



Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen

Velvet en Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 1 (Foc R1).

Párraga Zambrano, Jefferson Antonio

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.

12 de agosto de 2022

COPYLEAKS

JParraga Biotec ESPE Tesis 2022.txt

Scanned on: 20:0 August 14, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	166
Words with Minor Changes	11
Paraphrased Words	214
Omitted Words	0



firmado electrónicamente por:
FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen Velvet en *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 1 (Foc R1)**” fue realizado por el señor **Párraga Zambrano Jefferson Antonio**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 16 de septiembre de 2022



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

Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.

C. C 1713443479



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

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Párraga Zambrano Jefferson Antonio**, con cédula de ciudadanía N° **1312112574**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen Velvet en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1)”** 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, 16 de agosto de 2022


Párraga Zambrano Jefferson Antonio

C.C. 1312112574



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

Autorización de Publicación

Yo, **Párraga Zambrano Jefferson Antonio**, con cédula de ciudadanía N° **1312112574**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen Velvet en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 16 de agosto de 2022

A handwritten signature in blue ink, reading 'Párraga J.A.', written over a horizontal line.

Párraga Zambrano Jefferson Antonio

C.C. 1312112574

Dedicatoria

Para las personas que nunca se rinden, lograremos un verdadero cambio.

Párraga Zambrano Jefferson Antonio

Agradecimiento

A toda mi familia que siempre estuvieron a mi lado apoyándome constantemente a pesar de cualquier adversidad. Un especial reconocimiento a mi abuelo Juan Zambrano y aquellos que ya no están con nosotros por la pandemia, siempre los llevaré en mi corazón.

Un especial agradecimiento a mi madre María Eloísa Zambrano que siempre me ha apoyado constantemente de manera incondicional y me ha demostrado lo infinito que puede ser el amor que una madre puede dar a sus hijos. A mi tío Reinaldo, tía Olilia y mi primo Juan que son mi segunda familia, me acogieron en su hogar y siempre velaron por mi seguridad, nutrición y bienestar.

A mis amigos que me ayudaron cuando lo necesite. En especial a Mary mi mejor amiga que ha logrado ser un pilar fundamental en mi vida, también, a mi mejor amigo José que más que un amigo es como un hermano.

A Anahí Cornejo que sin ella no podría haber logrado tantas metas en mi vida, una persona modelo y sobre todo en alguien que puedo confiar, cualquiera sería privilegiado al tenerte cerca. Gracias por siempre apoyarme, cuidarme y poner todo de ti para ayudarme a seguir adelante y no dejarme que me rinda a pesar de lo complicado que puede llegar a ser la vida.

Al grupo de iGEM que nos permitieron desarrollar este proyecto, por sus enseñanzas, tics, protocolos, consejos y avances. Un especial agradecimiento por acompañarme en este proyecto a Mafer, Vanessa, Carolina, Xavier, Jean, Francisco y Tanny. A Silvy la encargada del laboratorio de investigación de microbiología por su colaboración, estar pendiente y abierta a ayudarnos en el proyecto de Integración curricular.

A Francisco flores Ph. D., por sus instrucciones, ayudas y guías a lo largo del trabajo de integración curricular. Gracias por encaminarme a lo largo de la carrera.

Parraga Zambrano Jefferson Antonio

Índice de contenido

Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	7
Índice de contenido	8
Índice de tabla.....	11
Índice de figuras.....	12
Listado de abreviatura	13
Resumen	15
Abstract	16
Capítulo I: Introducción	17
Planteamiento del problema	17
Justificación del Problema	17
Objetivo de la investigación.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos Específicos	19
Hipótesis	19
Hipótesis de investigación	19
Capítulo II: Marco teórico	20
<i>Musa</i> spp.....	20
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i>	20
Síntomas.....	21
Ciclo de vida y desarrollo de Foc.....	23
Gen y Proteína Velvet	26
RNA de interferencia (RNAi)	30

Biología sintética	32
Circuito Biológico	32
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	37
Zona de estudio.....	37
Análisis <i>in silico</i>	37
Diseño experimental.....	38
Cepas de <i>Escherichia coli</i> y Foc R1	38
Medios de cultivo.....	38
Extracción de RNA total	39
Retrotranscripción del RNA total.....	39
PCR overhang	39
Extracción de plásmido	40
Kit de extracción de plásmido.....	40
Método de lisis alcalina para extracción de plásmido	40
Ensamblaje restricción-ligación	41
Restricción.....	41
Purificación	42
Ligación	42
Células competentes.....	43
Transformación de células competentes.....	43
PCR de colonias.....	43
Capítulo IV: Resultados	45
Diseño <i>in silico</i>	45
Foc R1, extracción de mRNA y retrotranscripción	48

Extracción de plásmido pSB1C3_A593+ERG11 y PCR overhang.....	50
Restricción-ligación	51
Células competentes, transformación y PCR de colonias.....	54
Diseño experimental.....	60
Análisis estadístico	60
Capítulo V: Discusión	64
Capítulo VI: Conclusiones y recomendaciones	67
Conclusiones	67
Recomendaciones.....	68
Capítulo VII: Bibliografía	69

Índice de tabla

Tabla 1	Presencia y estudios de las proteínas de la familia Velvet y LaeA en el reino fúngico.	29
Tabla 2	Componentes del circuito biológico de Agrobactory 593.	34
Tabla 3	Datos de las secuencias obtenido in silico.	48
Tabla 4	Resultados del crecimiento de Foc R1, extracción de mRNA total y retrotranscripción.	49
Tabla 5	Resultados del crecimiento de <i>E. coli</i> DH5 α , extracción de plásmido y PCR overhang.	51
Tabla 6	Resultados obtenidos del proceso de restricción-ligación.	54
Tabla 7	Resultados de células competentes y transformación en <i>E. coli</i> One Shot TOP10.	55
Tabla 8	Eficiencia de Transformación en células competentes de <i>E. coli</i> One Shot TOP10.	55
Tabla 9	Resultados de PCR de colonias.	59
Tabla 10	Resultados de las células <i>E. coli</i> HT115 transformadas.	61
Tabla 11	Eficiencia de transformación de <i>E. coli</i> HT115.	62
Tabla 12	ANOVA de la eficiencia de transformación de células <i>E. coli</i> HT115.	62
Tabla 13	Test de Tukey de la eficiencia de transformación de <i>E. coli</i> HT115.	63

Índice de figuras

Figura 1	Planta de banano Gros Michel infectado con Foc R1.	22
Figura 2	Estructura microscópica de Foc.	23
Figura 3	Marchitez por <i>Fusarium oxysporum</i>	25
Figura 4	Desarrollo asexual y células fúngicas relacionados a la proteína Velvet.	27
Figura 5	Arquitectura del dominio de las proteínas de la familia Velvet y LaeA.	28
Figura 6	Mecanismo del complejo de silenciamiento de RNAi (RISC).	31
Figura 7	Plásmido pSB1C3_A593.	35
Figura 8	Columna vertebral del plásmido con inserto para sdRNA de Agrobactory 593.	36
Figura 9	Diagrama de flujo de trabajo.	37
Figura 10	Plásmido pSB1C3_A593+ERG11.	46
Figura 11	Plásmido pSB1C3_A593+Velvet.	47
Figura 12	Foc R1 usado para la extracción de RNA total.	49
Figura 13	Amplicón del gen Velvet y plásmido pSB1C3_A593+ERG11.	50
Figura 14	Resultados de la digestión con las enzimas KpnI y BglII.	52
Figura 15	Electroforesis de la PCR de los ligados.	53
Figura 16	PCR de colonias de las células transformadas con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet.	57
Figura 17	Electroforesis de PCR de colonias para comprobar las transformaciones obtenidas.	58
Figura 18	Almacenamiento de células transformadas con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet.	60
Figura 19	Gráfica de barras del promedio de la eficiencia de transformación por tratamiento.	63

Listado de abreviatura

Ago: Argonauta

C.C.: células competentes

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dsRNA: Ácido ribonucleico de doble cadena

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

ET: Eficiencia de transformación

Foc R1: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1

Foc TR4: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4 tropical

Foc: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*

iGEM: International Genetically Engineered Machine

LB: Luria Bertani

LB+Clor: Luria Bertani con cloranfenicol (1mL LB:1μL cloranfenicol)

miRISC: Complejo de silenciamiento inducido por miRNA

miRNA: Micro RNA

miRNA: Small RNA o pequeño RNA

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

ncRNA: RNA no codificante

PDA: Agar papa dextrosa

PDA+Clor+Amp: Agar papa dextrosa que contiene cloranfenicol y ampicilina

PDB: Caldo papa dextrosa (PDB)

PIB: Producto interno bruto

pSB1C3_A593: plásmido pSB1C3 modificado por Agrobactory 593 para generar dsRNA.

pSB1C3_A593+ERG11: plásmido pSB1C3 modificado y ensamblado con el gen ERG11.

pSB1C3_A593+Velvet: plásmido pSB1C3 modificado y ensamblado con el gen *Velvet*.

