



**Construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen
RIN4 asociado a la resistencia de fusariosis en banano.**

Guamán Cañar, Carolina Sthefanya

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 Biotecnóloga

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

29 de agosto de 2023

Certificación Copyleaks



GUAMÁN_CAROLINA_PROYECTO_DE_T...

Scan details

Scan time:
August 26th, 2023 at 18:53 UTC

Total Pages:
54

Total Words:
13308

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.7%	89
Minor Changes	0%	0
Paraphrased	1.3%	174
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text



FRANCISCO JAVIER
FLORES FLOR

Flores Flor, Francisco Javier

Tutor de tesis



Departamento de Ciencias de la vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de Integración curricular: "Construcción de un vector plasmidico para la edición genética del promotor del gen RIN4 asociado a la resistencia de fusariosis en banano" fue realizado por la señorita Guzmán Cañar, Carolina Sthefanya, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 13 de septiembre del 2023



FRANCISCO JAVIER
FLORES FLOR

Flores Flor, Francisco Javier

C. C.:1713443479



Departamento de Ciencias de la vida y de la Agricultura
Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo **Guamán Cañar, Carolina Sthefanya**, con cédula de ciudadanía n° 1105946006, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RIN4 asociado a la resistencia de fusariosis en banano** 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, 13 de septiembre del 2023

Guamán Cañar Carolina Sthefanya

C.C.: 1105946006



Departamento de Ciencias de la vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Guamán Cañar, Carolina Sthefanya**, con cédula de ciudadanía n° 1105946006, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RIN4 asociado a la resistencia de fusariosis en banano**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 13 de septiembre del 2023

Guamán Cañar Carolina Sthefanya

C.C.: 1105946006

Dedicatoria

A mi familia, en especial a mis padres, José y Rosa. Su amor incondicional y apoyo constante me han proporcionado las alas necesarias para crecer académicamente. A lo largo de este viaje foráneo, su respaldo inquebrantable ha sido la fuerza que me impulsó a superar todos los desafíos.

A mi querida hermana, Pamela. Ella ha sido mi fuente de inspiración y un recordatorio constante de la persona en la que aspiro a convertirme en el futuro. Su determinación y pasión por la vida son un faro que siempre me guía.

A mi pequeño hermanito, Alexander, le agradezco por ser mi motor de arranque en esta travesía llamada vida. Tu energía y entusiasmo son un recordatorio diario de la maravilla que es explorar el mundo con ojos nuevos.

Este logro y los que vendrán son de ustedes también.

Carolina Guamán

Agradecimientos

A INIAP de Pichilingue, agradezco por su generosidad y visión al proporcionar los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

A mi tutor, el Dr. Francisco Flores, quiero expresar mi admiración por su disciplina profesional. Sus conocimientos y orientación fueron la brújula que me guio a lo largo de este viaje académico y me permitió avanzar con confianza.

A mi querida familia y amados tíos, por cargar los sueños conmigo, su inquebrantable apoyo me hizo sentir segura y querida en todo momento.

A mis amigos de la universidad, Paúl, Doménica, Karolay, Uwe, Nadin, Nayeli, Jesús, Leslie, Melany y José les agradezco por compartir risas, aventuras, crisis existenciales y por recordarme que la vida es mucho más que libros y laboratorios. Los recuerdos que hemos creado juntos los atesoraré toda mi vida.

A mis compañeros de tesis, Abigail y Jesús, por los momentos divertidos y desafiantes que compartimos, los días de planificación y laboratorio no hubiesen sido tan enriquecedores sin ustedes.

Agradezco a iGEM Biotech Ec, IEEE-ESPE y WIE-ESPE por ser los grupos universitarios donde no sólo desarrollé crecimiento personal y profesional significativo, sino también amistades que estoy segura perdurarán durante muchos años.

Finalmente, este logro no habría sido posible sin mi valentía y consciencia de que el éxito se logra mediante el trabajo arduo y constante.

Índice de contenido

Certificación Copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de contenido	8
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras	13
Resumen	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción	16
Formulación del problema	16
Justificación del problema.....	16
Objetivos.....	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos.....	17
Hipótesis	18
Capítulo II: Marco teórico.....	19
Fusarium.....	19
Fusarium oxysporum f.sp. cubense raza 4 (FocR4T)	20

Estrategias para el combate de FocR4T	20
Herramientas biotecnológicas en el desarrollo de cultivares tolerantes a FocR4T	20
Edición genética en plantas	22
Sistema CRISPR-Cas9	22
Elementos del sistema CRISPR-Cas9.....	23
Diseño de sgRNA.....	25
Ensamblaje Golden Gate	26
Transformación	27
RIN4.....	28
Capítulo III: Materiales y métodos	29
Zona de estudio.....	29
Reconocimiento del gen RIN4 en el genoma <i>Musa acuminata</i>	29
Búsqueda de promotores putativas para el gen RIN4	30
Diseño de RNA guías.....	31
Alineación de oligos <i>in vitro</i>	32
Construcción <i>in silico</i> mediante la metodología Golden Gate (GG) utilizando el sistema modular de clonación (MoClo)	34
Cultivo de Bacterias Portadoras de Plásmidos en Placas Petri.....	35
Extracción de ADN plasmídico	36
Método: Miniprep PureLink ^{TK} HiPure Plasmid DNA Purification	36
Método: Extracción casera.....	37
Cuantificación y análisis de calidad de ADN	38

	10
Diseño de primers para PCR de colonias	39
Construcción del nivel 0	40
Reacción in vitro de digestión y ligación para nivel 0	40
<i>Preparación de células químicamente competentes para cepas DH5 y Top10.....</i>	<i>41</i>
Transformación en cepas DH5α y Top10	42
Confirmación del ensamblaje L0.....	43
Construcción del nivel 1	44
Reacción in vitro de digestión y ligación para nivel 1	44
Transformación de L1.....	45
PCR colony del ensamblaje L1	45
<i>Siembra del plásmido L1 ensamblado en medio líquido y extracción plasmídica</i>	<i>47</i>
Construcción del nivel 2.....	47
Reacción in vitro de digestión y Ligación para nivel 2.....	47
Protocolo de Transformación L2 con JM109	49
Capítulo IV: Resultados	50
Identificación del gen RIN4	50
Blasteo del gen RIN4 en Musa acuminata	51
Elección del ARN guía	52
Ensamblaje <i>in silico</i> de los niveles 0, 1 y 2	53
Crecimiento de bacterias contenedoras de plásmidos	55
Extracción y cuantificación de ADN plasmídico	63

	11
Validación de plásmidos	66
Capítulo V: Discusión.....	69
Reconocimiento de la zona promotora	69
Diseño del ARN guía.....	70
Ensayos de PCR de colonias	72
Extracción de ADN plasmídico	74
Eficiencia de transformación.....	74
Capítulo VI: Conclusiones	77
Capítulo VII: Recomendaciones.....	78
Capítulo VIII: Bibliografía	79

Índice de Tablas

Tabla 1 Herramientas en el desarrollo de cultivares tolerantes a FocR4T	21
Tabla 2 Biblioteca de posibles promotores para el gen RIN4	30
Tabla 3 Biblioteca de RNA guías diseñados para promotores putativos de RIN4.....	31
Tabla 4 Reacción de hibridación de oligonucleótidos.....	33
Tabla 5 Biblioteca de plásmidos empleados para las construcciones de los niveles 0, 1 y 2	35
Tabla 6 Primers empleados en la reacción de PCR colony	39
Tabla 7 Reacción de corte y ligación para el ensamblaje de L0	40
Tabla 8 Programa del termociclador para reacciones de digestión y ligación	41
Tabla 9 Reacción de corte enzimático del plásmido L0 ensamblado	44
Tabla 10 Reacción de corte y ligación para el ensamblaje de L1	44
Tabla 11 Master Mix para la Reacción de PCR.....	46
Tabla 12 Programa del termociclador para PCR colony	47
Tabla 13 Reacción de corte y ligación para el ensamblaje de L2	48
Tabla 14 Resultados del blasteo del CDS del gen RIN4 en blastn	51
Tabla 15 sgRNA diseñados para ensayos in vitro CRISPR/Cas9 en Musa acuminata.....	52
Tabla 16 Número de colonias transformadas en el nivel L0.....	57
Tabla 17 Número de colonias transformadas en el nivel L1.....	57
Tabla 18 Número de colonias transformadas en el nivel L0.....	57
Tabla 19 Anova de la eficiencia de transformación para la cepa DH5 α de los tres niveles de construcción plasmídica	58
Tabla 20 Análisis Tuckey de la eficiencia de transformación para la cepa DH5 α de los tres niveles de construcción plasmídica	58
Tabla 21 Anova de la eficiencia de transformación para las 3 cepas <i>E. coli</i> del nivel L2.....	59
Tabla 22 Análisis Tuckey de la eficiencia de transformación	60
Tabla 23 Resultados de medición de ADN a partir de extracción con Kit comercial	63
Tabla 24 Resultados de medición de ADN a partir de extracción casera	64
Tabla 25 Resultados de medición de ADN plasmídico de los niveles L0, L1, L2	64

Índice de Figuras

Figura 1 Esquema del sistema CRISPR-Cas9	24
Figura 2 Esquema de un ensamblaje MoClo	26
Figura 3 Hibridación de oligos	34
Figura 4 Protocolo de transformación bacteriana	43
Figura 5 Secuencia codificante del gen RIN4 en Musa acuminata	50
Figura 6 Marcos abiertos de lectura para la secuencia codificante del gen RIN	51
Figura 7 Mapa de la construcción plasmídica del nivel L0	53
Figura 8 Mapa de la construcción plasmídica del nivel L1	54
Figura 9 Mapa de la construcción plasmídica del nivel L2	54
Figura 10 Crecimiento celular de bacterias en medio LB + Antibiótico	55
Figura 11 Crecimiento celular de bacterias en medio LB + Antibiótico + IPTG + Xgal.....	56
Figura 12 Gráficos estadísticos de la eficiencia de transformación en los tres niveles de la cepa DH5 α	59
Figura 13 Gráficos estadísticos de la eficiencia de transformación en L2	60
Figura 14 Colonias del nivel L0 y L1 transformadas en DH5 α	61
Figura 15 Colonias de las distintas cepas transformadas para la construcción nivel L2.....	62
Figura 16 Colonias de la cepa DH5 transformada en nivel L2	62
Figura 17 Espectro de cuantificación de ADN para la construcción plasmídica L0	65
Figura 18 Espectro de cuantificación de ADN para la construcción plasmídica L1	65
Figura 19 Espectro de cuantificación de ADN para la construcción plasmídica L2	66
Figura 20 Perfil electroforético de la extracción plasmídica de los plásmidos base	67
Figura 21 Perfil electroforético de la extracción de plásmidos del nivel L0.....	67
Figura 22 Perfil electroforético de la extracción de plásmidos del nivel L1	68
Figura 23 Perfil electroforético de la extracción de plásmidos del nivel L2.....	68

Resumen

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* raza 4 (Foc R4) es un hongo fitopatógeno de gran interés para la industria agrícola, la ingeniería genética mediante Crispr cas es una herramienta que permite editar genes para el mejoramiento vegetal. El objetivo de la presente tesis se centra en la construcción de un vector plasmídico que contenga una nucleasa, un promotor para monocotiledóneas y un ARN guía (sgRNA) dirigido a la zona promotora del gen RIN4, conocido por su implicación en la resistencia a la fusariosis. La metodología aplicada involucró el diseño de sgRNA, considerando criterios de especificidad, eficiencia de corte y minimización de efectos secundarios no deseados. Los componentes de los plásmidos se ensamblaron utilizando la técnica Golden Gate en múltiples niveles. La validación de cada producto final se realizó mediante marcadores de selección basados en antibióticos y el sistema de inducción LacZ. Luego, se evaluó la eficiencia de transformación en tres cepas de *Escherichia coli* utilizando el método de choque térmico, y se confirmaron los resultados mediante amplificaciones por PCR colony. Los hallazgos de esta investigación destacaron al sgRNA2 como la opción más adecuada para la construcción del vector plasmídico. Además, se identificó que la cepa JM109 mostró la más alta eficiencia de transformación entre las cepas evaluadas. Los análisis de este estudio sientan las bases para futuros estudios relacionados con la transferencia de plásmidos en *Agrobacterium*, como paso previo a la inserción de genes en plantas. En conjunto, esta investigación contribuye al desarrollo de estrategias de mejoramiento genético para abordar la resistencia a la fusariosis en plantas de *Musa acuminata*.

Palabras clave: Edición génica, Crispr cas9, Ensamblaje, Clonación modular, Eficiencia de transformación.

Abstract

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* race 4 (Foc R4) is a phytopathogenic fungus of great interest to the agricultural industry. Genetic engineering through CRISPR cas is a tool that allows gene editing for plant improvement. The objective of this thesis is focused on constructing a plasmid vector containing a nuclease, a promoter for monocotyledons, and a guide RNA (sgRNA) targeted to the promoter region of the RIN4 gene, known for its involvement in fusariosis resistance. The methodology involved sgRNA design, considering criteria for specificity, cutting efficiency, and minimizing unwanted side effects. Plasmid components were assembled using the Golden Gate technique at multiple levels. Validation of each final product was done using antibiotic-based selection markers and the LacZ induction system. Subsequently, the transformation efficiency was evaluated in three *Escherichia coli* strains using the heat shock method, and results were confirmed through colony PCR amplifications. The findings of this research highlighted sgRNA2 as the most suitable option for plasmid vector construction. Furthermore, it was identified that the JM109 strain exhibited the highest transformation efficiency among the strains evaluated. The analyses in this study lay the groundwork for future studies related to plasmid transfer in *Agrobacterium*, as a preliminary step for gene insertion in plants. Collectively, this research contributes to the development of genetic improvement strategies to address fusariosis resistance in *Musa acuminata* plants.

Keywords: Gene editing, Crispr cas9, Promoter, Modular cloning, Transformation efficiency.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Fusarium oxysporum forma especial *cubense* raza 4 tropical (FocR4T) es un fitopatógeno que representa una grave amenaza para diversos cultivos, incluyendo el banano y otras especies vegetales de gran importancia económica y alimentaria. La infección por FocR4T puede causar pérdidas significativas en la producción y calidad de los cultivos, impactando negativamente la seguridad alimentaria y la economía agrícola (Piñeiro, 2019).

Ante la falta de métodos efectivos para el control de FocR4, se han explorado diferentes estrategias de mejoramiento genético, incluyendo las técnicas de edición genética, como CRISPR/Cas9. No obstante, se requiere una evaluación exhaustiva para determinar su eficacia en mejorar la resistencia de los cultivos a la infección por FocR4.

El objetivo de esta investigación es diseñar un ARN guía complementario a una región promotora de un gen de resistencia a FocR4T para escalarlo a células y en un futuro a la planta de banano, por lo que podría tener un impacto significativo en la sostenibilidad y productividad de la agricultura a nivel local y global.

Justificación del problema

El banano es considerado uno de los alimentos más importantes para la seguridad alimentaria mundial (Petsakos et al., 2019), la variedad más comercializada es la de tipo Cavendish, con una relación del 47% de la producción mundial y un PIB Agrícola del 35% para Ecuador, llegándose a posicionar como el segundo producto de mayor exportación (León et al., 2022).

Cavendish surgió como un monocultivo resistente a la raza 1 de *Fusarium oxysporum* forma especial *cubense* (FocR1), reemplazando al cultivar Gros Michel (Figueroa, 2020). Sin embargo, la aparición del fitopatógeno FocR4T supone una nueva amenaza para la industria

bananera, ya que esta enfermedad carece de un tratamiento efectivo para su control (Palma, 2021). Su capacidad saprófita le permite sobrevivir en materia orgánica en descomposición y su propiedad endófito le ayuda a camuflarse en las raíces de otras especies para permanecer ahí como cuerpos de resistencia o clamidosporas durante 30 años en forma no patogénica, representando un riesgo de infección y dispersión para los clones (Sotomayor, 2012).

A pesar del monitoreo continuo de prevención fito y zoonosanitaria, la aparición tardía de la sintomatología por parte de FocR4T dificulta su detección, especialmente en los agricultores que carecen de las equipamiento especializado o limitaciones al acceso de laboratorios para reconocerlo con precisión (Khiyami et al., 2014). Ante este planteamiento, el mejoramiento genético emerge como una alternativa viable para desarrollar variedades resistentes/tolerantes a FocR4T. La aplicación de técnicas de edición genética, como CRISPR, podría garantizar una regulación precisa de la expresión de genes de resistencia en la planta debido a su alta especificidad (Pickar & Gersbach, 2019).

Objetivos

Objetivo general

Construir un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RIN4 asociado a la resistencia de fusariosis en banano.

Objetivos específicos

Diseñar un ARN guía dirigido a los promotores putativos del gen RIN4 de banano, mediante la identificación de sitios conservados de las posibles zonas promotoras utilizando herramientas bioinformáticas.

Ensamblar un plásmido que contenga la secuencia del ARN guía diseñado, una nucleasa y un promotor para monocotiledóneas utilizando clonación modular (MoClo), basada en el método Golden Gate (GG).

Transformar químicamente las cepas Top10, DH5 α y JM109 de *Escherichia coli* con el plásmido ensamblado.

