

## 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, Assembly, Modular cloning, Transformation efficiency.