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA

RITS: Silenciamiento transcripcional inducido por RNA

RNA: Ácido ribonucleico

RNAi: Ácido ribonucleico de interferencia o ribointerferencia

siRISC: Complejo de silenciamiento inducido por siRNA

UFC: unidad formadora de colonias

VeA: *Velvet A*

Resumen

El banano es el cultivo más importante en las regiones tropicales a nivel mundial, representa un porcentaje importante al PIB de estos países, como en el caso de Ecuador. Es categorizado como alimento de primera necesidad por su alto nivel nutricional. Sin embargo, existen varias enfermedades que atacan al cultivo del banano. La fusariosis del banano es causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* es una de las principales causas en las pérdidas de la industria bananera. Por esta razón es de suma importancia encontrar alternativas para neutralizar la fusariosis en el banano. El silenciamiento genético a través de la tecnología de RNA de interferencia (RNAi) es una estrategia exitosa y aprobada por investigadores de todo el mundo para contrarrestar agentes patógenos que afectan al negocio agrícola. En el presente proyecto se obtuvo un ensamblaje con el plásmido PSB1C3_A593 con el gen *Velvet* mediante la técnica de restricción-ligación. Este ensamblaje producirá dsRNA del gen *Velvet* para fabricar RNAi capaz de contrarrestar *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. El plásmido ensamblado PSB1C3_A593+Velvet se transformó en *E. coli* One Shot TOP10 y HT115. Además, se analizaron 3 tratamientos (t1=30s, t2=45s y t3=60s) para mejorar la eficiencia de transformación en *E. coli* HT115 mediante el cambio en el tiempo de shock térmico. Se obtuvo una eficiencia de transformación en *E. coli* HT115 para el tratamiento t=30s de 1102,9 UFC/ μ g, t=45s de 13161,8 UFC/ μ g y t=60s de 5171,6 UFC/ μ g, la mejor eficiencia de transformación resultó ser el tratamiento t=45s. Las colonias transformadas con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet se verificó a través de PCR de colonias.

Palabras claves: RNA de interferencia, RNA de doble cadena, cepa HT115, restricción, ligación.

Abstract

Bananas is the most important crop in tropical regions worldwide, representing an important percentage of the GNP of these countries, as in the case of Ecuador. It is categorized as a staple food because of its high nutritional value. However, there are several diseases that attack the banana crop. *Fusarium* wilt is caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and is one of the main causes of economical losses in the banana industry. For this reason, it is of utmost importance to find alternatives to neutralize *fusarium* wilt in banana. Gene silencing through RNA interference (RNAi) technology is a successful strategy approved by researchers worldwide to counteract pathogens that affect the agricultural business. In the present project, an assembly with the plasmid PSB1C3_A593 and *Velvet* gene was obtained by restriction-ligation technique. This assembly will produce dsRNA from the *Velvet* gene to make RNAi capable of counteracting *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. The assembled plasmid PSB1C3_A593+Velvet was transformed into *E. coli* One Shot TOP10 and HT115. In addition, 3 treatments (t1=30s, t2=45s and t3=60s) were analyzed to improve the transformation efficiency by changing the thermal shock time. A transformation efficiency in *E. coli* HT115 was obtained for the t=30s treatment of 1102.9 CFU/ μ g, t=45s of 13161.8 CFU/ μ g and t=60s of 5171.6 CFU/ μ g, the best transformation efficiency resulted to be the t=45s treatment. Colonies transformed with the pSB1C3_A593+Velvet plasmid were verified by PCR colony.

Keywords: interfering RNA, double-stranded RNA, HT115 strain, restriction, ligating.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

El banano es una de las especies más cultivadas en las regiones tropicales a nivel mundial, representa un porcentaje importante del producto interno bruto (PIB) de estos países. El banano ocupa el cuarto lugar en producción de entre todos los cultivos a nivel mundial, solo superado por el arroz, trigo y maíz. Además, es considerado como alimento de primera necesidad (Arias et al., 2004). La referencia más antigua de cultivos de banano data de hace 500 años a.C., se ha encontrado evidencia donde el banano está asociado con las primeras muestras de sedentarismo del ser humano (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022).

El marchitamiento por *Fusarium* o fusariosis que afecta al banano, también conocido coloquialmente como enfermedad de Panamá, es una de las principales causas en las pérdidas de producción de banano (Bragard et al., 2022). El marchitamiento es producido por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc). *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 (Foc R1) fue el causante de la destrucción de aproximadamente 50 mil hectáreas de banano Gros Michel, una variedad triploide del grupo AAA de *Musa acuminata*, en 1962 Foc R1 fue considerado una enfermedad endémica en regiones tropical, en consecuencia, el cultivar Gros Michel fue sustituido por el cultivar Cavendish, otra variedad triploide del grupo AAA de *Musa acuminata* con resistencia a Foc R1. Sin embargo, en la actualidad los cultivos *Cavendish* se ven atacados por el marchitamiento causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4 tropical (Foc TR4) (Pérez, 2004). Desde su aparición Foc TR4 se ha extendido por Asia occidental, África y recientemente en América del Sur (Magdama et al., 2020). Por esta razón el estudio de técnicas que permitan contrarrestar la marchitez por Foc es fundamental para el cultivo del banano.

Justificación del Problema

Ecuador es uno de los más grandes exportadores de banano, abarcando el 28% del mercado mundial y a nivel de la Unión Europea es proveedor del 40% de esta fruta. Representando para el país el

segundo recurso de ingreso económico, solo después del petróleo, siendo consecuentemente un ingreso significativo para el desarrollo del país y su población (Vásquez Orozco, 2017).

Actualmente se ha visto un incremento en el interés y consumo de alimentos orgánicos libre de fungicidas, plaguicidas, herbicidas y otros químicos potencialmente tóxicos para el ser humano y el ambiente, por ende, encontrar alternativas más estables es una prioridad para los gobiernos de muchos países productores (Capa Benítez et al., 2016).

El silenciamiento genético a través de la tecnología de RNA de interferencia (RNAi) es una estrategia exitosa y aprobada por investigadores de todo el mundo para contrarrestar agentes patógenos que afectan al negocio agrícola. La tecnología de RNAi se ha usado para la protección contra bacterias, hongos e insectos (Jain et al., 2018). La tecnología RNAi es un mecanismo de regulación postranscripcional, en el cual se genera una interacción molecular entre un RNA mensajero (mRNA) y un segmento corto de RNA modificado (RNAi) complementario, donde finalmente se da la escisión del mRNA mediante una proteína Argonaute evitando así la traducción a proteína (Song et al., 2018).

En la actualidad existe una plataforma modular diseñada por el grupo iGEM Ecuador llamada Agrobactory 593, la cual tiene como objetivo generar plaguicidas de bajo costo para combatir enfermedades que pueden afectar a las plantas. El grupo está implementando tecnología de RNAi para silenciar la expresión de genes esenciales para la supervivencia y virulencia de Foc (iGEM Ecuador, 2021). Dentro del proyecto de Agrobactory 593 (iGEM Ecuador, 2021) se encuentra en desarrollo el diseño de dsRNA para silenciar el gen diana *Velvet* mediante la tecnología de RNAi. El gen *Velvet* es un gen involucrado en el desarrollo de hifas, la generación y germinación de conidios, y la formación de metabolitos secundarios de Foc que inducen la virulencia frente a *Musa* spp. (iGEM Ecuador, 2021; Panchana, 2021). Por lo que el gen *Velvet* se convierte en el gen de prioridad de este proyecto para generar avances en el control de Foc mediante tecnología de RNAi.

Objetivo de la investigación

Objetivo general

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

Objetivos Específicos

- Obtener un BioBrick del gen *Velvet* mediante ensamblaje de restricción y ligación.
- Ensamblar el plásmido para la producción de dsRNA mediante técnicas de restricción y ligación.
- Transformar *Escherichia coli* cepa HT115 con el plásmido ensamblado para producir dsRNA objetivo.

Hipótesis

Hipótesis de investigación

H_o : La variación en el tiempo de shock térmico en el protocolo de transformación de células competentes no influye significativamente en la eficiencia de transformación de *Escherichia coli* cepa HT115 con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet.