Hipótesis

Existen diferencias significativas en la eficiencia de transformación del plásmido ensamblado conteniendo al ARN guía complementario a la región promotora del gen RIN4, en diferentes cepas de *Escherichia coli*.

H0: Las eficiencias de transformación en las tres cepas evaluadas son similares.

H1: Las eficiencias de transformación en las tres cepas evaluadas no son similares.

Capítulo II: Marco teórico

Fusarium

Fusarium es un género de hongos oportunistas que cuenta con más de 100 especies (Tapia & Amaro, 2014). Algunas de ellas con la capacidad de producir micotoxinas como tricotecenos y fumonisinas, mismas que generan impacto directo en la salud humana y producción animal (Magdama, 2019).

En el campo de la fitopatología, *Fusarium oxysporum* es una de las 10 especies de mayor relevancia económica y de trascendencia histórica en impacto agrícola, capaz de infectar a 58 especies de plantas susceptibles (Magdama, 2019). En específico, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) es capaz de causar enfermedad exclusivamente en banano (Figueroa, 2020).

Los síntomas comunes que genera este patógeno son marchitamiento vascular y pudrición (Bermúdez, 2014). El mecanismo de entrada empieza con la penetración del patógeno en las raíces del huésped hasta alcanzar los vasos del xilema del pseudotallo, donde coloniza hacia arriba reflejando obstrucción de haces vasculares, amarillamiento y marchitamiento progresivos de los tejidos de la planta, mismos que evolucionan en manchas necróticas de color marrón a negro hasta llegar al punto de la pudrición; el avance de la enfermedad es de hojas más viejas a hojas más jóvenes (Magdama, 2019) (Edel & Lecomte, 2019).

La dispersión principal de Foc ocurre por siembra de plántulas no certificadas, contaminación cruzada con zapatos, llantas de carro, agua de riego y maquinaria agrícola (Sotomayor, 2012).

Fusarium oxysporum f.sp. cubense raza 4 (FocR4T)

La raza 4 se subdivide en 2 subtipos: Subtropical (STR4) y Tropical (R4T). En el primer caso, STR4 puede inducir enfermedades en áreas subtropicales bajo la coincidencia de la presencia del patógeno y condiciones de estrés, como sequías y temperaturas bajas. Por otro lado, R4T es capaz de provocar enfermedades sin requerir factores de predisposición (Bermúdez, 2014).

La importancia económica de FocR4T radica en que afecta alrededor del 80% de todas las variedades de banano en el mundo (Buddenhagen, 2007). A pesar de las medidas de vigilancia fitosanitaria, esta raza se ha diseminado en numerosos países, incluyendo Indonesia, Taiwán, Malasia, Filipinas, China, Australia, Omán, Jordania, Mozambique, India, Vietnam, Pakistán, Líbano, Israel, Myanmar, Perú, Colombia y Venezuela, lo que representa una amenaza para la posible infección en Ecuador (Magdama, 2019).

Estrategias para el combate de FocR4T

El combate actual de FocR4T se efectúa en fase de prevención y fase de erradicación-confinamiento. En fase preventiva se recurre a un manejo integrado de factores como siembra certificada libre de patógenos, biofortalecimiento y la aplicación de herramientas biotecnológicas como las mencionadas en la Tabla 1. En esta última se incluye la resistencia varietal, inductores de resistencia en el hospedero y el desarrollo de cultivares tolerantes por herramientas biotecnológicas (Dita et al., 2010). Durante la etapa de erradicación-confinamiento, se emplea la eliminación de las plantas afectadas y la incineración de sus restos utilizando benzimidazol y glifosato (Rodríguez et al., 2013).

Herramientas biotecnológicas en el desarrollo de cultivares tolerantes a FocR4T

La identificación de marcadores tipo SCAR y QTLs en el genoma de musa, el reconocimiento de genes recesivos y dominantes que intervienen en la resistencia, vías y

mecanismos de defensa contra Foc constituyen una gran estrategia en programas de mejoramiento por selección (Swarupa et al., 2014).

Tabla 1

Herramientas en el desarrollo de cultivares tolerantes a FocR4T

Herramientas	Descripción
Hibridación de bananos	Se apoya en el entrecruzamiento de dos variedades o especies con caracteres de interés para generar descendencia con los genes de los parentales.
Variación somaclonal	Genera cambios heredables en los caracteres agronómicos empleando técnicas de cultivo de tejidos (Hwang & Ko, 2004).
Mutagénesis	Interviene en el tratamiento de ápices meristemáticos con mutágenos químicos, radiación ionizante, UV y agentes intercalantes para generar mutantes estables (Chen et al., 2013).
Transgénesis	Emplea el mecanismo de insertar y expresar un gen de resistencia al hospedero mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Swarupa et al., 2014).
RNA de interferencia	<i>Utiliza diferentes tipos de dsRNAs contra esporas de Foc para inhibir su proliferación</i> (Mumbanza et al., 2013).

Herramientas	Descripción
Cisgénesis	El hospedero recepta genes de resistencia R de la misma especie o su pariente más cercano por transferencia genética de entrecruzamiento (Swarupa et al., 2014).

Nota. Esta tabla muestra las estrategias empleadas para el desarrollo de cultivares resistentes a Foc, sin asegurar una alta efectividad. Adaptado de (Bermúdez, I) 2014.

Edición genética en plantas

La obtención de cultivares mejorados ha recorrido diversos métodos de edición, entre los que se encuentran las nucleasas de actividad similar al activador de transcripción (TALENs), las nucleasas de dos de ZINC (ZFN) y las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR), siendo esta última la de mayor eficiencia. Su mecanismo de intervención se basa en la ruptura de las dos hebras de ADN con su posterior reparación, momento en el cual se produce la edición genética deseada (Piñeiro, 2019).

Sistema CRISPR-Cas9

La primera detección del sistema CRISPR-Cas9 ocurrió en *Streptococcus pyogenes*, donde se reveló como un mecanismo de protección contra la invasión de bacteriófagos. Este sistema se fundamenta en el reconocimiento y corte preciso de una región de interés mediante el uso de un ARN guía y una nucleasa Cas9, respectivamente (Chávez, 2018).

El sistema CRISPR-Cas9 consta de tres etapas fundamentales: adaptación, expresión e interferencia. En la primera fase, el ADN foráneo, resultado de una infección viral o transformación, ingresa a la bacteria y es reconocido y cortado en fragmentos de diferentes tamaños. Estos fragmentos son incorporados aleatoriamente en los segmentos interespaciados de las repeticiones palindrómicas del locus CRISPR. En la siguiente etapa, se producen los

ARN CRISPR (crARN) a partir de los fragmentos previamente incorporados. Estos crARN tienen la característica de contener el motivo protoespaciador adyacente (PAM), que será complementario al sitio del ADN foráneo. A su vez, el crARN se hibrida con el crARN transactivador (tracrARN) para formar el ARN guía (sgARN). En la tercera fase, el sgARN se une a Cas9 para formar un complejo que dirigirá el corte en el ADN diana durante futuras infecciones (Concepción, 2018).

Una vez realizado el corte de la doble hebra (DSB) en la secuencia, el sistema de reparación celular asume la responsabilidad de generar la alteración genómica. En la reparación del ADN, se presentan dos enfoques distintos: la vía de la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la vía de reparación a través de la homología directa (HDR). En el caso del NHEJ, se lleva a cabo la ligación de los dos fragmentos de ADN bicatenario resultantes del DSB, lo que puede generar inserciones o deleciones que podrían conllevar a knockouts de genes (Ran et al., 2013). Por otro lado, la HDR se caracteriza por generar mutaciones deseadas al activarse únicamente en presencia de una secuencia molde exógena a insertar, consolidándose como un mecanismo de reparación preciso (Cong & Zhang, 2015).

Elementos del sistema CRISPR-Cas9

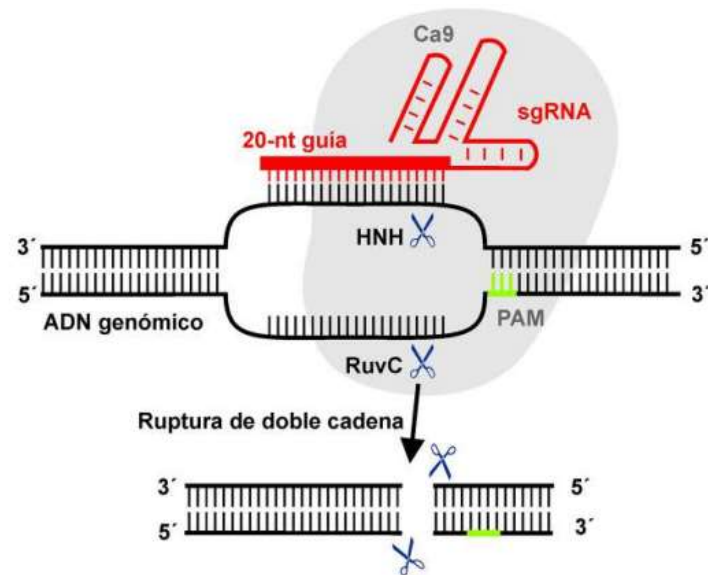
El sistema de interferencia CRISPR/Cas de clase II requiere únicamente tres componentes: la nucleasa Cas9, el crARN y el tracrARN. Alternativamente, se puede reemplazar la fusión del crARN con el tracrARN por un ARN de guía (Jinek et al., 2012). Un sgARN es una secuencia de aproximadamente 20 pb que se hibrida por complementariedad al ADN de interés.

La Cas9 es una enzima endonucleasa compuesta por 1368 aminoácidos que actúa como "tijeras moleculares". Cuenta con dos dominios, HNH y RuvC, responsables de realizar los dos cortes romos en la doble cadena de ADN, tres pares de bases arriba del extremo 3' del

PAM. El PAM se caracteriza por contener la secuencia 5'-NGG-3' y es un elemento clave en la especificidad de unión del complejo sgRNA-Cas9 al ADN objetivo (Concepción, 2018).

Figura 1

Esquema del sistema CRISPR-Cas9



Nota. La enzima nucleasa Cas9 (representada en gris) se dirige hacia la secuencia objetivo mediante la guía proporcionada por el sgRNA (señalada en rojo). La secuencia protoespaciadora (marcada en barra roja) se une a la secuencia objetivo ubicada aguas arriba del sitio PAM. De esta manera, Cas9 provoca una ruptura en la doble cadena en el lugar de corte, situado de 3 a 5 pares de bases antes de PAM. El dominio RuvC provoca el corte en la hebra no homóloga, mientras que HNH fragmenta la hebra que es complementaria al sgRNA. Nótese que la secuencia PAM se encuentra en la región complementaria de la hebra opuesta a la que se une el sgRNA. Tomado de *CRISPR-Cas, el editor de genes*, (p.37-42), por Ibáñez et al., 2021, Hosp. Ital. B. Aires.

Diseño de sgRNA

Uno de los mayores desafíos al trabajar con el sistema CRISPR-Cas es evitar cortes aleatorios en el genoma durante la edición. Para lograrlo, además de considerar la secuencia PAM mencionada anteriormente, el diseño del ARN guía debe tener en cuenta los siguientes parámetros: (a) el gen objetivo, (b) la variante de la Cas9 a utilizar, (c) el promotor del ARN guía y (d) la estrategia de clonación. Se recomienda que los ARN guías se encuentren en una ventana de -400 a -50 pb aguas arriba del sitio de inicio de transcripción (TSS) (Gilbert et al., 2014).

La eficiencia del ARN guía y los efectos fuera del objetivo también dependen del contenido de GC, longitud, estructura secundaria y los nucleótidos que conforman su secuencia (Mohammadhassan et al., 2022). A continuación, se mencionarán algunas implicaciones importantes a tener en cuenta.

Evitar la secuencia AG en 5' por los errores asociados a la polimerasa T7.

Evitar la repetición de bases: AAAAA, CCCCC, GGGGG, UUUUU por la actividad más baja de CRISPR o actividad asociada a terminadores.

Un elevado valor de adeninas en las posiciones 9-16 aumenta la afinidad Cas9 - ARN guía, mientras que un mayor número de citocinas o guaninas disminuye su funcionalidad.

Evitar GCC o repetición de timinas (TT) en 3' por disminución de eficiencia de corte.

Posiciones 19 y 20 preferible Guanidina o Adenina.

Posiciones 16 y 18 preferiblemente Citosina (Brandoli et al., 2019)

Un porcentaje de islas CpG de 40% a 60% influye en una mejor actividad de Cas9.

Algunos programas bioinformáticos empleados en el diseño de RNA guías de material vegetal son: CRISPOR, CRISPR-P, CRISPR-GE, SnapGene y Benchling, (Mohr et al., 2016).

Ensamblaje Golden Gate

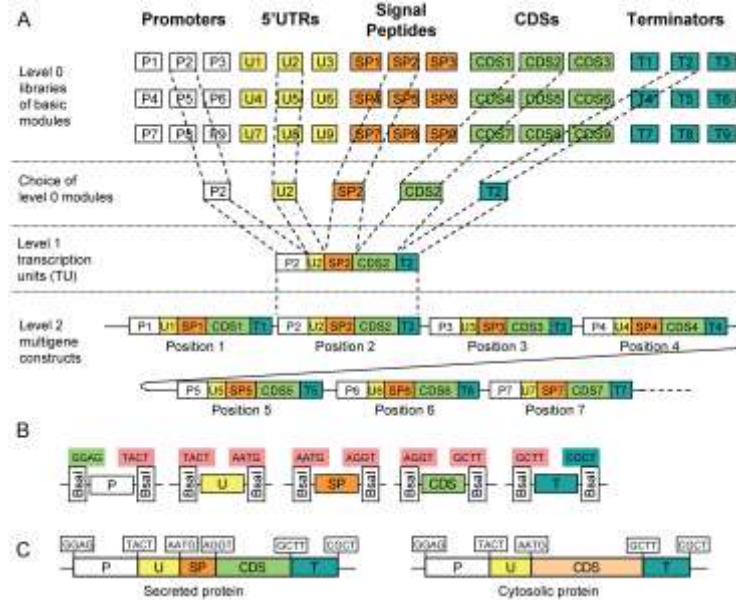
Los avances en ingeniería genética han impulsado la búsqueda de métodos más eficientes para la construcción de constructos de ADN recombinante. En este contexto, el ensamblaje Golden Gate ha surgido como una de las mejores alternativas para la clonación. Si bien ya existen métodos de ensamblaje, muchos de ellos están condicionados por múltiples factores, por ejemplo, el ensamblaje por Biobricks está limitado por la cantidad de fragmentos que se pueden ensamblar en un solo paso y el costo asociado a cada reacción de clonación (Sleight & Sauro, 2013).

Un método eficaz para ensamblar simultáneamente múltiples fragmentos en una sola pieza y reacción es el método de clonación Golden Gate (Iverson et al., 2016). Este sistema no deja cicatrices puesto que se basa en enzimas de restricción IIS que escinden el ADN de doble cadena fuera de sus sitios de reconocimiento, dejando así un voladizo monocatenario corto que será complementario a la(s) secuencia(s) de interés. Otro de los elementos que requieren son de ADN ligasas T4, un vector de destino e inserto(s) de ADN; estos dos últimos deben contener sitios de restricción IIS compatibles para que pueda ocurrir el ensamblaje (Andreou & Nakayama, 2018).

Con la finalidad de aumentar la eficiencia de construir plásmidos se ha acoplado a Golden Gate el sistema de clonación modular (MoClo) como lo indica la Figura 2, basado en vectores prefabricados y estrategias de ensamblaje predefinidos (Werner et al., 2012).

Figura 2

Esquema de un ensamblaje MoClo



Nota. El Kit de plásmidos prefabricados de nivel 0 contiene partes como: promotores (P), regiones 5' no traducidas (U), péptidos señal (SP), secuencias codificantes (CDS) y terminadores (T). Tales módulos básicos se ensamblan para formar unidades de transcripción en reacciones de un solo paso. Posteriormente, en un segundo paso de clonación, las unidades anteriormente formadas se ensamblan en un módulo mayor. Tomado de *A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs* (p.18), por Weber et al., 2011, Plos One.

Los vectores prefabricados contienen insertos que se pueden ensamblar a un vector de clonación más grande, de manera que por cada módulo o nivel la construcción plasmídica de partes que contenga será distinta. Bajo ese enfoque, en un nivel cero se pueden incorporar varias partes para formar una unidad transcripcional, misma que puede clonarse en un módulo nivel uno que contenga más elementos y así jerárquicamente hasta formar construcciones multigénicas (Werner et al., 2012).

Transformación

La transformación es el proceso de introducir ADN foráneo libre o en forma plasmídica a una célula competente, para lo cual debe cumplir con permeabilidad membranal. Tal estado fisiológico se lo obtiene por mecanismos físicos o químicos encargados de producir microporos

para su inserción (Froger & Hall, 2007). Una transformación eficiente se evalúa empleando marcadores de selección y se verifica con PCR (Hasegawa et al., 2018).

