos en un solo grupo.



Se recomienda:

- Utilizar el método de secuenciación de DNA Sanger para secuenciar el plásmido pSB1C3\_A593+SIX con el fin de verificar el correcto ensamblaje del mismo.
- Utilizar el método de electroporación para la transformación de *Escherichia coli*, para maximizar la eficiencia de transformación.
- Realizar los procesos de digestión, ligación y transformación de manera consecutiva y de recorrido, para evitar procesos de degradación durante el almacenamiento entre proceso y proceso.

# AGRADECIMIENTOS



Francisco Flores, PhD.  
**Director del proyecto**

Silvana Granda, M. Sc.  
**Laboratorista**



Equipo de Agrobactory

**FAMILIA Y AMIGOS**