H_i : La variación en el tiempo de shock térmico en el protocolo de transformación de células competentes si influye significativamente en la eficiencia de transformación de *Escherichia coli* cepa HT115 con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet.

Capítulo II: Marco teórico

Musa spp.

Existen más de mil variedades del banano, sin embargo, se estima que un 95% de los cultivos son de la variedad Cavendish (*Musa acuminata*, grupo AAA, subgrupo Cavendish) que es sumamente cotizado por su dulzura y su escasez de semillas. Este banano contiene 400 miligramos de potasio por cada 100 gramos de fruto seco, siendo una potencial ayuda para regular la presión arterial y controlar el ritmo cardíaco, produciendo que las personas que consumen banano tengan 27% menos posibilidades de sufrir enfermedades cardíacas, además, es una fuente rápida de estímulo energético para deportistas al poseer potasio, vitamina C y vitamina B6 (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, (2022) aclaró que ha existido un aumento en la exportación del banano en el año 2019, alcanzando la cantidad de 22,2 millones de toneladas, un incremento del 5% con respecto al año 2018. Debido a su actual crecimiento los principales productores de la industria bananera (Ecuador y Filipinas) estiman para el año 2028 una proyección de 135 millones de toneladas en la demanda del banano (Zhiminaicela Cabrera et al., 2020).

En Ecuador el cultivo y posterior exportación del banano representa una alta cifra en la economía local de algunas provincias del Ecuador. En principal la provincia del Oro, debido que el cultivo del banano es el principal factor económico de las localidades aledañas. Existen referencias históricas que en la provincia del Oro se da el comercio del banano desde 1910 pero sin ningún control de calidad, ni cuidado con el producto, simplemente se realizaba en racimos con un peso equivalente de 1 Kilogramo (Capa Benítez et al., 2016).

Fusarium oxysporum f. sp. cubense

Fusarium oxysporum es la especie del género *Fusarium* más común y de mayor importancia económica debido a que este hongo se transmite por el suelo y alberga cepas altamente patógenas.

Diederich F.L. von Schlechtendal aisló por primera vez *F. oxysporum* en 1824 de tubérculos podridos de papa (*Solanum tuberosum*) recolectados en Berlín, Alemania. Wollenweber en 1913 colocó *F. oxysporum* dentro de la sección *Elegans* y posteriormente se usó un rango subespecífico de clasificación “formas especiales” (*formae speciales*). Este rango subespecífico se define en función de la patogenicidad de una cepa particular de *F. oxysporum* a una especie de planta específica, sin embargo, se ha identificado formas especiales que atacan varias especies susceptibles y otros que comparten especies susceptibles (Lombard et al., 2019).

Foc R1 fue detectado por primera vez en 1908 por Sr. Horne en Cuba y las muestras fueron estudiadas en Washington por Smith en 1910, donde fue declarada forma especial para banano, además, de observar que forma macroconidios, microconidios y clamidosporas de forma típica en los haces vasculares (Smith, 1910). El marchitamiento por Foc R1 ha sido una de la más devastadoras a nivel mundial, debido a las pérdidas incontables de cultivo de banano Gros Michel, produciendo que este sea reemplazado por Cavendish, sin embargo, actualmente esta nueva variedad de banano es amenazada por Foc TR4 (López-Zapata & Castaño-Zapata, 2019). Foc TR4 apareció en la década de los 90s en el sudeste asiático como nueva variante del patógeno Foc R1 capaz de romper la resistencia producida por el banano Cavendish y otras variantes de *Musa spp.* de alto valor comercial y social. Foc TR4 fue declarada plaga cuarentenaria por el Servicio Fitosanitario del Estado del Caribe donde se explica que se debe adoptar medidas fitosanitarias, para mitigar el riesgo de contagio y evitar que se establezca en el cultivar (Rojas Miranda, 2018).

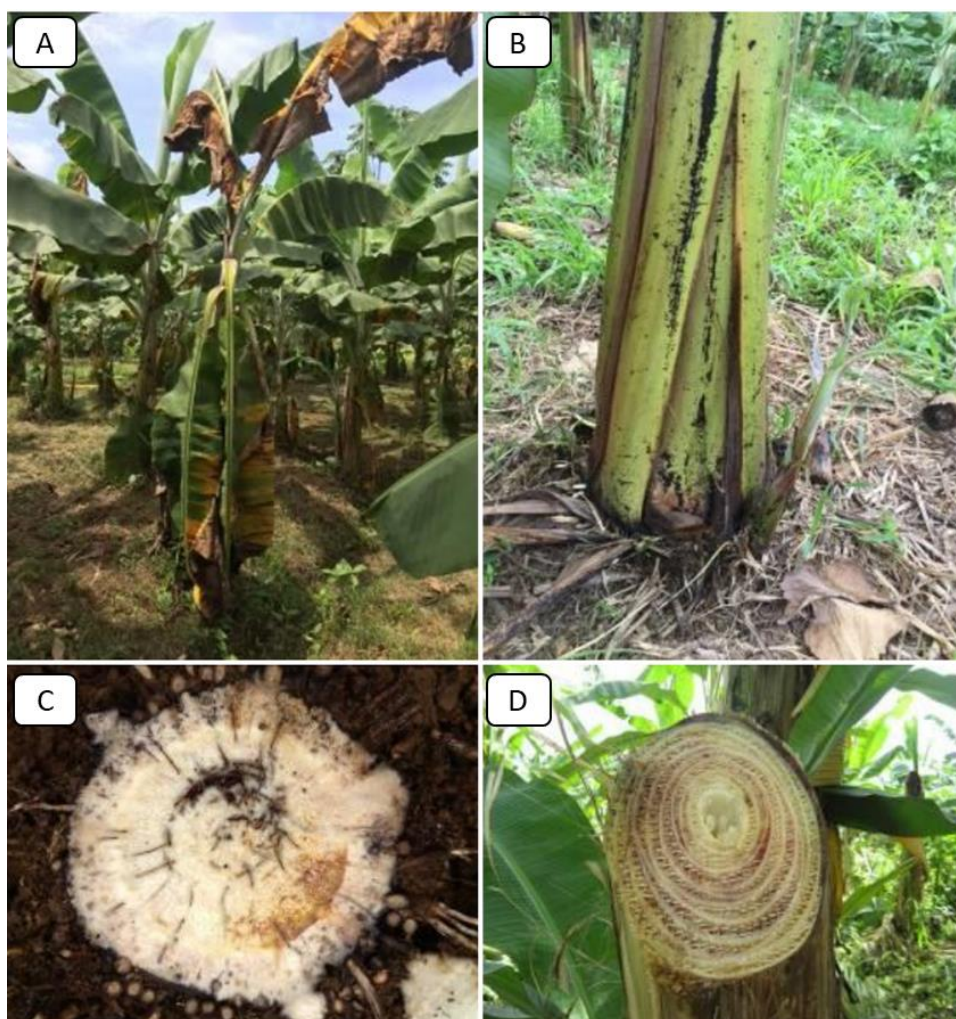
Síntomas

Los síntomas de Foc al banano se caracterizan por un amarillamiento uniforme a lo largo del margen foliar, continuando hacia la nervadura central en las hojas más antiguas, posteriormente las hojas quedan completamente marchitas y de color café. Se puede observar un agrietamiento de las vainas en la base del pseudotallo (Figura 1Figura 1). Foc produce macroconidios, microconidios y

clamidosporas como mecanismos de dispersión y reproducción (Figura 2). Las clamidosporas poseen paredes gruesas, son generalmente globosas, se forma en pares y en estados avanzados del hongo su producción es abundante sobre los tejidos infectados (Rojas Miranda, 2018; SADER & SENASICA, 2016).