El mecanismo principal utilizado para la entrega del cassette con el gen de interés a la planta es a través de la infección mediada por *Agrobacterium tumefaciens* como vector, y en algunos casos, se puede emplear la biobalística como otro mecanismo alternativo. El proceso de infección se basa en los genes vir presentes en el plásmido de *Agrobacterium*, los cuales se encargan de cortar y transferir el ADN de transferencia que contiene la secuencia de interés al genoma de la célula vegetal, facilitando así su integración (Valderrama, 2005).

RIN4

El gen RIN4, también conocido como proteína 4 que interactúa con RPM1, ha sido ampliamente investigado en diversas especies debido a su relevante papel durante ataques de enfermedades (Chisholm et al., 2006). En el caso particular de *Arabidopsis thaliana*, se ha observado que la hiperfosforilación de RIN4 por moléculas efectoras como AvrB y AvrRpm1 desencadena una respuesta de resistencia, facilitando la acumulación de RPM1 en la membrana celular. Por otro lado, la eliminación de RIN4 en el genoma activa una vía alternativa de resistencia a enfermedades mediada por RPS2 (Bai et al., 2013). Estos resultados resaltan la relevancia del gen RIN4 en las reacciones de defensa de las plantas frente a agresiones patógenas.

Con base en análisis de minería de datos y RNA seq, se ha sugerido que RIN4 es un gen asociado a la resistencia a *Fusarium oxysporum* presente en el genoma del banano (*Musa* sp.) (León Alcívar, 2022) (W. Li et al., 2020). Además, investigaciones de transcriptómica evidencian que RIN4 está involucrado en la síntesis de proteínas que desempeñan un papel en la interacción entre la planta y el patógeno. Se ha observado que la sobreexpresión del complejo RIN4/RPM1 en los cultivares de banano Cavendish, bajo la inducción de FocR4T, difiere en comparación con el banano de tipo silvestre susceptible a FocR4T (Li et al., 2012).

Capítulo III: Materiales y métodos

Zona de estudio

El presente proyecto de titulación se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, situado en el cantón Rumiñahui de la ciudad de Quito, en la provincia de Pichincha. El proyecto tuvo una duración de 6 meses, desde su planteamiento en abril de 2023 hasta su presentación en septiembre de 2023.

Reconocimiento del gen RIN4 en el genoma *Musa acuminata*

La búsqueda del gen RIN4 en el genoma de *Musa acuminata* comenzó con la identificación del código RIN4 (Ma03_g12680) en la base de datos "Ensembl Plants" (<https://plants.ensembl.org/index.html>), tal como se describe en la tesis titulada "Aplicación de la minería genómica en banano para la búsqueda de genes de resistencia a *Fusarium oxysporum*". Una vez obtenido el código, se seleccionó la opción GEN ID y se exportaron los datos en formato FASTA. A continuación, se generaron varios resultados de la secuencia de interés, y se registró únicamente el formato CDS: protein_coding, que corresponde a la secuencia codificante del gen RIN4 en *Musa acuminata*.

El reconocimiento del gen RIN4 en la base de datos NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) se llevó a cabo mediante un análisis BLAST en el programa bioinformático "blastn" (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la configuración del organismo *Musa acuminata* (taxid:4641) (Tabla 14).

A continuación, se procedió a colocar el código de acceso de la secuencia seleccionada (LOC103978139) en la opción "graphics" del cromosoma 3 del genoma de *Musa* para obtener su localización precisa (9578067-9579461) y así comprobar la correspondencia del CDS anotado previamente con la secuencia del gen RIN4 indicada por NCBI.

Búsqueda de promotores putativas para el gen RIN4

Se realizaron búsquedas de promotores a diferentes distancias del gen localizado, específicamente 500, 1500 y hasta 2500 pares de bases (pb) aguas arriba como se indica en la Tabla 2. Las secuencias antecesoras obtenidas fueron sometidas a análisis en programas especializados para la identificación de regiones promotoras, tales como NNPP (https://www.fruitfly.org/seq_tools/nnppHelp.html), TSSP (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=cnnprom&group=programs&subgroup=deeplearn>) y New Place (www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace). Estos programas consideraron diferentes parámetros, como la proximidad a la secuencia codificante, el contenido de Guanina-Citocina (GC) y la presencia de cajas TATA y CAAT.

Además, se llevó a cabo un análisis de la presencia de marcos abiertos de lectura (open Reading frames – ORF) entre la región 3' del promotor putativo y el gen RIN4, utilizando la herramienta ORF Finder de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder). Esta evaluación permitió determinar si existen regiones codificantes adicionales que puedan estar involucradas en la regulación del gen RIN4 y su expresión en respuesta al ataque de *Fusarium oxysporum*.

Tabla 2

Biblioteca de posibles promotores para el gen RIN4

Secuencia promotora	Programa	%GC	Posición aguas arriba (límite superior)
AACTGACTTGTATATATGATTAGGA- ACATCTGACTCTTTCTTGATCGCGT	NNPP	36	300 pb
CCTTAGATGCCATTATAACCCACGA-	New Place (NP)	36	500 pb

Secuencia promotora	Programa	%GC	Posición aguas arriba (límite superior)
AACTACATGAAATTATCGAACTATG			
CTTGTATATATGATTAGGAACATCT- GACTCTTTCTTGATCGCGTATGGGC	NNPP y NP	40	495 pb
AATACTGGTATTTAAAATTAGACTT- GATGTTGGTAGATTCAAATGTAGGT	TSP y NNPP	28	1300 pb
GTGGTATACATGATAATGCCCAACA- GCAATTTGCCAATCTACAAGTGGAA	New Place	38,8	2450 pb
GGTCTCAAATCTTCATATAATTCTT- CCAGATTTTCTTGTTCTCTCTTAC	New Place	32	2350 pb

Nota. Los valores de Guanina-Citocina (CG) están indicados en porcentaje.

Diseño de RNA guías

Las regiones promotoras que cumplieron con los filtros mencionados anteriormente se sometieron al diseño de RNA guías utilizando las plataformas de Crispor (<http://crispor.tefor.net/>), Benchling (<https://www.benchling.com/>) y GeniusPrime. La Tabla 3 indica un resumen de los criterios considerados para seleccionar los ARN guía, mismos que fueron: contenido de GC, número de off targets, eficacia-eficiencia y una longitud de 23 pb. De los resultados obtenidos, se eligieron dos opciones prometedoras. Además, para asegurar una posterior ligación de extremos pegajosos, se añadieron los nucleótidos TGCA y AAAC en las secuencias forward y reverse, respectivamente.

Tabla 3

Biblioteca de RNA guías diseñados para promotores putativos de RIN4

N°	ARN guía	PAM	Características
sgRNA1	Forward:	TGG	Off target: 13
	TGCA TTATAACCCACGAAACTACA		CG: 35%
	Reverse:		
sgRNA2	Forward:	AGG	Off target: 7
	TGCA TAGATGCCATTATAACCCAC		CG: 40%
	Reverse:		
sgRNA3	Forward:	GGG	Off target: 7
	TGCA ACTCTTTCTTGATCGCGTAT		GC:40%
	Reverse:		
sgRNA4	Forward:	TGG	Off target: 12
	TGCA GACTCTTTCTTGATCGCGTA		CG: 45%
	Reverse:		
	AAAC TACGCGATCAAGAAAGAGTC		

Nota. Los sgRNA 1 y 2 provienen del promotor 2, mientras los sgRNA 3 y 4 se diseñaron en base al promotor 3.

Alineación de oligos *in vitro*

Previo a la hibridación de los oligos, se llevó a cabo la reconstitución de los primers forward (F) y reverse (R) correspondientes al ARN guía. Para esto, se siguió el protocolo recomendado por el fabricante MacroGen.

El procedimiento inició con la centrifugación de los tubos que contenían los primers liofilizados a 13000 rpm durante 15 segundos. Luego, se añadieron 250 µL de agua pura de

grado molecular libre de nucleasas a cada tubo y se procedió a vortearlos durante 15 segundos a 2500 rpm. Finalmente, los primers se centrifugaron nuevamente a 13000 rpm durante 15 segundos para obtener una concentración madre de 100 pmol/ μ L, equivalente a 100 μ M.

Con el propósito de validar la adecuada manipulación de los cebadores, se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 2,5% utilizando Buffer TAE 1X. Esta técnica permitió visualizar la calidad y pureza de los primers, asegurando su adecuado estado para su posterior utilización en el proceso experimental.

Se llevó a cabo la hibridación de los primers forward y reverse correspondientes al ARN guía, siguiendo una adaptación del protocolo 45 de la compañía Thermo Scientific. Los oligonucleótidos complementarios se mezclaron equimolarmente en un tubo de 0,6 μ L y se diluyeron con tampón Tris (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, pH: 8), según los volúmenes detallados en la Tabla 4.

Posteriormente, la reacción fue incubada en un termociclador a 95°C durante 5 minutos y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 45 minutos para permitir el annealing. Para visualizar el producto de hibridación, se utilizó un gel de agarosa al 2,5 % con SYBR™ Safe, TAE 1X y un marcador de 100 pb, con condiciones de electroforesis de 60V y 30 miliamperios durante 30 minutos. El resultado fue observado en un transiluminador UV.

Tabla 4

Reacción de hibridación de oligonucleótidos

Reactivo	Volumen
Forward oligo	5 μ L
Reverse oligo	5 μ L
Tampón Tris	90 μ L
Volumen total	100 μL

Nota. La concentración final de oligos fue de 10 μ M.

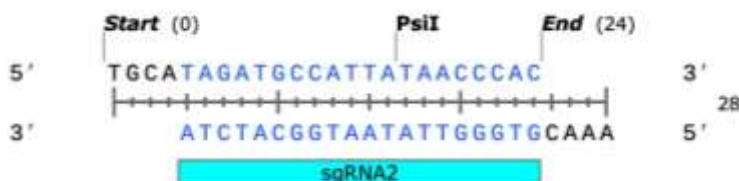
Construcción *in silico* mediante la metodología Golden Gate (GG) utilizando el sistema modular de clonación (MoClo)

El ensamblaje *in silico* se llevó a cabo utilizando dos kits comerciales de Addgene: MoClo CRISPR/Cas Toolkit for Plants (kit #1000000159) y MoClo Toolkit (kit #1000000044). Para este proceso, se utilizó el programa bioinformático SnapGene, que permitió ensamblar las partes de los 3 constructos, también conocidos como niveles.

En primer lugar, antes de la constitución del nivel 0 (L0), se realizó el ensamblaje de los oligos forward y reverse correspondientes al ARN guía mediante la herramienta "Align oligos" (Figura 3). Luego, se procedió a la digestión del backbone pFH113 utilizando la enzima BbsI, y se ligó con los extremos cohesivos del oligo previamente hibridado.

Figura 3

Hibridación de oligos



Nota. La región de azul corresponde al sgRNA2 alineado. Los nucleótidos salientes de las direcciones 3' y 5' corresponden a las bases añadidas para el ensamblaje Golden Gate L0.

En cuanto al nivel 1 (L1), también se empleó la herramienta "Golden Gate Assembly" para ensamblar múltiples fragmentos a la vez. Los plásmidos con las partes de interés fueron digeridos con BsaI y se ensamblaron en el siguiente orden: primera, segunda y tercera posición, correspondientes a los plásmidos pICH47751 como backbone, pFH31 como promotor TAU Pol III, el plásmido ensamblado del nivel 0 y pAK-EI_01 como end-linker.

En la construcción del nivel 2 (L2), se empleó BbsI como enzima de restricción. El orden de las partes ensambladas fue: pAGM4723 como backbone, pFH114 como marcador de selección en la planta, pFH23 como SpCas9, plásmido ensamblado del nivel 1 y pICH41766 como terminador en la última posición.

Cultivo de Bacterias Portadoras de Plásmidos en Placas Petri

Se prepararon cajas de cultivo con medio LB-Agar y el antibiótico adecuado para cada plásmido de interés, según lo detallado en la Tabla 5. Los plásmidos contenidos en los pocillos de las placas de los Kits fueron inoculados y se incubaron durante 24 horas. Luego, se seleccionaron las colonias blancas para realizar siembra por duplicado en medio LB-Agar + Antibiótico + XGAL + IPTG, y se dejaron incubar a 37°C durante toda la noche.

A continuación, se tomaron de 3 a 5 colonias azules de cada caja utilizando palillos estériles y se sembraron en tubos de 2 mL que contenían 1,5 mL de caldo LB + el antibiótico correspondiente, permitiendo su crecimiento durante 24 horas. Una vez que se observó una ligera turbidez en los tubos, se procedió a transferir 50 µL de cada cultivo a matraces que contenían caldo LB + el antibiótico correspondiente. Para asegurar la conservación de los volúmenes sobrantes en los tubos, se añadió 1 mL de glicerol al 50% para alcanzar una concentración final del 25%.

Tabla 5

Biblioteca de plásmidos empleados para las construcciones de los niveles L0, L1 y L2

Plásmido	Resistencia	Peso (pb)	Procedencia del Kit	Pocillo
pHF113	Kanamicina	2553	Crispr	E4
pFH31	Estreptomicina	2593	Crispr	B11
pAK-EL-01	Kanamicina	2590	Crispr	C11
pFH114	Ampicilina	7198	Crispr	H7

Plásmido	Resistencia	Peso (pb)	Procedencia del Kit	Pocillo
pFH23	Ampicilina	10838	Crispr	G2
pICH 47751	Ampicilina	4968	Moclo	D3
pAGM4723	Kanamicina	12773	Moclo	A5
pICH 41766	Estreptomicina	3318	Moclo	D5

Nota. Todos los plásmidos utilizados para los ensamblajes tienen un alto número de copias.

Extracción de ADN plasmídico

Se realizó la extracción de los 8 ADN plasmídicos mencionados en la Tabla 5, partiendo de los cultivos líquidos. Para este propósito, se evaluaron dos métodos de extracción de plásmidos: el protocolo del kit Miniprep PureLink^{TK} HiPure Plasmid DNA Purification de Invitrogen y el protocolo casero de extracción alcalina propuesto por el curso de biología sintética de iGEM Ecuador (2022) y modificado a partir de (Álamo & Barea, 2018), el cual se estandarizó según las condiciones de laboratorio. Luego de evaluar los resultados obtenidos, se decidió utilizar el protocolo casero de extracción alcalina para las etapas siguientes.

Método: Miniprep PureLink^{TK} HiPure Plasmid DNA Purification

Se centrifugó a 14000 x g por 10 minutos a 1,5 mL de cultivo líquido procedente de una incubación de 16 horas realizada con anterioridad y se descartó el sobrenadante, este paso fue realizado hasta obtener la cantidad de pellet suficiente. Luego, se resuspendió el pellet formado con 0.4 mL de solución de resuspensión R3 (50 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA) suplementado con RNasa (20 mg/mL en 10 mM acetato de sodio con pH 5.2) hasta homogenizar. Posteriormente, se añadió 0.4 mL de buffer de lisis L7 (1% (w/v) SDS, 0.2 M NaOH) e invirtió el tubo cinco veces, incubándose a temperatura ambiente durante 2.5 minutos. Inmediatamente se incorporó 0.4 mL de buffer de precipitación N3 (3.1 M acetato de potasio con pH 5.5) hasta homogenizar, en seguida se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. También se preparó tubos con columnas para añadir 2 mL de buffer de

equilibrio EQ1 (0.1 M acetato de sodio con pH 5, 0.15% (v/v) Triton® X, NaCl a 0.6 M) hasta que exista precipitado. Luego se añadió el sobrenadante producto de la centrifugación y, una vez filtrado por la columna, se colocó 2.5 mL de buffer de lavado W8 (0.1M acetato de sodio con pH 5, 825 mM NaCl), este paso se repitió dos veces en total. Posteriormente, se situó la columna en un tubo estéril y se le añadió 1 mL de buffer de elución E4 (100 mM Tris-HCl con pH 8.5, 1.25 M NaCl), permitiendo el paso del líquido hacia el tubo recolector. Gracias al último paso se pudo purificar el ADN plasmídico.

De inmediato, se colocó 0.63 mL de alcohol isopropílico y se centrifugó a 4°C durante 1 hora a 12000 × g. Después de observar la formación del sedimento, se desechó el sobrenadante y se incorporó 1 mL de etanol al 70%. Seguidamente, se centrifugó a 12000 × g por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se usó una cabina de flujo laminar para secar el pellet del tubo, mismo que fue resuspendido en un volumen de 50 µL de agua exenta de nucleasas. Para conservar la extracción, la muestra se almacenó a -20°C.