Figura 1

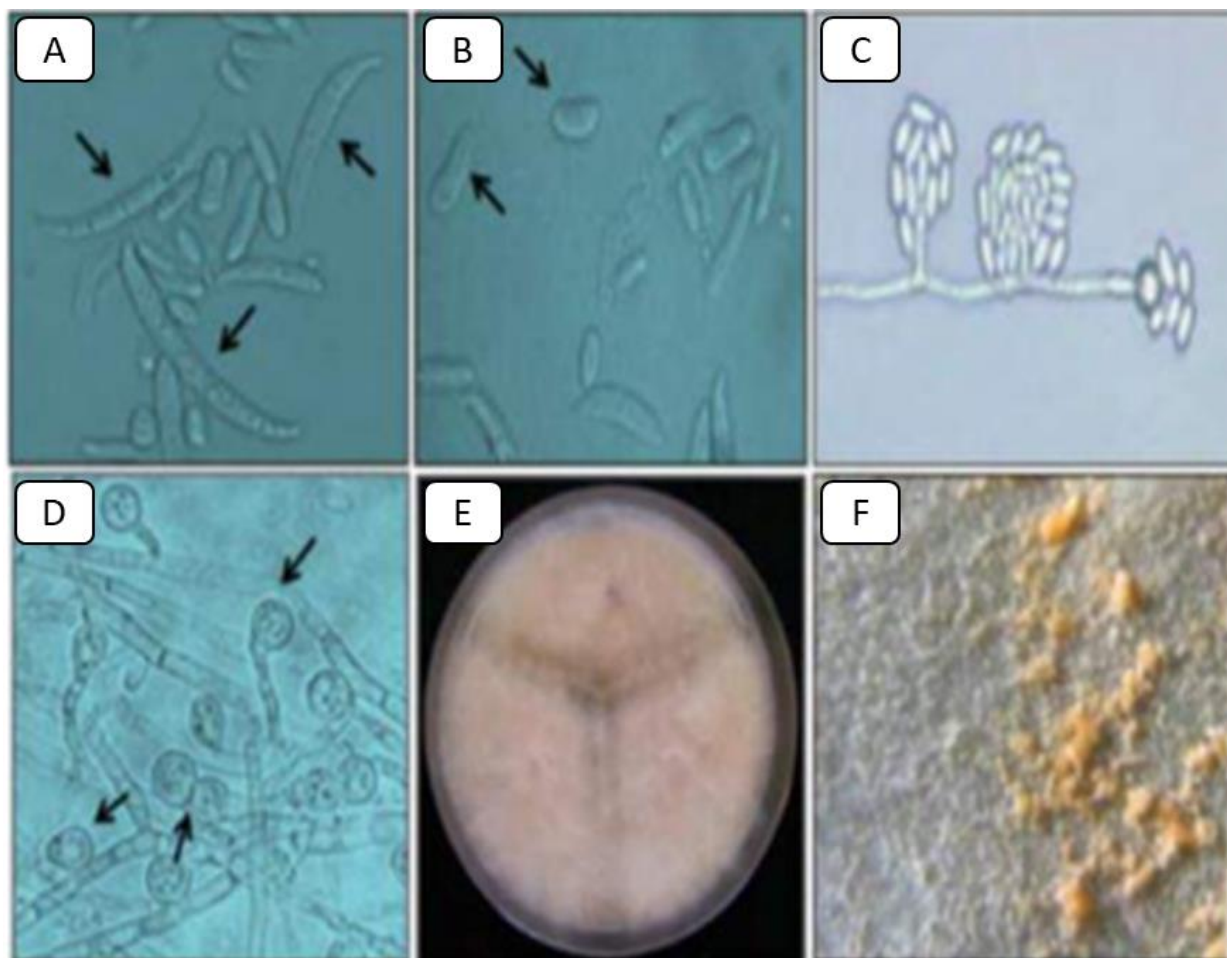
Planta de banano Gros Michel infectado con Foc R1.



Nota: banano Gros Michel infectado con *Foc R1*. (A) Hojas con marchitez (clorosis y necrosis foliar) y dobles de las hojas, (B) agrietamiento en la base del pseudotallo, (C) síntoma interno del cormo y (D) síntomas internos del pseudotallo. Obtenido de Rojas Miranda (2018).

Figura 2

Estructura microscópica de Foc.



Nota: (A) macroconidio, (B) microconidio, (C) fiálides y microconidios agrupados en falsas cabezas, (D) clamidosporas, (E) Foc TR4 en medio PDA, (F) coloración naranja de esporodocios desarrollados en PDA. Obtenido de SADER & SENASICA (2016).

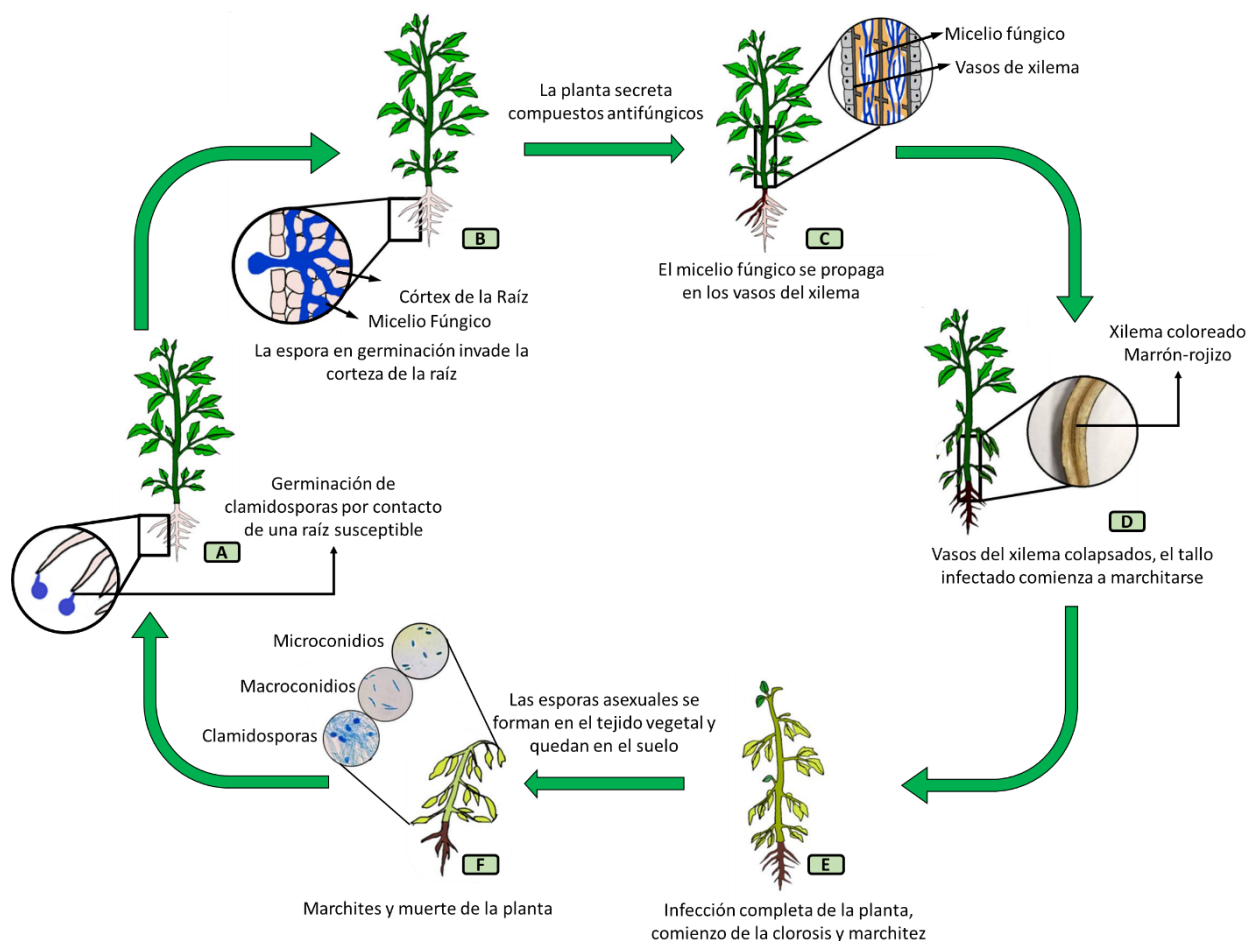
Ciclo de vida y desarrollo de Foc

La temperatura óptima de crecimiento y desarrollo de *Fusarium oxysporum* es de 25 a 28 °C, tiende a inhibir su crecimiento a temperaturas menores a 17 °C y mayores a 33 °C. Su pH óptimo es de 7,5 a 8,5 (SADER & SENASICA, 2016). Foc puede permanecer en residuos de bananos infectados en forma de clamidosporas, además, de adherirse a las llantas de los vehículos, zapatos, patas de animales,

insectos, implementos agrícolas, herramientas y aguas superficiales (Rojas Miranda, 2018). Las clamidosporas germinan al ser estimulada por secreciones radicales de plantas hospederas y no hospederas o por el contacto directo a tejido sano, este proceso llega a tardar de 2 a 3 días (SADER & SENASICA, 2016). Foc penetra la planta susceptible a través de las raíces de tercer orden o por exposición directa del cilindro central. Posteriormente, ingresa al sistema vascular del rizoma y pseudotallo e invade los vasos del xilema. El hongo producirá conidios los cuales son llevados a lo largo de los haces vasculares a nuevas zonas de infección, produciendo la obstrucción del movimiento del agua y los nutrientes. En estados avanzados Foc crece fuera del sistema vascular, en el parénquima adyacente, produciendo grandes cantidades de conidios y clamidósporas; esta última retorna al suelo cuando la planta muere y permanece en dormancia, puede durar varios años hasta que vuelva a germinar y se repita el ciclo (Rojas Miranda, 2018).