Método: Extracción casera

En el método de extracción alcalina, se dejó incubando un cultivo líquido bacteriano durante 16 horas previo a realizar una centrifugación de 1,5 mL durante 10 minutos a 6000 rpm para posteriormente eliminar el sobrenadante, observando que exista pellet, este paso se repitió de 2 a 3 veces según la cantidad de pellet requerida. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 250 µL de solución fría I (25 mM de Tris-HCl con pH 8.0, 50 mM de glucosa, 10 mM de EDTA con pH 8.0), se ejecutó un vortex por 15 segundos y por 2 minutos se incubó a temperatura ambiente. Luego, se añadió 250 µL de solución de lisis II (SDS al 1% (w/v) y 0.2 N de NaOH), realizando 5 ciclos de homogenización por inversión y se incubó a -20°C por 3 minutos. Seguido, se añadieron 300 µL de solución III fría (5M de acetato de potasio, 1.115 mL de ácido acético glacial, 2.85 mL de agua), homogenizando por inversión hasta 7 ocasiones, la muestra fue colocada en una incubadora a -20°C durante 10 minutos antes de proceder a una

centrifugación de 15 minutos a 13000 rpm. Un volumen de 400 μ L obtenidos del anterior paso fue colocado en tubos nuevos, sin considerar el pellet en la toma de la muestra, luego se añadieron 800 μ L de alcohol absoluto, homogenizando por inversión 5 veces. Los tubos se incubaron en una refrigeradora con temperatura cercana a -20°C durante 20 minutos y posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos. Luego se desechó el sobrenadante y se adicionó un volumen de 1 mL de etanol (al 70%), homogenizando por inversión 10 ciclos, finalmente se descartó el sobrenadante producto de una centrifugación a 13000 rpm por 10 minutos. Los tubos fueron secados en una cabina de flujo laminar y el precipitado se resuspendió en 20 μ L de agua ultra pura libre de nucleasas, adicionando 1 μ L de RNAsa e incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los plásmidos extraídos se conservaron a -20°C .

Cuantificación y análisis de calidad de ADN

La cuantificación de los plásmidos extraídos se llevó a cabo utilizando el espectrofotómetro Thermo Scientific™ μ Drop™ y las placas μ Drop Duo, que proporcionan valores de concentración y calidad del ácido nucleico. En cada pocillo, se utilizó 2 μ L de ADN y 2 μ L de agua libre de nucleasas como blanco. Los resultados se evaluaron según la concentración (ng/ μ L) y las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230.

Para confirmar la integridad del ADN plasmídico, se cargaron 5 μ L de ADN con 1 μ L de buffer de carga Blue/Orange Loading Dye 6x de la marca Promega y un marcador 1kb DNA Ladder de Promega, y se corrieron las muestras a 80V durante 40 minutos en la cámara de electroforesis Owl™ EasyCast™ B1-BP Electrophoresis Systems. Se empleó geles de agarosa en porcentaje dependiente del tamaño del plásmido, teñido con SYBR™ Safe DNA Gel Stain de Invitrogen™ a una concentración de 1 μ L/10mL en TBE a 1X. Las bandas resultantes se visualizaron en un High Performance UV transiluminador.

Diseño de primers para PCR de colonias

Los primers forward y reverse fueron diseñados utilizando las secuencias finales de cada nivel de ensamblaje. La elección de primers se basó en asegurar que la amplificación abarcara las partes incorporadas en cada nuevo vector backbone, y se tuvieron en cuenta su temperatura de melting (Tm) y porcentaje de Guanina-Citosina (GC%). La Tabla 6 indica la secuencia de nucleótidos correspondiente a cada primer.

Tabla 6

Primers empleados en la reacción de PCR colony

Nivel	Región que amplifica	Forward	Reverse
L0	Backbone + ARN guía	TTCGATTCCCGGCTGGTGCA Tm: 67.4 °C GC%: 60	AGCATAGCTCTGAAACAATC Tm: 53.1 °C GC%: 40
L1	Promotor + ARN guía + Terminador 1	ACTCTTCCTTTTTCAATATT Tm: 47.6 °C GC%: 25	AAAAAAAAAAAAAGCACCGAC Tm: 51.9 °C GC%: 30
L2	Marcador+ Cas9 + L1 + Terminador 2	TGCCGAATTCGGATCCGGAG Tm: 65,8 °C GC%: 60	TCGGTCACATGTGCATCCTCTm: 62,4 °C GC%: 55

Nota. La síntesis de oligonucleótidos fue realizada por la empresa Macrogen y los parámetros en la plataforma OligoAnalyzer.

Construcción del nivel 0

Reacción in vitro de digestión y ligación para nivel 0

La construcción de L0 se llevó a cabo utilizando el ensamblaje Golden Gate con los componentes detallados en la Tabla 7. Cabe destacar que el protocolo empleado es una adaptación del suplemento “A modular cloning toolkit for genome editing in plants” desarrollado por Hahn et al. (2020).

Tabla 7

Reacción de corte y ligación para el ensamblaje del nivel L0

Componente	Volumen
Plásmido backbone pFH113	1 μ L
ARN guía para RIN4 ensamblado (10 μ M)	1 μ L
Mix de la enzima ligasa T4 (10x) + buffer enzimático	2.5 μ L
BSA (1 mg/mL)	1.5 μ L
Mix de Enzima BbsI-HF (New England Biolabs) (10 U/ μ L) con Buffer rCutSmart 10x	1 μ L
Agua libre de nucleasas	8 μ L
Volumen total	15 μL

Nota. La concentración del vector backbone con la que se trabajó fue mayor a 100 ng/ μ L y, según indicaciones del fabricante, la relación entre enzima BbsI y Buffer rCutSmart es de 1:5.

Posteriormente, la reacción fue incubada en el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 8. Estos mismos parámetros fueron aplicados a todos los niveles de corte y ligación.

Tabla 8

Programa del termociclador para reacciones de digestión y ligación

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
37 °C	20 s	1x
37 °C	3 min	50x
16 °C	4 min	
50 °C	5 min	1x
80 °C	5 min	1x
16 °C	Indefinido	-

Nota. Se replicaron las mismas condiciones para los tres niveles de construcción plasmídica.

Preparación de células químicamente competentes para cepas DH5 y Top10

Para la obtención de células competentes químicamente, se procedió a emplear el protocolo adaptado de iGEM (http://parts.igem.org/Help:Protocols/Competent_Cells) y procedente de Hanahan et al. (1991). Se activaron las cepas E. coli DH5 y Top10 mediante inoculación de 100 µL en 50 mL de matraces con caldo LB sin antibiótico para DH5 y con Estreptomicina para Top10. Los frascos se colocaron en incubadoras a una temperatura de 37°C y se mantuvieron agitados de manera continua durante toda la noche.

Luego, se transfirieron 1000 µL del cultivo bacteriano activado a un nuevo matraz con 250 mL de medio SOB y se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,3. Una vez que se alcanzó la OD adecuada, se transfirieron 4 mL de cada cultivo a 2 tubos de centrifugación previamente enfriados y se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 3000 rpm. Se descartaron los sobrenadantes y se añadieron 16 mL de tampón CCMB80 frío. Se procedió a homogenizar la disolución del pellet formado en los tubos mediante pipeteo, seguido de una incubación en hielo durante 20 minutos. Este proceso se repitió en una ocasión más y,

en la etapa final, el sedimento se suspendió en 2 mL de tampón CCMB80 que previamente había sido enfriado utilizando hielo. Las células competentes se conservaron en alícuotas de 50 μ L a -80°C .

Transformación en cepas DH5 α y Top10

Para la transformación del módulo L0, se utilizó exclusivamente la cepa DH5 α . Sin embargo, a continuación, se describe el protocolo de transformación que se compartió con las cepas DH5 α y Top10, utilizado en el nivel L2.

El método de transformación se basó en el protocolo adaptado de Hanahan et al. (1991). Consistió en inocular 2 μ L del plásmido ensamblado y extraído en 50 μ L de células competentes en tubos de centrifuga. Luego, los tubos se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y se llevaron al equipo Thermomixer (baño maría) a una temperatura de 42°C durante 45 segundos. Posteriormente, se volvieron a transferir los tubos a hielo durante 5 minutos y se añadieron 950 μ L de medio SOB. Como último paso, se incubaron las transformaciones a 37°C a 200 rpm durante 1 hora.

Finalmente, se pipeteó 100 μ L de cada transformación en cajas Petri con medio LB-Agar y el antibiótico correspondiente al backbone de cada construcción. Se esparció el líquido con un triángulo de vidrio y se incubaron las cajas boca abajo durante 16 horas a 37°C . Tanto para el nivel 0 como para el nivel 2, se empleó Kanamicina como antibiótico a una concentración de 0,05 mg/mL.

Figura 4

Protocolo de transformación bacteriana



Nota. Las cepas DH5 α , Top10 y JM109 siguen el mismo tiempo de shock térmico e incubación, no así con los tiempos de estancia en hielo, que cambian para la cepa JM109. Imagen generada en Biorender, 2023.

Confirmación del ensamblaje L0

La transformación resultante se evidenció con la presencia de colonias blancas. Posteriormente, se realizó la extracción del ensamblaje L0 para comparar su peso con el tamaño esperado. Para ello, las colonias transformadas se sembraron en un matraz con caldo LB y Kanamicina, y se incubaron a 37°C durante toda la noche para alcanzar la densidad celular deseada.

Por otro lado, utilizando el plásmido extraído, se llevó a cabo un ensayo confirmatorio del ensamblaje L0 mediante la digestión con la enzima BsaI. Los componentes utilizados para el corte de fragmentos en el plásmido se detallan en la Tabla 9. La reacción de digestión se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora, seguido de 65°C durante 20 minutos.

Tabla 9

Reacción de corte enzimático del plásmido L0 ensamblado

Componente	Volumen
Plásmido ensamblado L0	1 μ L
Buffer G	2 μ L
Enzima Bsal	1 μ L
Agua libre de nucleasas	16 μ L

Nota. La reacción se llevó a cabo en base al protocolo indicado por la enzima del fabricante Promega.

El coctel de digestión obtenido fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, previamente teñido con SYBR™ Safe. La electroforesis se realizó bajo las condiciones de 60 V durante 35 minutos.

Construcción del nivel 1

Reacción in vitro de digestión y ligación para nivel 1

El ensamblaje L1 fue realizado mediante la reacción de corte y ligación del protocolo MoClo, que incluye los componentes mencionados a continuación (Tabla 10). Luego, la reacción fue sometida al termociclador bajo las condiciones descritas en la Tabla 8.

Tabla 10

Reacción de corte y ligación para el ensamblaje del nivel L1

Componente	Volumen
Plásmido backbone pICH47751	1 μ L
Plásmido L0 ensamblado	1 μ L
Plásmido pFH31	1 μ L

Componente	Volumen
Plásmido pAK-E2-01	1 μ L
Mix de Ligasa T4 (10x) y Buffer	2.5 μ L
BSA (1 mg/mL)	1.5 μ L
Mix enzimático Eco31-Bsal (Thermo Scientific) con su Buffer G (10X)	1 μ L
Agua libre de nucleasas	6 μ L
Volumen final	15 μL

Nota. La concentración de los plásmidos con la que se trabajó fue mayor a 100 ng/ μ L y, según indicaciones del fabricante, la relación entre enzima Eco31-Bsal y Buffer G es de 1:2.

Transformación de L1

La construcción obtenida se denominó "Ensamblaje L1" y se utilizó para llevar a cabo la transformación en la cepa *E. coli* DH5 α mediante el siguiente procedimiento: se mezclaron 50 μ L de células competentes con 2 μ L de la reacción de corte y ligación resultante del L1 en tubos de 2 mL. Luego, se incubó la mezcla en hielo durante 30 minutos y se sometió a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos; posteriormente, los tubos se transfirieron nuevamente a hielo durante 5 minutos y se añadieron 950 μ L de medio SOB. Finalmente, se incubaron los tubos a 37°C durante 1 hora con agitación constante a 200 rpm. Para comprobar visualmente la transformación, se inoculó por duplicado 100 μ L de la reacción en cajas Petri con medio LB-Agar y ampicilina a una concentración final de 0,1 mg/mL, y se incubaron durante 16 horas a 37°C.

PCR colony del ensamblaje L1

La amplificación de las regiones incorporadas en el ensamblaje se realizó mediante PCR de colonias con las instrucciones del fabricante del kit Dream Taq Green PCR Master Mix. Para ello, se recogió con la punta de la micropipeta de 3 a 5 colonias de *E. coli* blancas que

crecieron en medio LB y ampicilina, y se introdujo en la reacción mencionada en la Tabla 11.

Los primers utilizados se detallan en la Tabla 6.

Tabla 11

Master Mix para la Reacción de PCR

Reactivo	Concentración		Volumen
	madre	final	
Dream Taq Green	2X	1X	6,25 µL
PCR Master Mix			
Primer forward	10uM	1uM	1,25 uL
Primer reverse	10uM	1uM	1,25 uL
Agua libre de nucleasas	-	-	3,75uL
Volumen total			12,5uL

Nota. Los primers forward y reverse son distintos para cada nivel de construcción.

Las condiciones del programa adaptado en el termociclador se encuentran detalladas en la Tabla 12. La temperatura de melting para el par de primers usados en el nivel L1 fue de 55,25 °C y se calculó con la siguiente fórmula $(T_m \text{ primer Forward} + T_m \text{ primer Reverse})/2 - 2$. Posteriormente, se visualizó el amplicón obtenido utilizando un gel de electroforesis al 1.5%, teñido con SYBR™ Safe, y se utilizó TBE 1X junto con un marcador de 1Kb. Las bandas resultantes se observaron en un Transiluminador UV.

Tabla 12

Programa del termociclador para PCR colony

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1x
Desnaturalización	95	30 s	
Hibridación	Tm	30 s	35x
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1x

Nota. Tm corresponde a la temperatura de melting del conjunto de primers empleados en cada nivel de ensamblaje, se determinó en base a un promedio de las temperaturas de melting de cada primer (Forward y reverse) -2.

Siembra del plásmido L1 ensamblado en medio líquido y extracción plasmídica

Una vez evidenciada la banda del amplicón y confirmado su peso, de acuerdo con el diseño *in silico* realizado en Benchling, las colonias blancas fueron preservadas en tubos de 2 mL con caldo LB, Ampicilina y glicerol al 25%. Para la extracción de la construcción L1, se empleó el protocolo de lisis alcalina, utilizando matraces previamente incubados durante 16 horas a 37°C con colonias blancas disueltas en LB y Ampicilina. Se procedió a realizar una segunda confirmación, comparando el peso del plásmido extraído con el tamaño esperado según el diseño *in silico* realizado en SnapGene.

Construcción del nivel 2

Reacción in vitro de digestión y Ligación para nivel 2

La reacción de corte y ligación GG para L2 se realizó empleando las partes descritas en la Tabla 13. Se emplearon las mismas condiciones del programa del termociclador mencionadas anteriormente en la Tabla 8.

Tabla 13

Reacción de corte y ligación para el ensamblaje del nivel L2

Componente	Volumen
Vector backbone pAGM4723	1µl
Plásmido pFH114	1µl
Plásmido pFH23	1µl
Plásmido ensamblado en el nivel 1	1µl
Plásmido pICH41766	1µl
Mix de ADN ligasa T4 (10X) y su Buffer	2.5 µl
BSA (1 mg/mL)	1.5µl
Mix de Enzima BbsI-HF (New England Biolabs) (10 U/µL) con Buffer rCutSmart (10)x	1µl
Agua libre de nucleasas	5 µl
Volumen total	15 µl

Nota. La concentración del vector backbone con la que se trabajó fue mayor a 100 ng/ µL y, según indicaciones del fabricante, la relación entre enzima BbsI y Buffer rCutSmart es de 1:5.

Luego, se realizó la transformación del plásmido L2 ensamblado en tres variedades competentes de *E.coli*: DH5α, Top10 y JM109. Consecutivamente se inoculó 100 µL de la solución transformada en placas Petri con medio LB-agar, IPTG (0.1M), X-Gal (20 mg/mL) y Kanamicina (0,05 mg/mL). Las placas fueron colocadas en una incubadora a temperatura de 37 °C durante toda una noche.

Tras el crecimiento de colonias blancas, se seleccionaron colonias transformadas y se inocularon en caldo LB con Kanamicina, manteniendo las condiciones de incubación a 37°C. A partir del cultivo bacteriano, se extrajo el plásmido y se realizó una comprobación del ensamble

L2 para validar su peso y compararlo con el tamaño esperado. Además, se realizó una PCR en colonias y se utilizó electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% para observar el amplicón. La temperatura de melting (T_m) de los primers utilizados en el nivel 2 correspondió a 62,1 °C.

Protocolo de Transformación L2 con JM109

Para transformar cepas de *E. coli* JM109 con el plásmido ensamblado, se siguió el protocolo de Promega adaptado de Hanahan (1985). Inicialmente, se descongelaron las células competentes y se mezclaron 100 μ L de ellas con 2 μ L de ADN plasmídico mediante pipeteo. La combinación se mantuvo en estado refrigerado durante 10 minutos y luego fue sometida a un cambio térmico a 42°C durante 45 segundos mediante el uso de un Thermomixer. Después de esto, la mezcla se enfrió nuevamente en hielo durante 2 minutos, y posteriormente se incorporaron 900 μ L de medio SOC. Como último paso, se incubó la mezcla a 37°C con agitación a 200 rpm durante 60 minutos.

Capítulo IV: Resultados

Identificación del gen RIN4

Mediante el uso de bibliotecas genómicas, se logró identificar con precisión la ubicación del gen RIN4 en el cromosoma 3 de *Musa acuminata*, y se determinó que su secuencia consta de 1395 pares de bases, incluyendo: gen, mRNA, CDS y ncRNA. Este hallazgo resultó fundamental para identificar la región codificante, las zonas promotoras, elementos regulatorios y ORFs (marcos de lectura abierta), proporcionando una comprensión más completa de la estructura y función potencial del gen en banano.

Figura 5

Secuencia codificante del gen RIN4 en Musa acuminata

```
>Ma03_t12680.2 cds:protein_coding
ATGGCTCAACGAGGACACGTACCGCGTTTCGGTGATTGGAACGAGAACGCTGCCTACAGG
ATATGCTTCGACACGGCACGCAAGGGGAAAAGTTGCCGGAGGCAACATCGTCAACCCAAAT
GATCCAGAGCAGAGCCCTGAGCTCCACAAGCCTGCTGCAATGGCTGCTGCAGAACCCAG
CATCCTAAGCAAGGCCGCGGGGACAAGGCCGTGGAGTTCAATATCGCGAATCAGCATCAT
CAGGGAGCAAATTTATGTCAGGGAAGAGAGGGAGGGAAGAGAGGCAATCCAAGGATACCCA
CAAGCTGCACCGCAGCCTCGAGGTAGCGGTGGTCAGAGAACAGGGGCACGCAGGAACCCA
GGTGAAGCTGGCTATGTCCGGTCTCCATCGCCGGTAAACACAGGGTAGAGCAGCAAATCT
CGACAAAATGTCGCTGGGCGCCAAAGACCCCGACGGTACCCTCAAGTTCGGCGAATGGGAT
GCAGCGGACCCGAAATCAGCAGGATACACGGTCATCTTCAACCAGGTTAAAGAGGAAAAG
AAGACAGCCGTCGCTTGGGTCGCCGAGTTCGGTTCAACCTGCACGATCTCCGGCCACC
GAGAGGGCGCACCACAATGATTCTGTAAGGATTGGGGTATGCACCAAGCTTGGTTTCCTG
TATTCTCCATGCGTTACTTGA
```

Nota. La secuencia codificante posee 681 nucleótidos y 226 aminoácidos.

Los resultados arrojados por el programa ORF Finder configurados para considerar como codón de inicio únicamente al codón ATG y una longitud mínima de 75 nucleótidos, encontraron 7 ORFs, 3 de ellos en dirección 5'-3' y 4 de ellos dirección 3'-5' (Figura 6). Por otro lado, al configurar para que aparezcan ORF de una longitud mínima de 300 nucleótidos sólo apareció uno de ellos.

Figura 6

Marcos abiertos de lectura para la secuencia codificante del gen RIN4



Nota. Todos los ORF mostrados en la gráfica están dentro del ORF1, que abarca los 681 nucleótidos.

Blasteo del gen RIN4 en *Musa acuminata*

Entre los resultados obtenidos mediante el análisis de la secuencia codificante del gen RIN4 mediante BLAST, se eligió el genoma anticipado: *Musa acuminata* subsp. *malaccensis* RPM1-interacting protein 4-like (LOC103978139), transcript variant X2, mRNA, basándose en los criterios de cobertura del Query (100%), porcentaje de identidad (100%) y un E-value de 0 (Tabla 14).

Se puede encontrar la secuencia codificante con el formato Fasta:

```
>NC_025204.1:9578165-9578170,9578365-9578793,9578881-9579126 Musa acuminata
subsp. malaccensis chromosome 3, ASM31385v2, whole genome shotgun sequence.
```

Tabla 14

Resultados del blasteo del CDS del gen RIN4 en blastn

Descripción	Query Cover	E value	Identidad	Código de referencia-NCBI
Predicted: <i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> RPM1-interacting protein	100	0	100	XM_009393839.2

Descripción	Query Cover	E value	Identidad	Código de referencia-NCBI
4-like (LOC103978139), transcript variant X2, mRNA				
Predicted: <i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis RPM1-interacting protein	100	0	99,84	XM_009393838.2
4-like (LOC103978139), transcript variant X1, mRNA				
Predicted: <i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis RPM1-interacting protein	99	0	100	HG996468.1
4-like (LOC103978139), transcript variant X2, mRNA				

Nota. Los valores de Query cover e Identidad se presentan en porcentaje.

Elección del ARN guía

Con base a los criterios y características mencionados en la sección “Diseño de ARN guías” se seleccionó la opción 2 (Tabla 15) debido a su especificidad, eficiencia y valores fuera de marco.

Tabla 15

sgRNA diseñados para ensayos in vitro CRISPR/Cas9 en Musa acuminata

RNA guía	Especificidad (>90%)	Eficiencia (>40%)	Efectos off target
sgRNA 1	98	39	0-0-0-3-10
sgRNA 2	99	72	0-0-0-1-6
sgRNA 3	99	47	0-0-1-0-6

RNA guía	Especificidad (>90%)	Eficiencia (>40%)	Efectos off target
sgRNA 4	98	35	0-0-0-2-10

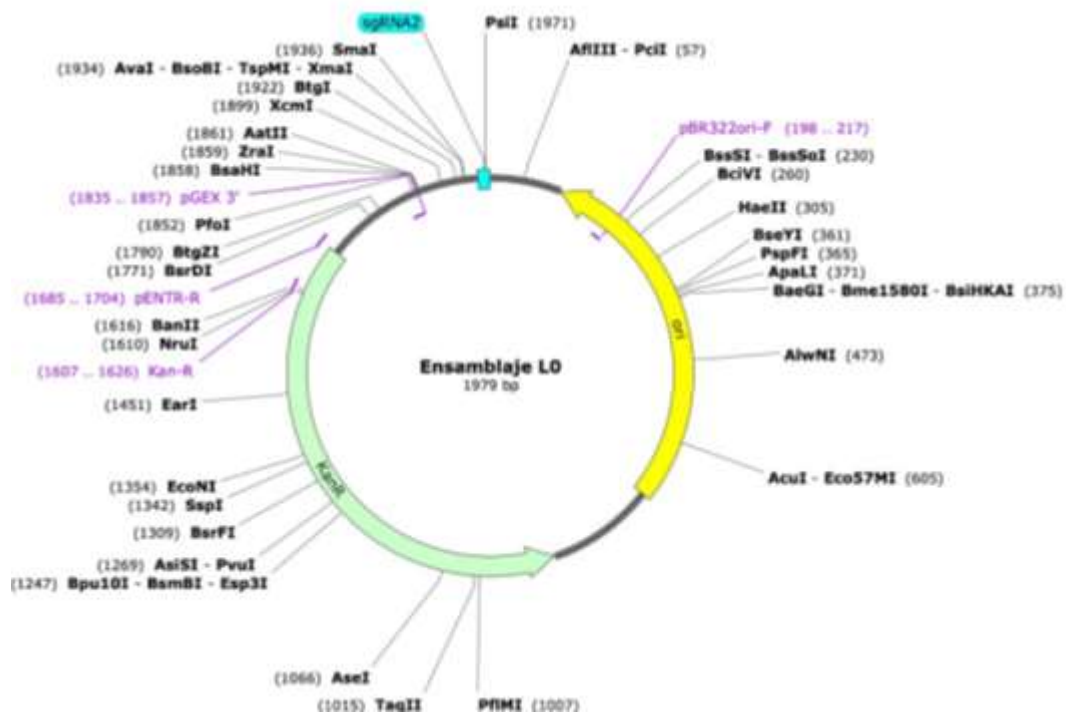
Nota. Los datos mostrados fueron obtenidos del programa Crispor.

Ensamblaje *in silico* de los niveles 0, 1 y 2

De acuerdo con el procedimiento detallado en metodología, se logró obtener el ensamblaje L0 con una longitud total de 1979 pb, el ensamblaje L1 con 5095 pb y el ensamblaje L2 con 14923 pb, tal como se ilustran en las Figuras 7, 8 y 9 respectivamente. Estos resultados indican un aumento significativo en el tamaño de los ensamblajes conforme se incorporaron nuevas partes en cada nivel.

Figura 7

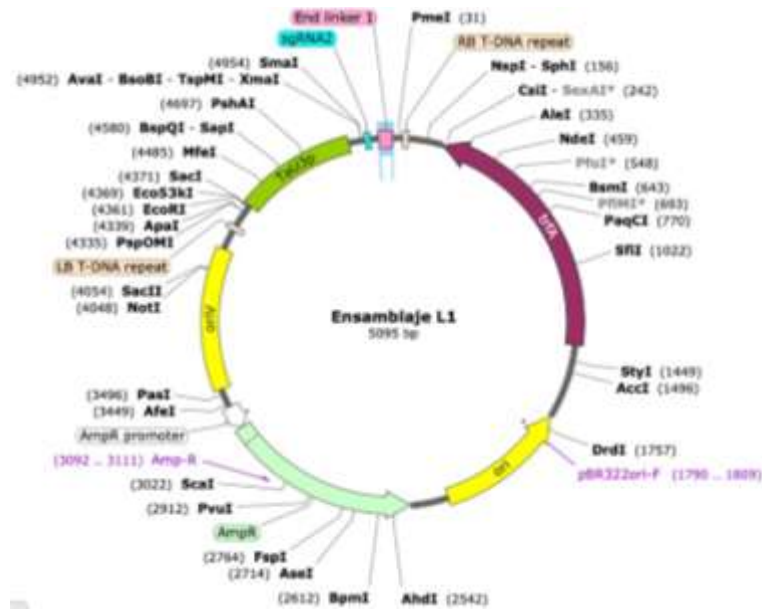
Mapa de la construcción plasmídica del nivel L0



Nota. El ensamblaje L0 contiene al ARN guía para el promotor del gen RIN4. La Figura fue creada en Snapgene.

Figura 8

Mapa de la construcción plasmídica del nivel L1

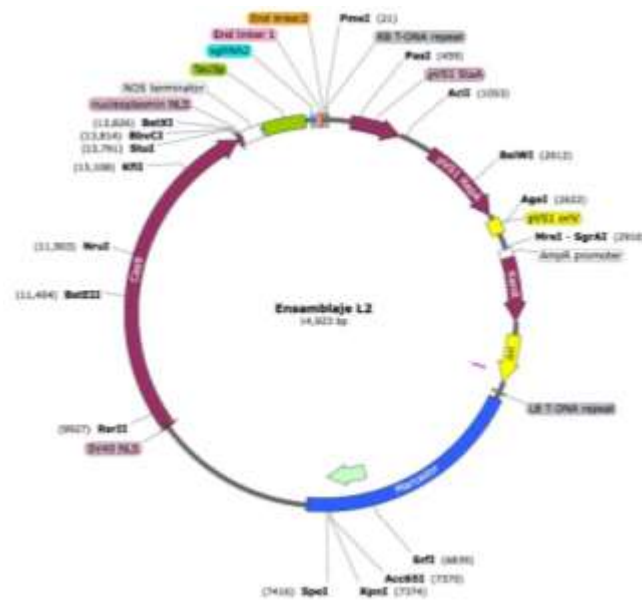


Nota. El ensamblaje L1 contiene un promotor Tau Pol III, el ARN guía y un end linker de nivel 1.

La Figura fue creada en Snapgene.

Figura 9

Mapa de la construcción plasmídica del nivel L2



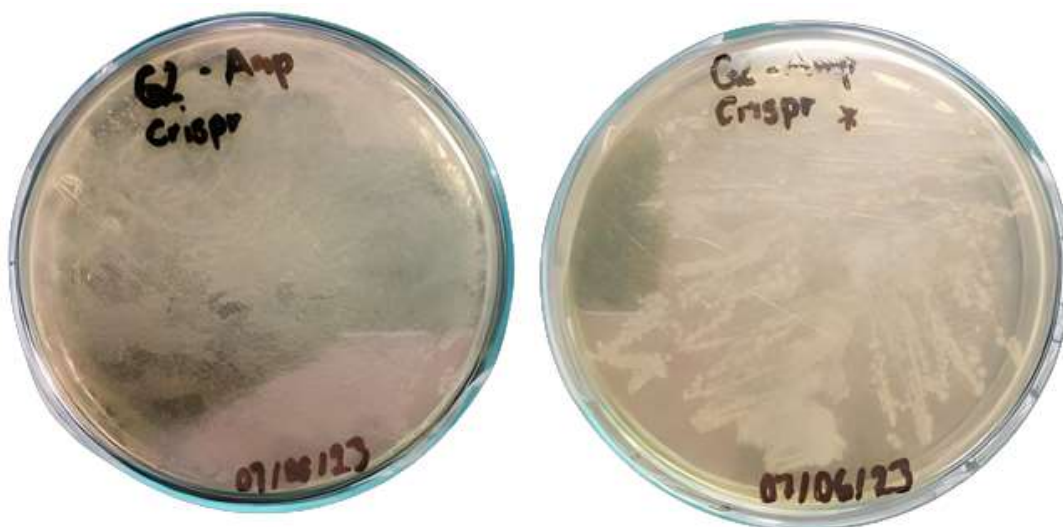
Nota. El ensamblaje L2 contiene un marcador de selección, una Cas9, un promotor Tau Pol III, el ARN guía y dos end linker, uno del nivel 1 y otro del nivel 2. La Figura fue creada en Snapgene.

Crecimiento de bacterias contenedoras de plásmidos

Después de la inoculación de células *E. coli* con los 8 plásmidos correspondientes a los kits MoClo y CRISPR, se observó el crecimiento de colonias blancas, lo que indica que dichas células sí contenían el plásmido con resistencia al antibiótico empleado para la selección (Figura 10). Además, en los medios con Xgal e IPTG se observaron colonias de color azul (Figura 11), lo cual confirma la presencia y activación del operón Lac en las células para producir y descomponer β -galactosidasa.

Figura 10

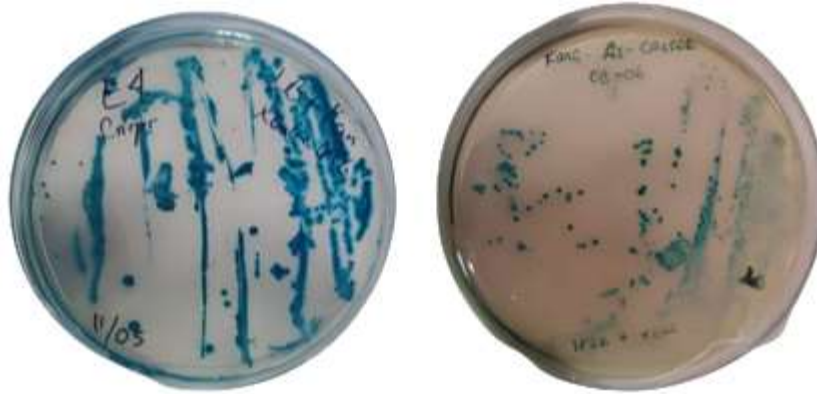
Crecimiento celular de bacterias en medio LB + Antibiótico



Nota. Colonias blancas indican células resistentes al antibiótico. Plásmido pFH23 (G2) tiene resistencia a Ampicilina.

Figura 11

Crecimiento celular de bacterias en medio LB + Antibiótico + IPTG + Xgal



Nota. Colonias azules indican expresión del operón lacZ. Plásmidos pFH113 (E4) y PAHM4723 (A5) tienen resistencia a Kanamicina.

Transformación de colonias

Tras un periodo de dos días después de la siembra de bacterias transformadas con shock térmico, los resultados obtenidos en cuanto al número de colonias para cada nivel de construcción se mencionan en las Tabla 16, 17 y 18. A partir de esos valores se calculó las unidades formadoras de colonias (CFU) y la eficacia de transformación (TE), cuya formulación matemática implica dividir el número global de células que presentan el inserto de interés entre la cantidad de ADN empleada en el ensayo (Fierro et al., 2019). Las fórmulas presentadas a continuación fueron empleadas para el cálculo de ambas variables. El criterio para verificar un proceso de transformación exitoso fue contabilizar las colonias aisladas en las placas de medio LB con su antibiótico respectivo.

$$CFU = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución} \times \text{Vol de transformación}}{\text{Volumen sembrado}}$$

$$TE \left(\frac{cfu}{ug} \right) = \frac{TC}{\text{Concentración de ADN plasmídico (ug)}}$$

Tabla 16*Número de colonias transformadas en el nivel L0*

Cepa	Réplica	Colonias	CFU	TE (cfu/μg)
DH5α	1	163	4,24E+08	3,39E+07
DH5α	2	186	4,84E+08	3,87E+07
DH5α	3	204	5,30E+08	4,24E+07

Nota. Las transformaciones de L0 se realizaron únicamente en la cepa *E. coli* DH5α

Tabla 17*Número de colonias transformadas en el nivel L1*

Cepa	Réplica	Colonias	CFU	TE (cfu/μg)
DH5α	1	127	3,30E+08	5,21E+07
DH5α	2	98	2,55E+08	4,02E+07
DH5α	3	111	2,89E+08	4,55E+07

Nota. Las transformaciones de L1 se realizaron únicamente en la cepa *E. coli* DH5α

Tabla 18*Número de colonias transformadas en el nivel L2*

Cepa	Réplica	Colonias	CFU	Eficiencia (cfu/μg)
DH5α	1	83	2,16E+08	6,82E+07
DH5α	2	75	1,95E+08	6,16E+07
DH5α	3	87	2,26E+08	7,15E+07
JM109	1	125	3,25E+08	1,03E+08
JM109	2	132	3,43E+08	1,08E+08
JM109	3	160	4,16E+08	1,31E+08

Cepa	Réplica	Colonias	CFU	Eficiencia (cfu/μg)
TOP10	1	76	1,98E+08	6,24E+07
TOP10	2	69	1,79E+08	5,67E+07
TOP10	3	65	1,69E+08	5,34E+07

Nota. Las transformaciones de L2 se realizaron en 3 cepas de *E. coli*

La aparición de colonias blancas indica bacterias transformadas que han adquirido el fragmento de interés mientras colonias azules indica bacterias no transformadas. El conteo de las mismas fue realizado dos días post siembra en medio Agar-LB y el antibiótico correspondiente a cada nivel de construcción.