Figura 3

Marchitez por Fusarium oxysporum.



Nota: (A) La secreción de exudados producidos por la raíz de la planta susceptible provocan la germinación de las esporas y posterior desarrollo de hifas que penetran la epidermis de las puntas de las raíces. (B) La hifa se desarrolla intercelularmente en las células corticales de la raíz hasta ingresar al tejido y vasos del xilema y las células del parénquima. (C) Foc coloniza los vasos vasculares causando obstrucción y crecimiento micelial excesivo. (D) En etapas tempranas de la enfermedad se muestra síntomas en la base del tallo y un avance progresivo lento hacia arriba, generando el marchitamiento de las hojas jóvenes. (E) En una etapa avanzada se genera un amarilleo del margen foliar y clorosis completa en las hojas maduras. (F) finalmente la enfermedad resulta en marchitamiento y muerte de la planta huésped. Las esporas del

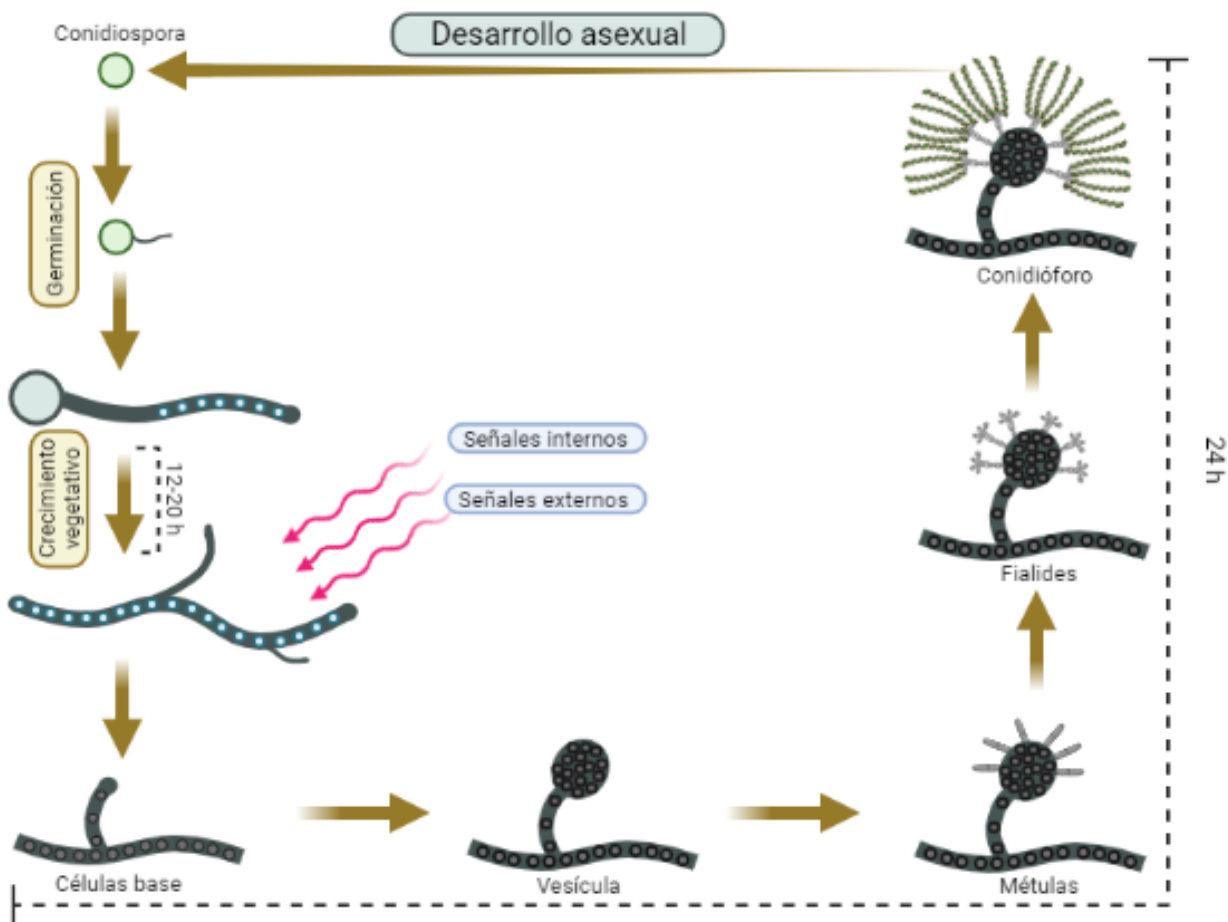
hongo (microcónidios, macroconidios y clamidosporas) se forman en el tejido vegetal muerto y permanecen en el suelo o se adhiere a un transporte hasta encontrar a una planta susceptible. Basado de Jangir et al., (2021).

Gen y Proteína Velvet

La familia de proteínas Velvet juega un papel importante en la coordinación y en los procesos de diferenciación de algunos metabolitos secundarios, como es el caso de la esporulación asexual o sexual, los esclerocios o la formación de cuerpo fructífero (Bayram & Braus, 2012). En el género *Fusarium* la proteína Velvet está altamente conservada, toma un papel importante en el crecimiento, desarrollo y patogénesis de los hongos, además, está involucrado en la regulación del desarrollo sexual y asexual, metabolismo secundario y virulencia del hongo (Ghag et al., 2014). Las proteínas Velvet tienen mayores estudios en *Aspergillus nidulans* donde se descubrió *Velvet A (VeA)*, miembro fundador de esta familia de proteínas. Las proteínas Velvet suelen interactuar con *LaeA*, el cual, es una proteína de dominio metiltransferasa que actúa como un regulador de metabolitos secundarios y el desarrollo del hongo. Cuando el gen *VeA* se silencia el hongo no podrá producir ningún cuerpo fructífero sexual ni asexual, además, no permite la producción de micotoxinas nocivas como fumonisina y fusarina, y disminuye la biosíntesis de carotenoides (Figura 4) (Bayram & Braus, 2012).

Figura 4

Desarrollo asexual y células fúngicas relacionados a la proteína Velvet.

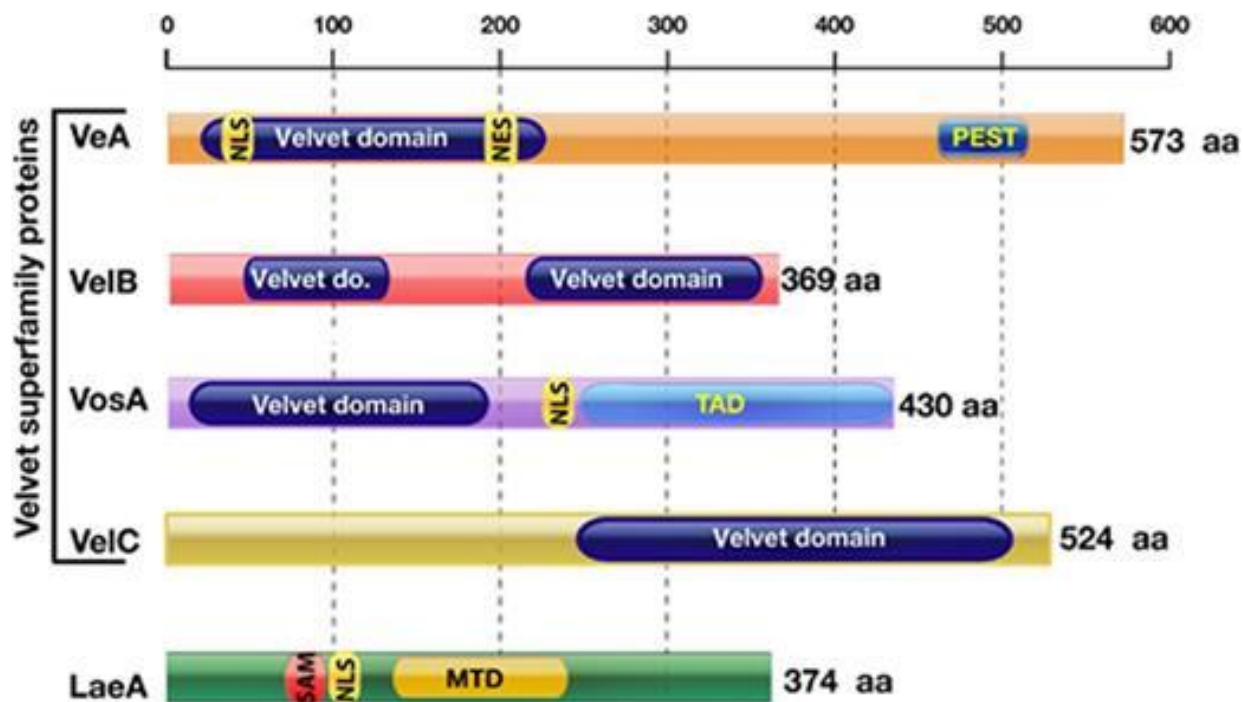


Nota: ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*, hongo modelo relacionados con la proteína Velvet. Demuestra el crecimiento filamentosamente vegetativo y desarrollo asexual del hongo. Basado de Bayram & Braus, (2012).