Se aplicó un análisis de varianza (Anova) a las transformaciones de la cepa DH5α en los 3 niveles (Tabla 19), así como a las transformaciones del nivel L2 en las tres cepas: DH5α, JM109 y Top10 (Tabla 21) para evaluar la existencia de diferencias significativas, utilizando el software Infostat. También se realizó un análisis comparativo de medias Tuckey para identificar la similitud o diferencia entre los tratamientos (Tabla 20 y 22). Los resultados gráficos en formato estadístico se visualizan en las Figuras 12 y 13.

Tabla 19

Anova de la eficiencia de transformación para la cepa DH5α de los tres niveles de construcción plasmídica

Fuente de variación	F	Valor de p
Niveles	25,28	0,0012

Nota. El nivel de significancia para el análisis fue de 0,05.

Tabla 20

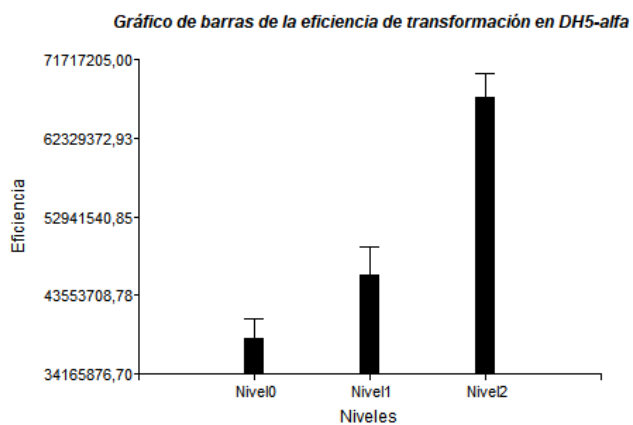
Análisis Tuckey de la eficiencia de transformación para la cepa DH5 α de los tres niveles de construcción plasmídica

Nivel de construcción	Media
L0	3,83E+07
L1	4,59E+07
L2	6,71E+07

Nota. Medias que comparten una letra no muestran diferencias significativas ($p > 0,05$).

Figura 12

Gráficos estadísticos de la eficiencia de transformación en los tres niveles de la cepa DH5 α



Nota. Medias y error estándar de la cepa DH5 α transformadas con shock térmico.

Tabla 21

Anova de la eficiencia de transformación para las 3 cepas E. coli del nivel L2

Fuente de variación	F	Valor de p
Niveles	30,56	0,0007

Nota. El nivel de significancia es de 0,05

Tabla 22

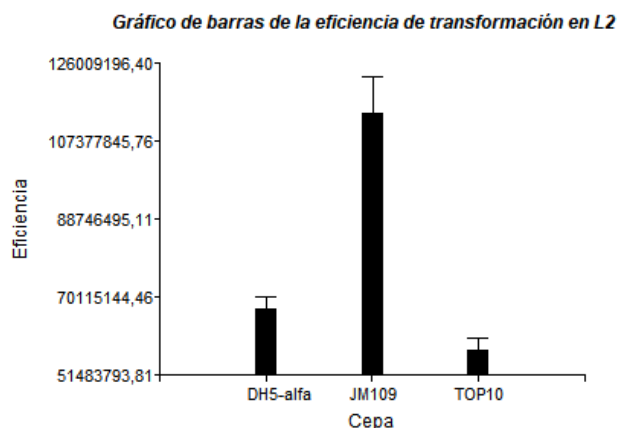
Análisis Tuckey de la eficiencia de transformación

Cepa	Eficiencia (cfu/μg)
Top10	5,75E+07
DH5α	6,71E+07
JM109	1,14E+08

Nota. Medias que comparten una letra no muestran diferencias significativas ($p > 0,05$)

Figura 13

Gráficos estadísticos de la eficiencia de transformación en L2



Nota. Valores promedio y desviación estándar de tres cepas de *E. coli* transformadas mediante tratamiento térmico.

Para poder identificar si las células se han transformado se empleó el método de verificar el color de las colonias, ello en base a los compuestos químicos IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) y X-Gal (bromo, cloro, indolil y β-galactopiranosido).

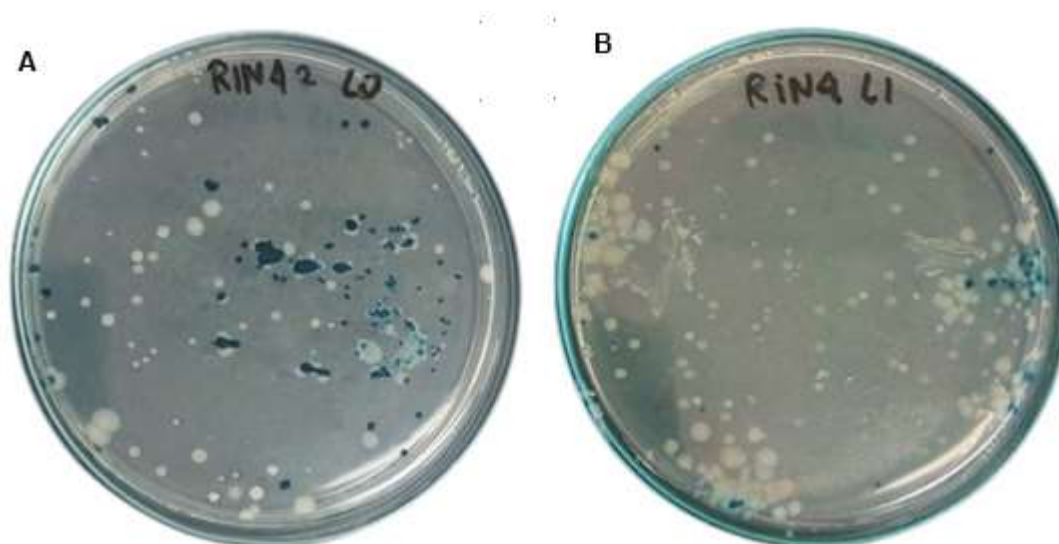
En condiciones normales, el X-gal actúa como sustrato para la enzima β-galactosidasa, generando galactosa y un pigmento de color azul como producto. Esta acción está relacionada con la expresión del operón Lac, específicamente en la región lacZ, la cual se integra en los

plásmidos de transformación (Green & Sambrook, 2019). La expresión de esta región se activa en presencia de IPTG. No obstante, en condiciones donde se busca insertar fragmentos en la región de lacZ de un plásmido ocurre lo siguiente.

Cuando hay colonias blancas, se indica que el plásmido ha ingresado a la célula, es decir, ocurrió una transformación eficiente, tal como se evidencia en las figuras siguientes (Figura 14, 15 y 16). La presencia de colonias azules indica que el plásmido ha ingresado a la célula pero no se ha recombinado y en ausencia de colonias, se indica que no ha ocurrido transformación.

Figura 14

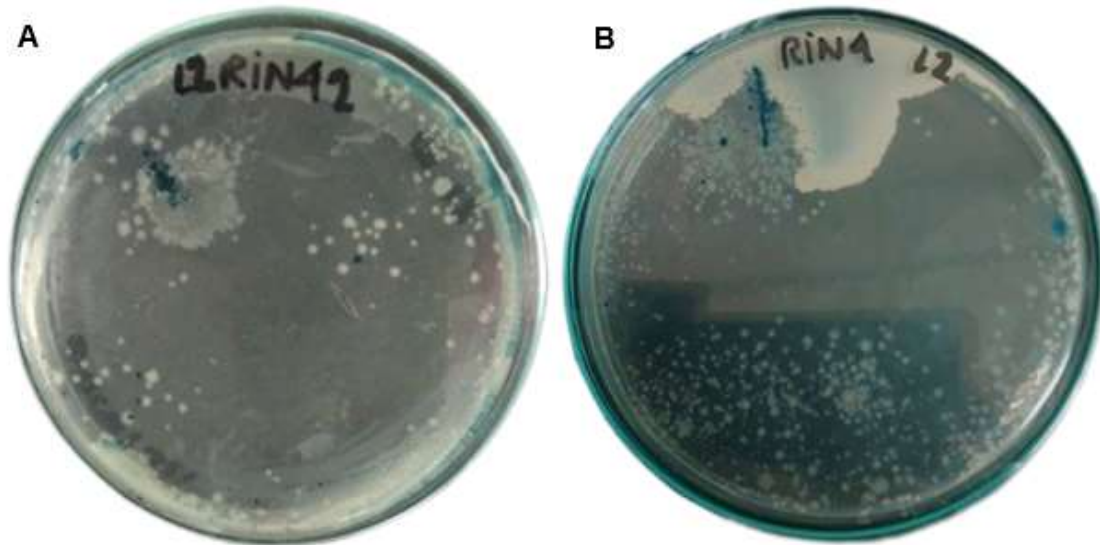
Colonias del nivel L0 y L1 transformadas en DH5 α



Nota. Colonias blancas indican transformación bacteriana. A, Transformación del constructo de nivel 0 en DH5 α . B, Transformación del constructo de nivel 1 en DH5 α .

Figura 15

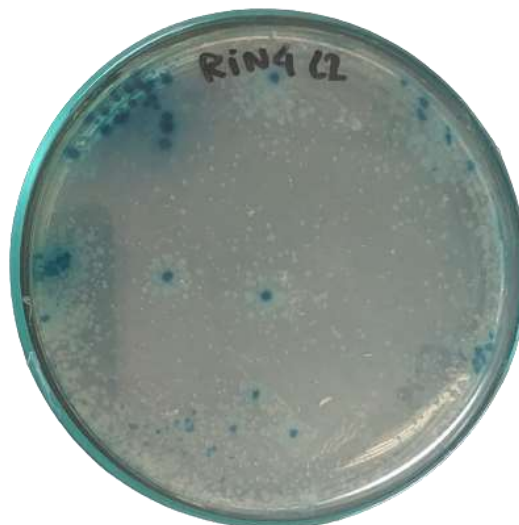
Colonias de las distintas cepas transformadas para la construcción del nivel L2



Nota. Colonias bacterianas de E. coli 2 días después de la inoculación. A, cepa Top10. B, cepa DH5 α .

Figura 16

Colonias de la cepa DH5 transformada en nivel L2



Nota. Colonias bacterianas de la cepa JM109 de E. coli 2 días después de la inoculación.

Extracción y cuantificación de ADN plasmídico

Según los valores de absorbancia (260/280) y (260/230) obtenidos de los 2 métodos de extracción de plásmidos probados: con Kit y método casero, se pudo observar que la pureza y calidad del ADN plasmídico fue significativamente mejor con la extracción alcalina (Tabla 24). En este método, las relaciones (260/280) se encontraron dentro del rango de 1,8 a 2 y las relaciones (260/230) se mantuvieron entre 2 y 2.2. En contraste con el kit comercial (Tabla 23), sus valores de absorbancia mostraron relaciones fuera de los rangos ideales mencionados.

Tabla 23

Resultados de medición de ADN a partir de extracción con Kit comercial

Plásmido	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	A 260/280	A 260/230
Blanco	0	0	0
PAGMA4723	8,67	2,297	0,759
pFH31	2,959	1,318	1,933
PAK-E2-01	1,897	1,87	1,234
pICH 47751	6,327	2,067	1,771
pICH 41766	12,45	1,649	2,346
pFH113	384,2	1,801	2,183
pFH23	37,65	1,873	1,708
pFH114	434,4	1,753	1,505

Nota. La solución “blanco” para la lectura espectrofotométrica de ADN fue agua libre de nucleasas.

Tabla 24*Resultados de medición de ADN a partir de extracción casera*

Plásmido	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	A 260/280	A 260/230
Blanco	0	0	0
PAGMA4723	2933	2,015	1,949
pFH31	3014	2,4	2,2
PAK-E2-01	3407	1,7	1,7
pICH 47751	2816	2	1,9
pICH 41766	2902	2,008	2,029
pFH113	2789	1,97	2,13
pFH23	2805	1,952	1,887
pFH114	3125	1,87	2,19

Nota. La solución “blanco” para la lectura espectrofotométrica de ADN fue agua libre de nucleasas.

La extracción de ADN plasmídico de los diferentes niveles de construcción bajo el método de lisis alcalina alcanzó los valores mencionados de la Tabla 25.

Tabla 25*Resultados de medición de ADN plasmídico de los niveles L0, L1, L2*

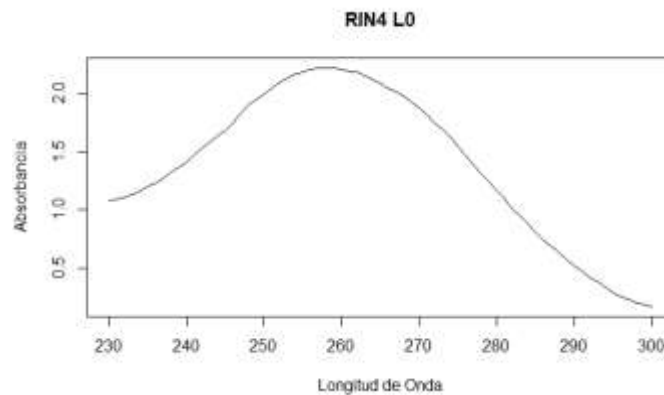
Nivel	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	A 260/280	A 260/230
L0	3252	1,907	2,162
L1	1648	1,993	2,109
L2	823	1,975	2,035

Nota. La solución “blanco” para la lectura espectrofotométrica de ADN fue agua libre de nucleasas.

Se enfatizó en verificar la pureza de las muestras de ADN plasmídicas extraídas bajo el protocolo de lisis alcalina empleando un espectrofotómetro, los valores generados de longitud de onda y absorbancia fueron graficados en el programa R Studio y se ilustran en las Figuras 17, 18 y 19.

Figura 17

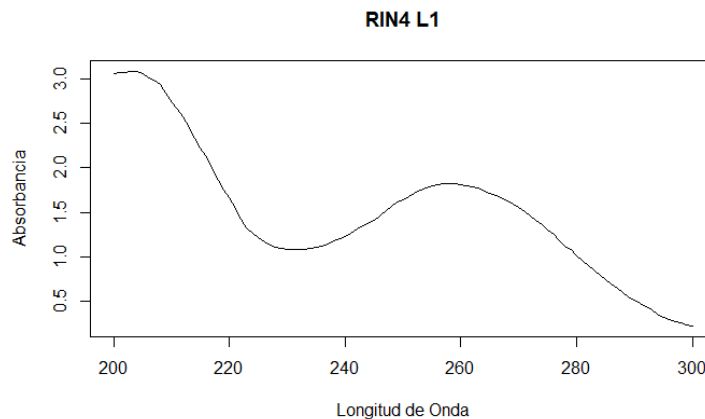
Espectro de cuantificación de ADN para la construcción plasmídica L0



Nota. El eje vertical muestra la longitud de onda (nm) y el eje horizontal representa la absorbancia de la muestra. Imagen generada en R Studio.

Figura 18

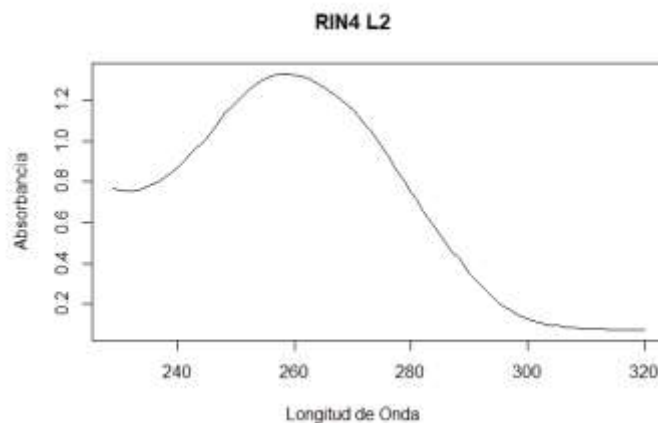
Espectro de cuantificación de ADN para la construcción plasmídica L1



Nota. El eje Y representa la longitud de onda (nm) y el eje X la absorbancia de la muestra. Imagen generada en R Studio.

Figura 19

Espectro de cuantificación de ADN para la construcción plasmídica L2



Nota. El eje Y representa la longitud de onda (nm) y el eje X la absorbancia de la muestra.