Existen cuatro miembros de la familia de proteínas Velvet (VeA, VeB, VosA y VeC) los cuales tienen un dominio común que se conserva en el reino fúngico. Este dominio comprende aproximadamente 150 aminoácidos (Figura 5), se pueden encontrar en forma de homodímeros o heterodímeros (VeA-VeB o VeB-VosA) (Bayram & Braus, 2012). En la Tabla 1 podemos observar la presencia de la familia de proteínas Velvet y LaeA en diferentes grupos de hongos.

Figura 5

Arquitectura del dominio de las proteínas de la familia Velvet y LaeA.



Nota: (SAM) sitio de unión a la d-adenosil metionina, (TAD) dominio de activación de transcripción, (PEST) secuencia rica en P:Prolina, E: ácido glutámico, S: serina, T: treonina. Obtenido de Bayram & Braus, (2012).

Tabla 1

Presencia y estudios de las proteínas de la familia Velvet y LaeA en el reino fúngico.

Grupos de hongos	Especie	VeA	VelB	VosA	VelC	LaeA
<i>Basidiomycota</i>	<i>Coprinopsis cinérea</i>	+	+	+	+	+
	<i>Laccaria bicolor</i>	+	+	+	+	No estudiado
<i>Cryptococcus neoformans</i>		+	+	+	-	No estudiado
	<i>Ustilago maydis</i>	+	+	+	-	No estudiado
<i>Ascomycota</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	+	+	+	+	+
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+	+	+
	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	+
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	+	+	+	+	+
	<i>Aspergillus oryzae</i>	+	+	+	+	No publicado
	<i>Neurospora crassa</i>	+	+	+	+	+
	<i>Sordaria macrospora</i>	+	+	+	+	No estudiado
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+	+	+	+
	<i>Acremonium chrysogenum</i>	+	+	+	+	+
	<i>Trichoderma reesei</i>	+	+	+	+	No estudiado
	<i>Fusarium verticillioides</i>	+	+	+	+	+
	<i>Fusarium fujikuroi</i>	+	+	+	+	+
	<i>Histoplasma capsulatum</i>	+	+	+	+	+
<i>Hemiascomycota</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	No estudiado
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	+	+	-	No estudiado
<i>Zygomycota</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	+	+	+	+	+
	<i>Mucor circinelloides</i>	+	+	+	+	No estudiado
	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	+	+	+	+	No estudiado
<i>Chytridiomycota</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	+	+	+	+	-
	<i>Spizellomyces punctatus</i>	+	+	+	-	No estudiado
	<i>Allomyces macrogynus</i>	+	+	+	-	No estudiado

Nota: (+) la proteína está presente en el grupo correspondiente; (-) la proteína no se encuentra en el grupo correspondiente. Obtenido de Bayram & Braus, (2012).

RNA de interferencia (RNAi)

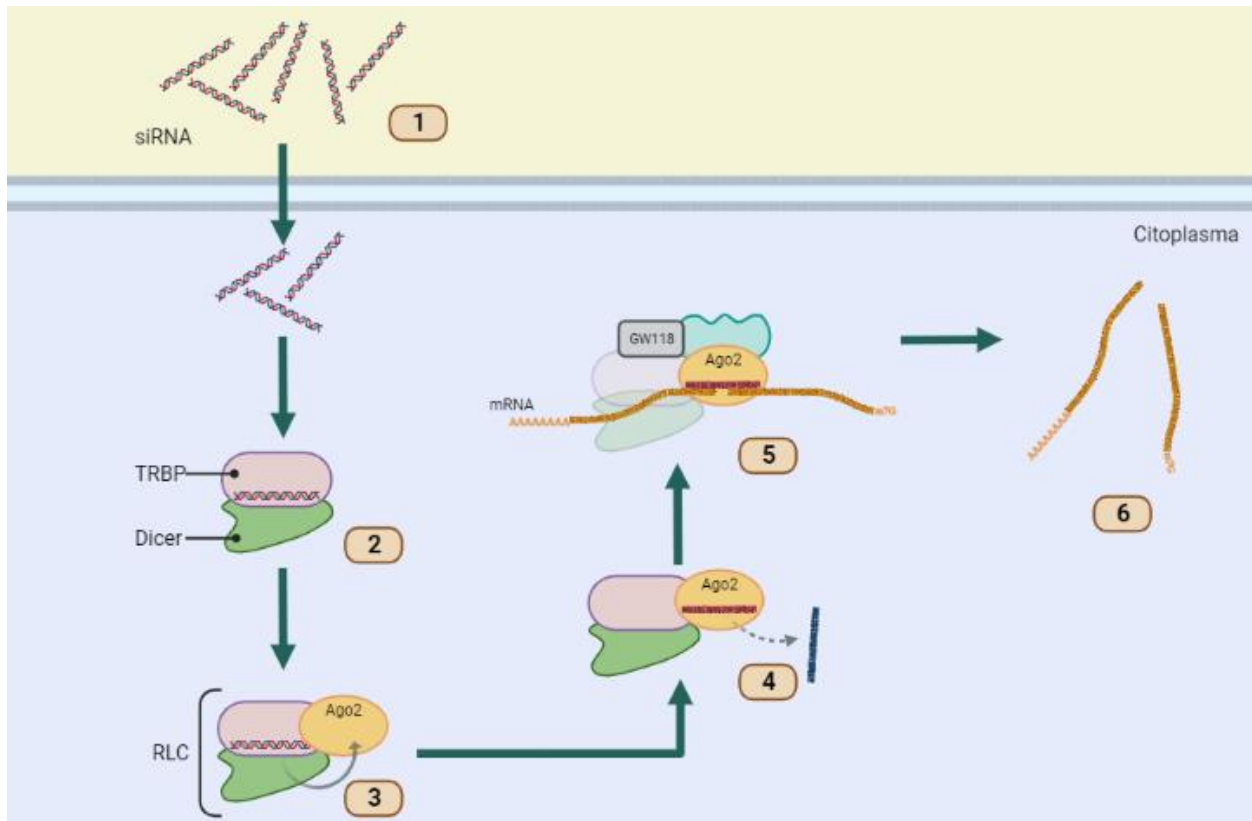
El RNAi es un mecanismo de silenciamiento genético que en las últimas décadas se ha convertido en la técnica preferencial para identificar funciones de genes, mejorar rasgos genéticos y contrarrestar patógenos (Jain et al., 2018). La vía de acción de la tecnología de RNAi regula la estabilidad y la traducción de mRNA (Setten et al., 2019). La tecnología RNAi es un mecanismo postranscripcional para la regulación de la expresión génica, en el cual se genera una interacción molecular entre un RNA mensajero (mRNA) y un segmento corto de RNA modificado no codificante (ncRNA) complementario, donde se da la escisión del mRNA mediante una proteína Argonaute (Ago) evitando así la traducción a proteína (Song et al., 2018).

Los principales RNA no codificante (ncRNA) que están involucrados en la regulación genética postranscripcional son los micro RNA (miRNA) y small RNA (siRNA). El siRNA es un tipo de ncRNA pequeño entre 21-25 nucleótidos formado a través de dsRNA externo, transgénicos o por secuencias tándem, que es recortado por una proteína Dicer, para que posteriormente forme el complejo siRISC que degrada mRNA complementario a siRNA (Chiu & Rana, 2003). Por otro lado, el miRNA es un tipo de ncRNA pequeño entre 21 y 23 nucleótidos obtenido de dsRNA propios del organismo, que es cortado por una proteína Dicer, para que posteriormente forme miRISC capaz de identificar un mRNA e inhibir su traducción (Tang, 2005). RISC es un complejo de silenciamiento de RNAi que se forma con una proteína Ago unida a una sola hebra de ncRNA, si se forma de miRNA se denomina miRISC, en cambio, si se forma de siRNA se conoce como siRISC (Jain et al., 2018).

El silenciamiento por RNAi ocurre en tres pasos principales, el primer paso implica el procesamiento de dsRNA largo en uno corto por una ribonucleasa III (Dicer), en el segundo paso se desenrolla y madura el dsRNA formando un ncRNA guía de cadena corta, en el tercer paso el ncRNA se une a una proteína Ago y forma el complejo RISC, para localizar hebras de mRNA complementario al ncRNA guía y finalmente generar su degradación (Winter et al., 2009).

Figura 6

Mecanismo del complejo de silenciamiento de RNAi (RISC).



Nota: (1) Los siRNA ingresan al citosol a través de endocitosis seguidos de eventos de escape endosomal. (2) el siRNA interactúa con la proteína Dicer y la proteína de respuesta de transactivación de RNA (TRBP). (3) se induce la formación del complejo de carga (RLC) con la proteína Ago 2. (4) se selecciona una cadena guía del siRNA para producir RISC maduro (5) la hebra guía de siRNA se complementa totalmente con un mRNA específico y lo silencia (6) la proteína Ago2 escinde eficientemente el mRNA objetivo. GW118 es una proteína de andamiaje que interactúa con la proteína Ago en RISC para mediar en el silenciamiento del mRNA. Basado de Setten et al., (2019).

Biología sintética

Biología sintética es un enfoque tecnológico capaz de diseñar, construir y modificar materiales genéticos, partes biológicas, dispositivos y sistemas biológicos para fines útiles combinando conceptos biológicos, científicos y de ingeniería (Clarke & Kitney, 2020; Shapira et al., 2017). Para poder desarrollar las tecnologías de biología sintética es necesario el uso de la ingeniería genética y herramientas de simulación *in silico*, convirtiéndose en un campo multidisciplinario que agrupa áreas competentes de matemática, informática y bioquímica (Villarraig, 2020). El crecimiento de la biología sintética se da por el rápido avance tecnológico y científico como la mejora de la síntesis y secuenciación de DNA, mejora en la lectura del DNA, modificación y reescritura de genes, mejora en las herramientas de ensamblaje, nuevas técnicas de edición genética y organizaciones que fomentan el uso de la biología sintética (ejemplo, el concurso internacional de biología sintética iGEM) (Shapira et al., 2017).

La biología sintética al igual que cualquier ingeniería sigue una estructura cíclica denominada DBTL, que incluye el diseño de una solución de un problema (design), la construcción física del sistema (build), el análisis de los datos experimentales (test) y el aprendizaje a través de herramientas que mejora el prototipo (Learn), este proceso se repite y mejora hasta conseguir los resultados deseados (Villarraig, 2020).

Circuito Biológico

Los circuitos biológicos o también conocidos como circuitos genéticos son sistemas de uno o más genes que interactúan entre sí para llevar a cabo una función deseada específica (Boada Acosta, 2018). Los circuitos están compuestos por tres elementos genéticos principales. El primer elemento son los genes reguladores los cuales sintetizan una proteína con la capacidad de reconocer la secuencia del operador y funciona como señal para que el operador continúe o finalice la síntesis. El segundo elemento son los genes operadores, los cuales son reconocidos por la proteína reguladora, siendo un elemento de control antes de la expresión deseada. Finalmente, el tercer elemento son los genes

estructurales los cuales son los que se desean expresar (Villarraig, 2020). Los circuitos genéticos son construcciones a partir de dispositivos estándar o unidades transcripcionales, y estos son conformados por biopartes o piezas modulares de DNA con una función específica (Boada Acosta, 2018). En la Figura 8 y Tabla 2 se resume las partes del circuito biológico de Agrobactory 593.

La unidad transcripcional está formada por cuatro partes básicas; el promotor, el RBS, el CDS y el terminador. El promotor es el segmento de DNA que controla el inicio del proceso de transcripción del DNA deseado a mRNA, los promotores pueden ser constitutivos, es decir, que siempre genera mRNA o regulado el cual permite ser activado o reprimido. El sitio de unión al ribosoma (RBS) es la secuencia que se encuentra en el mRNA donde los ribosomas se unen para iniciar la traducción. La secuencia codificante (CDS) es un segmento de DNA que se transcribe a mRNA y posteriormente se traduce a proteína gracias al RBS. El terminador es la secuencia final que detiene la transcripción del CDS (Boada Acosta, 2018).

Tabla 2

Componentes del circuito biológico de Agrobactory 593.

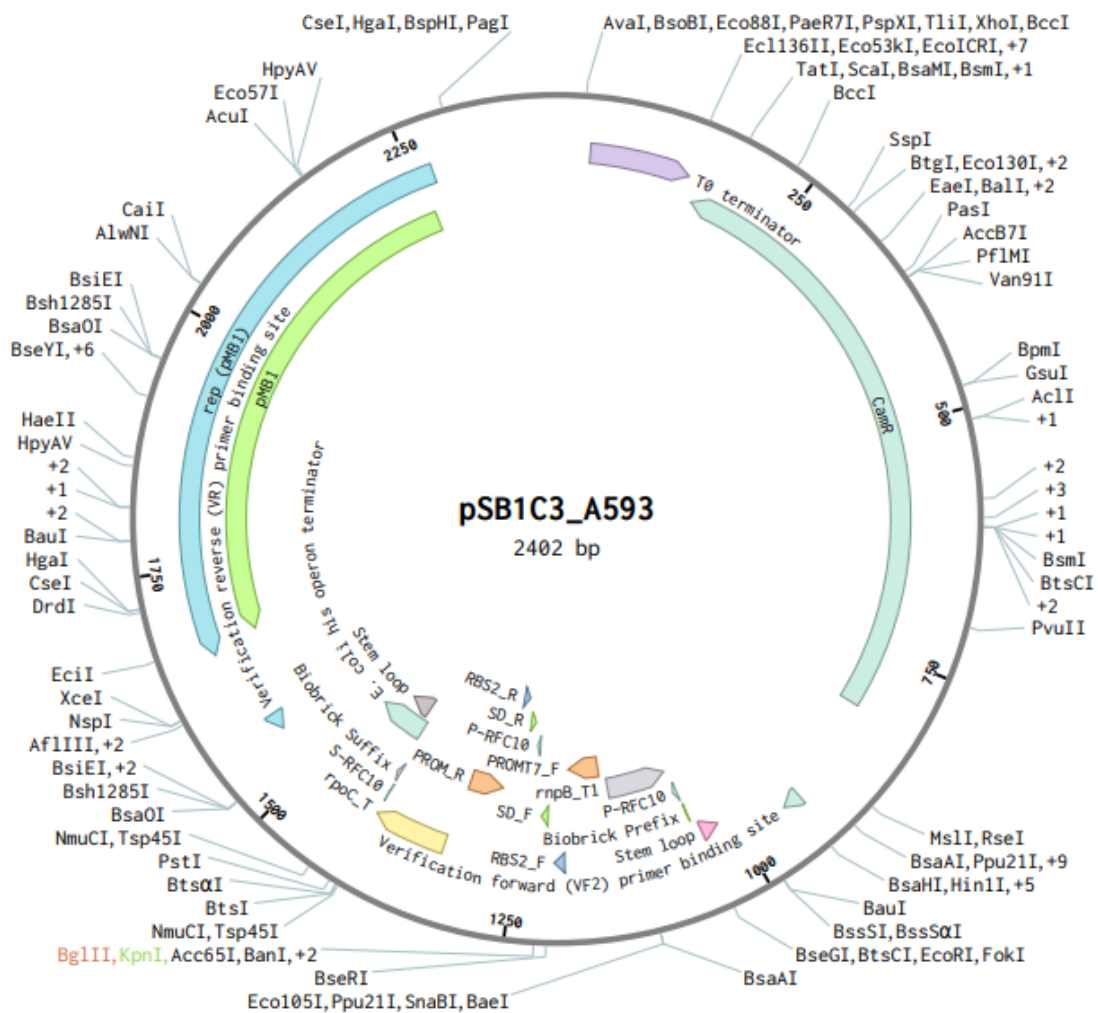
Partes/módulos	Colección Agrobactory 593	Descripción	Base de datos iGEM
Chasis	<i>E. coli</i> One Shot TOP 10, y HT115 (DE3).	One Shot TOP10: se utilizan para la generación de bibliotecas genéticas y clonación de vectores. HT115: se utiliza para la alta expresión de genes de vectores downstream de promotor T7.	
Backbone	pSB1C3_A593	Plásmido pSB1C3 con partes diseñadas por Agrobactory 593.	pSB1C3 iGEM/Part
Promotor	Promoter T7	El promotor T7 es el sitio específico para la RNA polimerasa T7.	BBa_I712074
RBS	RBS2	RBS basado en el represor elowitz.	BBa_B0034
SD	Shine-Dalgarno for <i>E. coli</i>	Secuencia corta de 9 pb que facilita la interacción del ribosoma con el mRNA.	BBa_K3893000
CDS	dsRNA destinado al gen <i>Velvet</i>	dsRNA destinado a silenciar el gen diana <i>Velvet</i> a través de RNAi.	BBa_K3893001
CDS	dsRNA destinado al gen ERG11	dsRNA destinado a silenciar el gen diana ERG11 a través de RNAi.	BBa_K3893002
Terminador	rpoC rnpB_T1	Unión de dos terminadores transcripcionales (rpoC rnpB_T1) para evitar RNA inespecíficos formados por la polimerasa T7.	BBa_K3893006 BBa_K3893007
Sitios de restricción	Bgl II Kpn I	Sitios de corte cohesivo para la unión del CDS. Bgl II (5`AGATCT 3`) & Kpn I (5`GGTACC3`)	
Primers	Forward Reverse	Primers enfocados a identificar la unión de CDS al backbone.	BBa_G00100 BBa_G00101