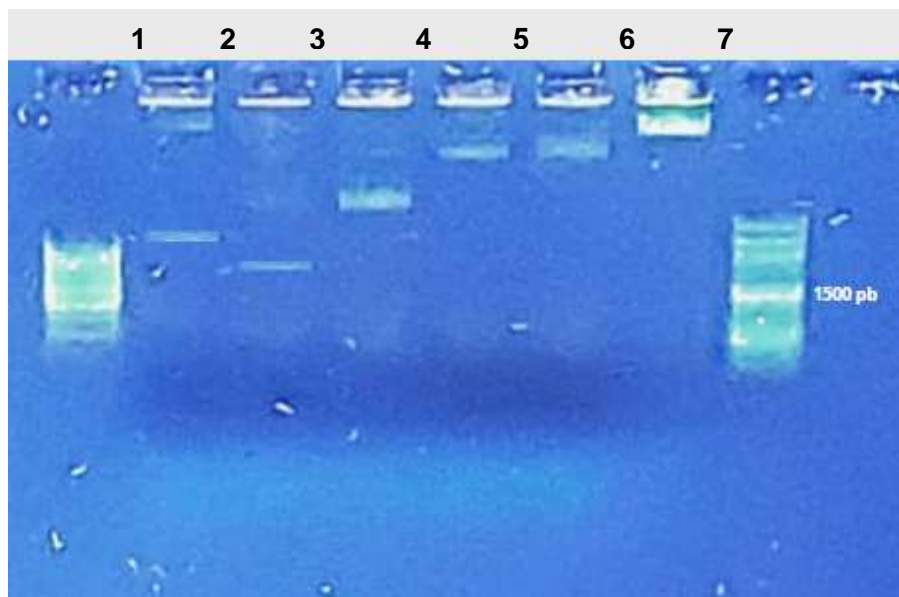
Imagen generada en R Studio.

Validación de plásmidos

Tras realizar el análisis mediante gel de electroforesis, se confirmó que los plásmidos extraídos con el método de lisis alcalina correspondían a los plásmidos esperados, al comparar su tamaño en pares de bases (pb) con la posición de las bandas obtenidas en los geles (Figuras 20, 21, 22 y 23). Los resultados mostraron una concordancia precisa entre el tamaño esperado de los plásmidos y la ubicación de las bandas en el gel.

Figura 20

Perfil electroforético de la extracción plasmídica de los plásmidos base



Nota. Se empleó un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio, TAE 1X. Carril 1, marcador de peso 1 Kb plus DNA Ladder, Carril 2, plásmido pICH41766. Carril 3, plásmido pFH31. Carril 4, plásmido pFH119. Carril 5, plásmido pFH23. Carril 6, plásmido PAGM4723. Carril 7, marcador de peso 1 kb plus.

Figura 21

Perfil electroforético de la extracción de plásmidos del nivel L0



Nota. Se empleó un gel de agarosa 1,5 % con bromuro de etidio y TAE 1X. Carril 1, marcador de peso 1 Kb plus DNA Ladder, Carril 2, plásmido L0. Carril 3, réplica del plásmido L0.

Figura 22

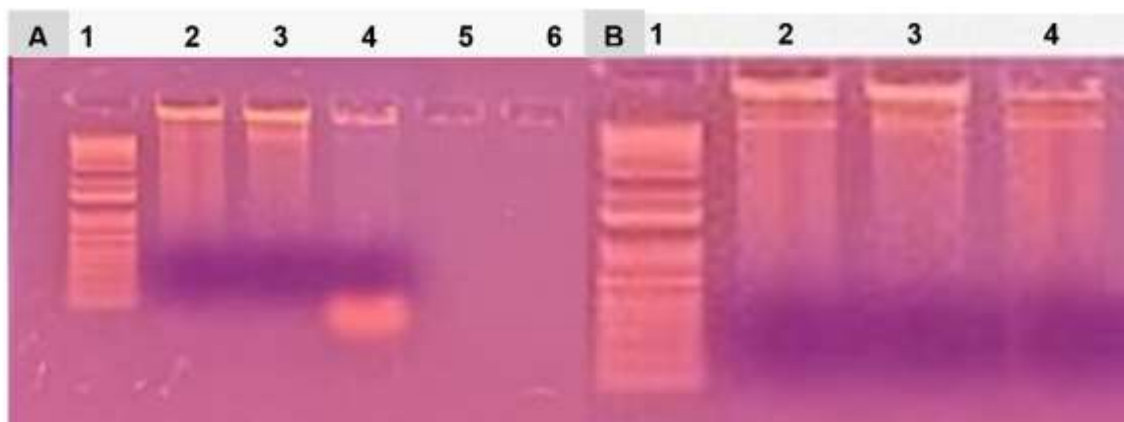
Perfil electroforético de la extracción de plásmidos del nivel L1



Nota. Se empleó un gel de agarosa 1,2 % con bromuro de etidio y TAE 1X. Carril 1, marcador de peso 1 Kb plus DNA Ladder. Carril 2, plásmido L1. Carril 3, replica del plásmido L1.

Figura 23

Perfil electroforético de la extracción de plásmidos del nivel L2



Nota. Se empleó un gel de agarosa 1 % con bromuro de etidio y TAE 1X. (A). Carril 1, marcador de peso 1 Kb plus DNA Ladder. Carril 2, plásmido L2 de la cepa Top10. Carril 3, plásmido L2 de la cepa JM109. (B). Carril 1, marcador de peso 1 Kb plus DNA Ladder. Carril 2, plásmido L2 de la cepa Top10. Carril 3, plásmido L2 de la cepa JM109. Carril 4, plásmido L2 de la cepa DH5α.

Capítulo V: Discusión

Reconocimiento de la zona promotora

La identificación y caracterización de la región codificante del gen RIN 4 en *Musa acuminata* revisten una importancia crucial para la comprensión de su regulación génica y, por ende, para determinar la funcionalidad de la construcción del vector plasmídico dirigido al promotor de dicho gen. El término "promotor" se refiere a las regiones reguladoras en cis que dirigen la transcripción de las zonas adyacentes o cercanas al sitio de inicio de la transcripción (TSS), siendo en términos funcionales la secuencia de ADN situada "aguas arriba" de un gen (Potenza et al., 2004). En este contexto, la búsqueda del promotor del gen RIN4 se centró en caracterizar las secuencias situadas aguas arriba del extremo 5' del gen.

En plantas, la ubicación exacta de los promotores en relación a un gen específico está en influenciado por diversos factores como el tipo de especie, la estructura y su regulación génica. Limitar los pares de bases aguas arriba a 500 nucleótidos de la secuencia codificante permitió definir un promotor de 50 pb, con un contenido de Citocina-Guanina del 36%, esto se valida con investigaciones previas de estudios de regulación génica donde evidencian que la zona máxima a la cual puede estar un promotor es de 1500 pares de bases aguas arriba del punto de inicio de la transcripción (Bianchi et al., 2015). Aun así, a medida que se reduce la región proximal del promotor en un rango de [-500 a +200]pb en relación al TSS se aumenta la precisión de la predicción (Ksouri et al., 2021).

Adicionalmente, la presencia de múltiples sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) permitió validar que la región seleccionada es promotora del gen RIN4, ello dado que según De Guglielmo & Fernandez Da Silva (2016), la presencia de elementos reguladores como los encontrados pueden activar o inhibir la transcripción de un gen. Esta información se corrobora con los análisis realizados, dado que a una distancia de 1500 pb se evidencio una

disminución progresiva de los TFBS respecto al extremo 5' del TSS de RIN4 en comparación con el promotor localizado en el rango de 500 pares de bases.

La presencia de una caja TATA en el promotor seleccionado, es decir la opción 2, autentifica el reconocimiento de la enzima ARN polimerasa para la síntesis del ARNm a partir de una plantilla de ADN (Dey et al., 2015). Su identificación respalda su ubicación en la región promotora, dado que este elemento es crucial en la regulación génica y se conserva en gran medida en genes eucariotas, incluyendo las plantas (Kiran et al., 2006).

Diseño del ARN guía

En el contexto de la tecnología CRISPR-Cas9, la selección adecuada de un ARN guía (sgRNA) resulta fundamental en el proceso de edición génica. Para lograr un diseño efectivo, es esencial considerar la secuencia objetivo ideal mediante el empleo de herramientas bioinformáticas. En este sentido, la elección del software CRISPOR se basó en el rendimiento de la predicción de ARN guías previamente descrito por otros investigadores, maximizando así la probabilidad de obtener un diseño eficiente.

La selección del sgRNA implicó la consideración de varios criterios independientes para garantizar un enfoque exitoso y altamente específico. Estos criterios abarcan desde la especificidad del objetivo hasta la predicción de la eficiencia de corte, los valores de "off-target", la secuencia PAM, la longitud de los nucleótidos y la composición estructural, además de la compatibilidad con el sistema de entrega (Konstantakos et al., 2022).

El primer aspecto a considerar es la capacidad del ARN guía para dirigirse de manera selectiva y precisa al objetivo genómico deseado, minimizando las interacciones no deseadas en el genoma. Valores de especificidad superiores al 90% como se ha establecido en estudios anteriores (Doench et al., 2016), aseguran una edición génica precisa y dirigida. Bajo

este enfoque, es importante destacar que todos los ARN guías propuestos superan tal umbral, lo que fortalece la confianza en su capacidad una edición génica específica y controlada.

Por otra parte, la eficiencia de un ARN se refiere a su capacidad guía para dirigir de manera precisa y efectiva la enzima Cas9 a la ubicación deseada en el genoma. En el programa CRISPOR, se ofrece una variedad de puntajes relacionados con la eficiencia. En este caso se evaluó los ARN guías utilizando la puntuación propuesta por Moreno-Mateos, que es especialmente recomendada para guías transcritas in vitro con el promotor T7 (Moreno-Mateos et al., 2015). Bajo ese análisis, solamente el sgRNA2 superó la eficiencia del 67%, porcentaje recomendado para garantizar un corte efectivo de la Cas9 en el sitio de ADN objetivo (Hsu et al., 2013).

La evaluación de los posibles efectos fuera del objetivo (off-target) se basó en el análisis del número de desajustes presentes. Un mayor valor en este contexto indica una mayor probabilidad de obtener mutaciones fuera del objetivo deseado debido a la presencia de secuencias homólogas en loci diferentes (Concordet & Haeussler, 2018). Siguiendo este criterio, el sgRNA2 presentó el menor número de efectos off-target con una puntuación de 7, mientras que el sgRNA1 mostró el mayor número de efectos off-target con una puntuación de 13.

La elección adecuada del ARN guía también requiere tener en cuenta las interacciones específicas entre Cas9 y el motivo adyacente protoespaciador canónico (PAM). Para ello, se seleccionó ARN guías que coincidieran con la secuencia de trinucleótidos 5'-NGG-3', característica del sistema CRISPR-Cas9 empleado en este ensayo. Aunque la identidad de la base N en la posición 5' es flexible, estudios anteriores han demostrado que las citosinas (C) son más favorecidas en comparación con las timinas (T) en esta posición (Chuai et al., 2018). Las timinas en esta posición han sido asociadas con una actividad reducida de Cas9 (Doench

et al., 2014). Por lo tanto, los ARN guías que no cumplían con esta característica, como el primer y cuarto sgRNA, fueron descartados como alternativas viables en el diseño.

Finalmente, una composición estructural de Citocina-Guanina (C-G) en el rango del 40 al 60% es considerada óptima para la eficacia del ARN guía. En este sentido, los modelos de sgRNA 2, 3 y 4 cumplen con esta recomendación en sus secuencias, demostrando una eficiencia potencial, a excepción del sgRNA 1, que presenta una composición C-G del 35%, lo que podría sugerir una característica ineficiente que podría repercutir en una menor actividad de la Cas9 (Konstantakos et al., 2022).

En conclusión, basándose en la evaluación de los diversos parámetros considerados, se seleccionó al sgRNA 2 como el modelo óptimo para la construcción del vector plasmídico. Su alto rendimiento en términos de especificidad, eficiencia de corte, valores off-target, secuencia PAM y composición estructural C-G lo convierten en la elección más prometedora para llevar a cabo la edición génica deseada.

Ensayos de PCR de colonias

Para evaluar la eficiencia de la amplificación mediante PCR de colonias, se consideraron múltiples criterios, entre ellos el tamaño, intensidad y forma de la banda resultante, así como la relación de ruido y la replicabilidad. Al analizar la electroforesis de las muestras correspondientes al nivel L1, se identificó una banda que coincidía con el tamaño predicho. Esta banda exhibió una intensidad moderada y una forma bien definida en el gel, lo cual, de acuerdo con la literatura científica (Zhang et al., 2017), es indicativo de la ausencia de productos secundarios o no específicos. Este patrón de resultados sugiere que el amplicón generado corresponde al ADN deseado, el cual es promotor Tau Pol III, el ARN guía y un end linker.

En contraste, la ausencia de amplificación en el nivel L2 puede atribuirse a posibles problemas en el diseño de los primers en lugar de estar relacionada con el proceso de transformación. Esta suposición se refuerza debido a que la visualización en gel de electroforesis de los plásmidos extraídos del nivel L2 reveló la presencia de una banda que concordaba con el tamaño esperado. Esta observación respalda la idea de que el proceso de transformación en sí mismo no sería el factor limitante en este caso y sugiere optimización del diseño de los primers.

Un diseño óptimo de primers debe satisfacer ciertos criterios esenciales, tales como especificidad, una longitud de 18 a 30 nucleótidos, un contenido de GC en el rango del 50-60%, puntos de fusión (T_m) similares entre los primers, y evitar secuencias repetitivas. Además, se debe considerar una temperatura de annealing adecuada que esté alineada con la composición de la secuencia objetivo. Sin embargo, es evidente que el diseño de los primers forward y reverse no logró cumplir plenamente con estos requisitos básicos.

Es crucial evitar una diferencia de temperaturas de fusión (T_m) excesiva entre los primers, ya que esto podría tener repercusiones negativas en la eficiencia y especificidad de la reacción de PCR (Álvarez-Fernández, 2013a). Una diferencia de 5°C en la T_m puede conducir a la formación de dímeros, lo cual coincide con lo observado en los resultados obtenidos. Además, se recomienda que la temperatura de fusión esté dentro del rango de 55 a 65°C . En este sentido, la temperatura de melting utilizada en los experimentos podría estar correlacionada con resultados ambiguos, dado que no necesariamente cumple con estos rangos sugeridos. Esto se respalda dado que el contenido de GC se relaciona con la temperatura de melting y afecta directamente la eficiencia de la hibridación y la amplificación (Álvarez-Fernández, 2013b).

El tamaño del fragmento de ADN esperado es de 10099 pb, longitud para la que se recomienda el uso de polimerasas de alta fidelidad (Aschenbrenner & Marx, 2017). Sin

embargo, las amplificaciones se intentaron con una taq polimerasa estándar, lo cual podría justificar la ausencia de amplicón esperado.

Extracción de ADN plasmídico

Se destacan notables diferencias entre los dos métodos de extracción de ADN plasmídico utilizados en este estudio. El enfoque casero mostró consistentemente un rendimiento más elevado en comparación con el kit comercial empleado. A pesar de que el kit comercial se basa en un protocolo estandarizado, los resultados divergentes podrían ser atribuidos a diversos factores, como la posible presencia de contaminantes en los reactivos utilizados o las condiciones específicas del entorno de laboratorio.

La discrepancia en los resultados obtenidos podría respaldarse por los valores fuera de rango en las lecturas de absorbancia. Según lo reportado por (Lucena-Aguilar et al., 2016), valores por debajo de 1.6 en la relación 260/280 podrían indicar la presencia de proteínas y fenoles, mientras que valores inferiores a 2 en el índice 230/280 podrían estar relacionados con la contaminación por solventes orgánicos y sales. Estos datos sugieren que los resultados del kit comercial podrían estar afectados por impurezas presentes en las muestras, lo que a su vez influiría en los valores de absorbancia.

En contraste, se observó que la mayoría de los valores obtenidos para ambos criterios de absorbancia en el método de extracción se ajustan a los rangos esperados. Esta consistencia en los resultados sugiere un nivel adecuado de pureza y eficacia en la extracción del plásmido, lo que, de acuerdo con las recomendaciones de (Lucena-Aguilar et al., 2016), respalda la idoneidad del material extraído para llevar a cabo futuros ensayos con confianza.

Eficiencia de transformación

La transformación, proceso mediante el cual se introduce y expresa ADN exógeno en células bacterianas competentes, puede ser alcanzada a través de métodos naturales,

químicos o físicos (Kostylev et al., 2015a). Los resultados obtenidos en este estudio corresponden a una transformación mediada por método químico, de modo que los reactivos empleados en generar la competitividad resultan factores clave en los resultados obtenidos. Bajo ese sentido, el uso de una concentración de 30-100 mM de cloruro de magnesio en el protocolo facilita la adsorción del ADN en la superficie celular y posterior entrada al citoplasma tras el efecto del choque térmico (Kostylev et al., 2015b).

Aunque *E. coli* es un modelo estándar para los procesos de clonación debido a su rápido crecimiento, transformación eficiente y cultivos celulares sencillos de obtener, la eficiencia de transformación se ve influenciada por factores como el tipo de cepa y el tamaño del plásmido (Fierro et al., 2019).

La evaluación de la transformación se llevó a cabo considerando la eficiencia y la fidelidad. Siendo eficiencia el número de colonias obtenidas en relación a la cantidad de ADN introducido, mientras que la fidelidad se refiere a la incorporación exitosa de todos los fragmentos en una construcción genética (Majeed et al., 2011), aspecto evidenciado en la correspondencia del tamaño de bandas en los perfiles electroforéticos. En este contexto, se observaron diferencias significativas en la eficiencia de transformación entre las cepas DH5 α y Top 10 respecto a JM109 ($p < 0,05$) donde $p = 0,0007$, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula en favor de la hipótesis alternativa. Por otro lado, las cepas DH5 α y Top 10 no mostraron diferencias significativas entre sí.

En cuanto a la concentración de ADN utilizada en las partes a ensamblar, se observó que esta fue mayor de la requerida por el protocolo de corte y ligación (1ng). Este enfoque garantizó la obtención de las construcciones deseadas y una alta fidelidad. En contra parte, incluso si la concentración de ADN hubiera sido baja, el uso de células altamente competentes, como las empleadas en este ensayo, aseguró que una cantidad adecuada de células absorbiera de manera efectiva los ensamblajes realizados (Kostylev et al., 2015a).

Las variaciones entre valores referenciales y obtenidos en el presente proyecto sobre la eficiencia de transformación para las tres cepas evaluadas se pueden explicar debido a las condiciones experimentales específicas empleadas en el estudio y la propia naturaleza de la cepa. Según varios autores, las eficiencias regulares de DH5 α , Top 10 y JM109 corresponden a 10^8 , 10^9 y 10^8 colonias transformantes por microgramo de ADN plasmídico respectivamente (*Competent Cells for Transformation - EC*, s. f.) (Zhang et al., 2017), no obstante, al compararlos con los resultados de $6,71e^{07}$, $5,75e^{07}$ y $1,14e^{08}$, en el mismo orden de cepas, reflejan un cambio relativo a lo esperado.

La eficiencia observada en la cepa DH5 α está estrechamente ligada a su capacidad para garantizar estabilidad *in vivo* de plásmidos ensamblados, incluso con la incorporación de hasta seis fragmentos de ADN de doble cadena, con tamaños que van desde 150 pb hasta al menos 7 kb (Thomason et al., 2014). Por lo tanto, la inserción de los cuatro fragmentos en el backbone del nivel L2 no parece afectar la capacidad de transformación de esta cepa. Sin embargo, los resultados obtenidos podrían estar influenciados por una posible pérdida de competitividad debido a procesos de selección ambiental (Hottes et al., 2013).

Por otro lado, la alta eficiencia de transformación en la cepa JM109 podría estar relacionada con la deficiencia en enzimas de metilación. Estas enzimas son responsables de facilitar la incorporación de ADN exógeno y, por lo tanto, permitir la expresión del inserto que contiene el gen de resistencia, un indicador de transformación exitosa. Además, según (Inoue et al., 1990), esta cepa presenta una capacidad moderada de reparación del ADN, lo que podría contribuir a evitar la degradación del ADN exógeno y aumentar la posibilidad de que se conserve y se exprese en la bacteria. Estos argumentos se reflejan en los resultados obtenidos, y la alta expresión de la proteína RecA puede haber influido en una recombinación homóloga efectiva, lo que permitiría que los plásmidos se expresen en las células.

En cuanto a la cepa Top10, esta variante posee un sistema de reparación de ADN intacto para su propio material genético. Sin embargo, esta característica puede ser una desventaja en términos de la incorporación de ADN exógeno debido a la intervención de enzimas como las glicosilasas, endonucleasas y exonucleasas, que podrían reducir la eficiencia de transformación (Majeed et al., 2011). Esto podría explicar los resultados obtenidos. Además, el bajo número de colonias transformadas podría estar relacionado con una integración subóptima de los plásmidos en las células, respaldado por la limitada expresión de RecA en Top 10. Esta baja expresión podría afectar negativamente la integración efectiva del ADN en el genoma celular y, por ende, la producción de colonias transformadas.

Un análisis adicional que respalda la disminución del número de colonias transformadas entre niveles a medida que aumenta el tamaño del plásmido se puede justificar por la complejidad que les resulta a los plásmidos ensamblados con más de cinco fragmentos ser difundidos y absorbidos a través de los poros celulares (Hanahan, 1983).

Capítulo VI: Conclusiones

Se logró un diseño eficiente de ARN guía para ensayos in vitro que requieren de la tecnología CRISPR/Cas9 en *Musa acuminata*. La especificidad del objetivo (>90), la eficiencia de corte (>45) y la composición estructural permitió seleccionar el sgRNA2 como el modelo óptimo para la construcción del vector plasmídico.

El estándar MoClo de Golden Gate resultó ser un método eficaz para ensamblar múltiples fragmentos en una sola reacción. El perfil electroforético y la amplificación de PCR de colonias proporcionó información esencial sobre la buena calidad y alta fidelidad de las construcciones génicas obtenidas, el nivel final (L2) contiene la secuencia del ARN guía diseñado, una nucleasa y un promotor para monocotiledóneas.

Los métodos de extracción de ADN plasmídico presentaron diferencias importantes en términos de rendimiento y pureza. El método casero de lisis alcalina demostró ser más efectivo, incluso en costos y tiempo.

La transformación bacteriana mediada por método químico demostró ser exitosa en introducir y expresar ADN exógeno en las cepas analizadas. Sin embargo, se observó diferencias en la eficiencia de transformación entre las cepas DH5 α , JM109 y Top10 a causa de factores como la capacidad de reparación del ADN, la estabilidad del plásmido y las características celulares en este proceso ($p < \alpha$) = (0,0007 < 0,05).

La cepa JM109 demuestra ser altamente eficaz en la transformación mediante shock térmico para la construcción del vector plasmídico destinado a la edición genética del promotor del gen RIN4, el cual está relacionado con la resistencia a la fusariosis en el banano.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda mejorar el diseño de primers y la elección de la polimerasa para maximizar la especificidad y amplificar eficazmente regiones insertadas en todos los niveles de construcción plasmídica.

Explorar sobre la optimización de los niveles de IPTG y Xgal para evaluar la expresión génica y la presencia de plásmidos transformados como medida de una detección más precisa.

Se propone evaluar factores como la concentración de ADN, el tiempo de incubación y las condiciones de choque térmico para maximizar la eficiencia en cada cepa.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Álamo, M. J. P., & Barea, J. L. (s. f.). 37. *Purificación de ácidos nucleicos*.
- Álvarez-Fernández, R. (2013a). Chapter One - Explanatory Chapter: PCR Primer Design. En J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 1-21). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00001-X>
- Álvarez-Fernández, R. (2013b). Chapter One - Explanatory Chapter: PCR Primer Design. En J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 1-21). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00001-X>
- Andreou, A. I., & Nakayama, N. (2018). Mobius Assembly: A versatile Golden-Gate framework towards universal DNA assembly. *PLOS ONE*, 13(1), e0189892.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189892>
- Aschenbrenner, J., & Marx, A. (2017). DNA polymerases and biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 48, 187-195.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.04.005>
- Bermúdez, I. (2014). Herramientas biotecnológicas para el combate de la raza 4Tropical de *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense en *Musa* spp. *Biotecnología Vegetal*, 14(4), Article 4. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/82>
- Bianchi, V. J., Rubio, M., Trainotti, L., Verde, I., Bonghi, C., & Martínez-Gómez, P. (2015). Prunus transcription factors: Breeding perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 6.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00443>
- Brandoli, C., Petri Serrano, C., & Weiss, J. R. (2019). *Diseño de ARN guía para la edición del gen Gigantea en Solanáceas*. Universidad Politécnica de Cartagena.
<https://repositorio.upct.es/handle/10317/11128>
- Chávez, V. (2018). *El sistema de edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico*. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2018000200200

- Chen, Y., Chen, W., Huang, xue-lin, Hu, X., Zhao, J., Gong, Q., Li, X., & Huang, X. (2013). Fusarium wilt-resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS-induced mutation a micro-cross-section cultural system. *Plant Pathology*, 62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02620.x>
- Chuai, G., Ma, H., Yan, J., Chen, M., Hong, N., Xue, D., Zhou, C., Zhu, C., Chen, K., Duan, B., Gu, F., Qu, S., Huang, D., Wei, J., & Liu, Q. (2018). DeepCRISPR: Optimized CRISPR guide RNA design by deep learning. *Genome Biology*, 19(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1459-4>
- Competent Cells for Transformation—EC.* (s. f.). Recuperado 18 de agosto de 2023, de <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation.html>
- Concepción, M. (2018). CRISPR/Cas: Aplicaciones y perspectivas para el mejoramiento genético de plantas. *Bioteología Vegetal*, 18(3), Article 3. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/585>
- Concordet, J.-P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W242-W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>
- Cong, L., & Zhang, F. (2015). Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1239, 197-217. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1_10
- De Guglielmo, Z., & Fernandez Da Silva, R. (2016). Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Revista Colombiana de Bioteología*, 18, 118. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61529>
- Dey, N., Sarkar, S., Acharya, S., & Maiti, I. B. (2015). Synthetic promoters in planta. *Planta*, 242(5), 1077-1094. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2377-2>

- Dita, M. A., Waalwijk, C., Buddenhagen, I. W., Souza Jr, M. T., & Kema, G. H. J. (2010). A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology*, *59*(2), 348-357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x>
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, *34*(2), 184-191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>
- Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B. L., Xavier, R. J., & Root, D. E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature Biotechnology*, *32*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>
- Edel, V., & Lecomte, C. (2019). Current Status of *Fusarium oxysporum* Formae Speciales and Races. *Phytopathology*®, *109*(4), 512-530. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW>
- Fierro, M. G. G., Cárdenas, S. Y. G., Hidrogo, D. G. R., González, C. C. A., Acosta, Ó. E. J., Duarte, M. R. E., & Solís, G. P. E. (2019). Comparación de la eficiencia de transformación entre diferentes cepas de *E. coli*: *TECNOCIENCIA Chihuahua*, *13*(2), Article 2. <https://doi.org/10.54167/tch.v13i2.434>
- Figueroa, W. (2020). *Capacidad de infección de Fusarium oxysporum f. Sp. Cubense raza 1 en el cultivar de banano Gros Michel (Musa AAA)*. [BachelorThesis, Quevedo: Ecuador]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/6011>
- Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *6*, 253. <https://doi.org/10.3791/253>

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Screening Bacterial Colonies Using X-Gal and IPTG: α -Complementation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(12).
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot101329>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- Hasegawa, H., Suzuki, E., & Maeda, S. (2018). Horizontal Plasmid Transfer by Transformation in *Escherichia coli*: Environmental Factors and Possible Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02365>
- Hottes, A. K., Freddolino, P. L., Khare, A., Donnell, Z. N., Liu, J. C., & Tavazoie, S. (2013). Bacterial Adaptation through Loss of Function. *PLOS Genetics*, 9(7), e1003617.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003617>
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), 827-832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Hwang, S.-C., & Ko, W.-H. (2004). Cavendish Banana Cultivars Resistant to *Fusarium* Wilt Acquired through Somaclonal Variation in Taiwan. *Plant Disease*, 88(6), 580-588.
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.6.580>
- Ibáñez, D. M. I., Mazzuocolo, D., & Rinflerch, A. (2021). *CRISPR-Cas, el editor de genes*. 41.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23-28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p)
- Iverson, S. V., Haddock, T. L., Beal, J., & Densmore, D. M. (2016). CIDAR MoClo: Improved MoClo Assembly Standard and New *E. coli* Part Library Enable Rapid Combinatorial Design for Synthetic and Traditional Biology. *ACS Synthetic Biology*, 5(1), 99-103.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00124>

- Khiyami, M. A., Almoammar, H., Awad, Y. M., Alghuthaymi, M. A., & Abd-Elsalam, K. A. (2014). Plant pathogen nanodiagnostic techniques: Forthcoming changes? *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *28*(5), 775-785.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2014.960739>
- Kiran, K., Ansari, S. A., Srivastava, R., Lodhi, N., Chaturvedi, C. P., Sawant, S. V., & Tuli, R. (2006). The TATA-Box Sequence in the Basal Promoter Contributes to Determining Light-Dependent Gene Expression in Plants. *Plant Physiology*, *142*(1), 364-376.
<https://doi.org/10.1104/pp.106.084319>
- Konstantakos, V., Nentidis, A., Krithara, A., & Paliouras, G. (2022). CRISPR–Cas9 gRNA efficiency prediction: An overview of predictive tools and the role of deep learning. *Nucleic Acids Research*, *50*(7), 3616-3637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac192>
- Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., & Suzuki, Y. (2015a). Cloning Should Be Simple: Escherichia coli DH5 α -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. *PLoS ONE*, *10*(9), e0137466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137466>
- Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., & Suzuki, Y. (2015b). Cloning Should Be Simple: Escherichia coli DH5 α -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. *PLoS ONE*, *10*(9), e0137466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137466>
- Ksouri, N., Castro-Mondragón, J. A., Montardit-Tarda, F., van Helden, J., Contreras-Moreira, B., & Gogorcena, Y. (2021). Tuning promoter boundaries improves regulatory motif discovery in nonmodel plants: The peach example. *Plant Physiology*, *185*(3), 1242-1258. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa091>
- León, F., Espinoza, M. A., Carvajal Romero, H., & Quezada Campoverde, J. (2022). Análisis económico de la producción bananera orgánica y convencional de la Parroquia la Iberia. *Polo del Conocimiento: Revista científico - profesional*, *7*(1), 16.
- Li, C., Deng, G., Yang, J., Viljoen, A., Jin, Y., Kuang, R., Zuo, C., Lv, Z., Yang, Q., Sheng, O., Wei, Y., Hu, C., Dong, T., & Yi, G. (2012). Transcriptome profiling of resistant and

- susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense tropical race 4. *BMC Genomics*, 13(1), 374. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-374>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264-270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Magdama, F. (2019). FUSARIUM OXYSPORUM - EL HONGO MÁS TEMIDO EN LA INDUSTRIA DEL BANANO: *ECUADOR ES CALIDAD*, 6(1), Article 1. <https://revistaecuadorestcalidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorestcalidad/index.php/revista/article/view/61>
- Majeed, M. T., Hussain, K., Noreen, M., & Izhar, M. (2011). Optimum range of plasmid supercoiled DNA for preparation of competent Top 10 E. coli. *Archives of Pharmacy Practice*, 2(2).
- Mohr, S. E., Hu, Y., Ewen-Campen, B., Housden, B. E., Viswanatha, R., & Perrimon, N. (2016). CRISPR guide RNA design for research applications. *The Febs Journal*, 283(17), 3232-3238. <https://doi.org/10.1111/febs.13777>
- Moreno-Mateos, M. A., Vejnar, C. E., Beaudoin, J.-D., Fernandez, J. P., Mis, E. K., Khokha, M. K., & Giraldez, A. J. (2015). CRISPRscan: Designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nature Methods*, 12(10), 982-988. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3543>
- Mumbanza, F. M., Kiggundu, A., Tusiime, G., Tushemereirwe, W. K., Niblett, C., & Bailey, A. (2013). In vitro antifungal activity of synthetic dsRNA molecules against two pathogens of banana, *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense and *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, 69(10), 1155-1162. <https://doi.org/10.1002/ps.3480>

- Petsakos, A., Prager, S. D., Gonzalez, C. E., Gama, A. C., Sulser, T. B., Gbegbelegbe, S., Kikulwe, E. M., & Hareau, G. (2019). Understanding the consequences of changes in the production frontiers for roots, tubers and bananas. *Global Food Security*, 20, 180-188. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2018.12.005>
- Pickar, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(8), 490-507. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>
- Piñeiro, L. (2019). *Edición genética con la técnica CRISPR–Cas9*. <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/153583>
- Potenza, C., Aleman, L., & Sengupta-Gopalan, C. (2004). Targeting Transgene Expression in Research, Agricultural, and Environmental Applications: Promoters Used in Plant Transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 40(1), 1-22.
- Rodríguez, M. Á. D., Ramos, P., & Pérez, L. (2013). *Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de Fusarium oxysporum f. Sp. Cubense en un país de la región del OIRSA (Sanidad Vegetal)*. Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria OIRSA.
- Sleight, S. C., & Sauro, H. M. (2013). Randomized BioBrick Assembly: A Novel DNA Assembly Method for Randomizing and Optimizing Genetic Circuits and Metabolic Pathways. *ACS Synthetic Biology*, 2(9), 506-518. <https://doi.org/10.1021/sb4000542>
- Sotomayor, A. (2012). *La raza tropical 4 del mal de Panamá: Amenaza potencial para la industria bananera y platanera del Ecuador*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3373>
- Swarupa, V., Ravishankar, K. V., & Rekha, A. (2014). Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. *Planta*, 239(4), 735-751. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-2024-8>

- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 85-86.
<https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100012>
- Thomason, L. C., Sawitzke, J. A., Li, X., Costantino, N., & Court, D. L. (2014). Recombineering: Genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Current Protocols in Molecular Biology*, 106, 1.16.1-1.16.39.
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0116s106>
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., & Marillonnet, S. (2011). A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *PLOS ONE*, 6(2), e16765.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>
- Werner, S., Engler, C., Weber, E., Gruetzner, R., & Marillonnet, S. (2012). Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioengineered*, 3(1), 38-43. <https://doi.org/10.4161/bbug.3.1.18223>
- Zhang, M., Liu, K., Hu, Y., Lin, Y., Li, Y., Zhong, P., Jin, X., Zhu, X., & Zhang, C. (2017). A novel quantitative PCR mediated by high-fidelity DNA polymerase. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10782-4>