Nota: basado de iGEM Ecuador, (2021).

Figura 7

Plásmido *pSB1C3_A593*.

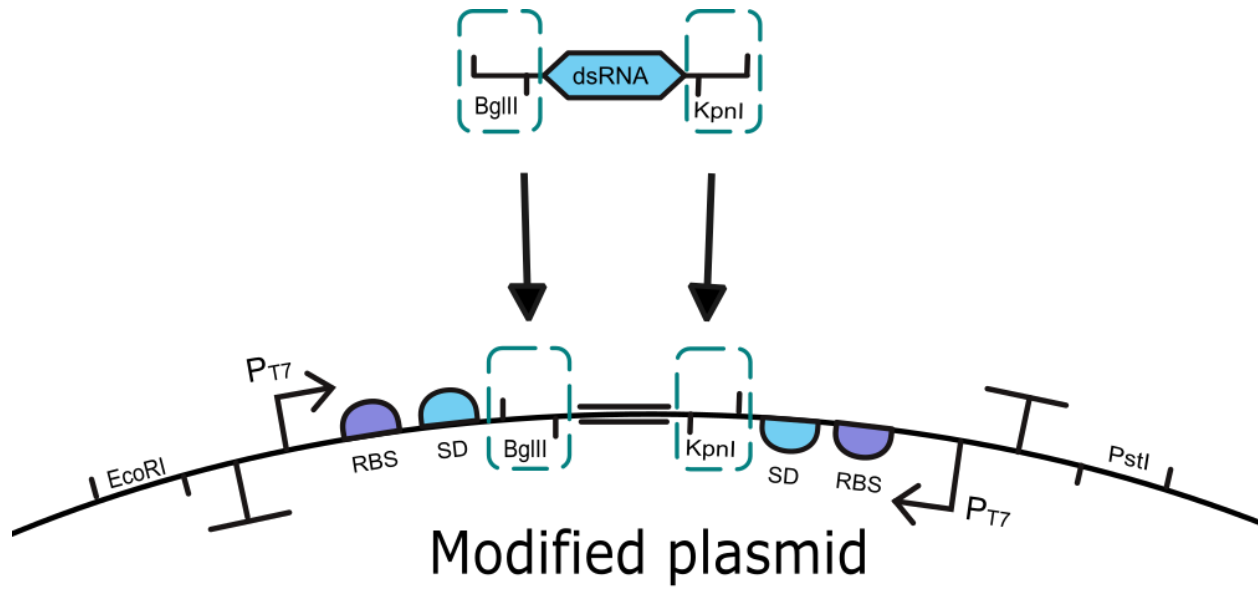
Basado de Setten et al., (2019)



Nota: Plásmido pSB1C3 ensamblado con la columna vertebral del plásmido con inserto para sdRNA de Agrobactory 593.

Figura 8

Columna vertebral del plásmido con inserto para sdRNA de Agrobactory 593.

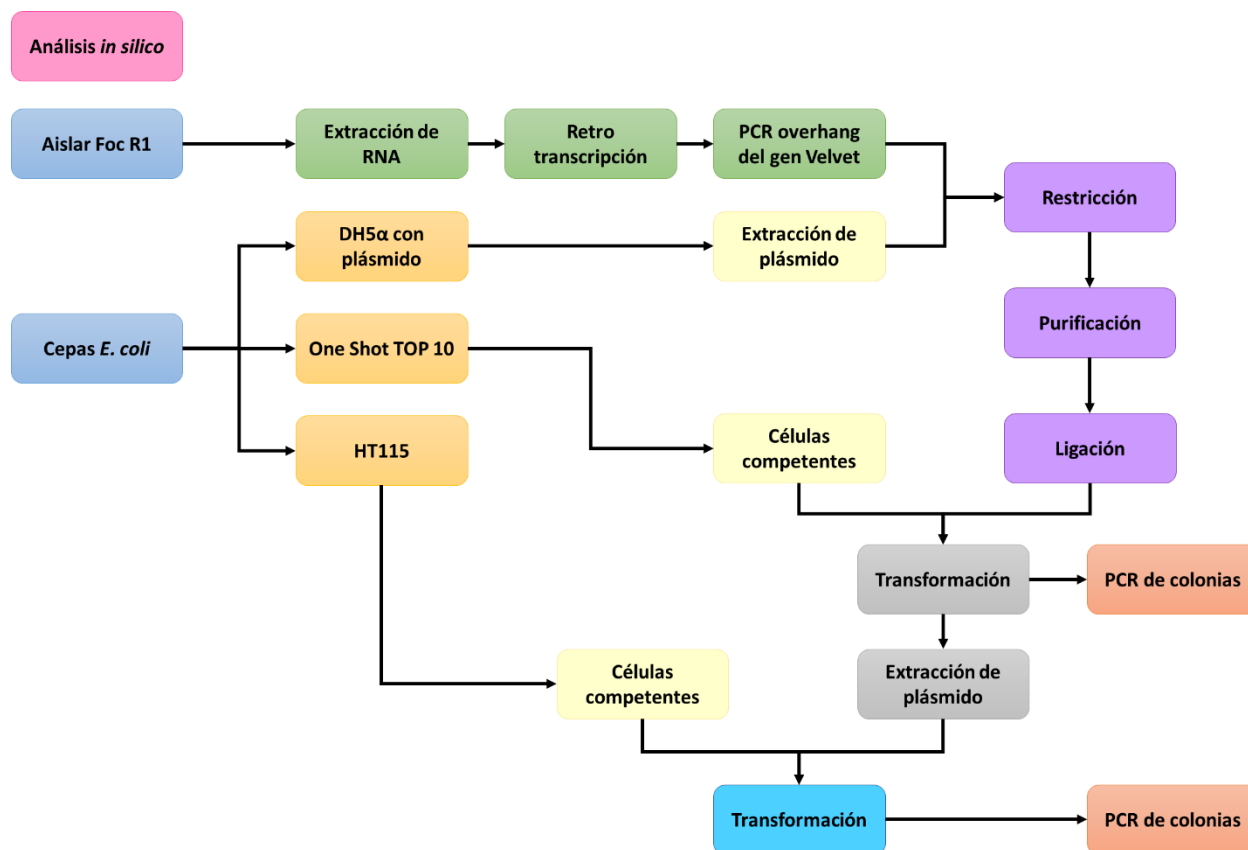


Nota: obtenido de iGEM Ecuador, (2021).

Capítulo III: Materiales y Métodos

Figura 9

Diagrama de flujo de trabajo.



Zona de estudio

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de investigación de microbiología en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE ubicado en la Av. Gral. Rumiñahui S/N en Sangolquí-Ecuador y en el laboratorio de diagnóstico molecular IDgen ubicado en la Av. Gral. Eloy Alfaro E14 & Av. de los Granados en Quito-Ecuador.

Análisis *in silico*

Para generar el estudio se realizó un análisis *in silico* donde se usó el programa en línea www.benchling.com para generar y ver la composición del plásmido, gen *Velvet*, PCR overhang, primers,

electroforesis, y restricción y ligación de la secuencia con el plásmido. Este proceso fue facilitado por el equipo de iGEM Ecuador y el proyecto Agrobactory 593.

Diseño experimental

En el presente proyecto se realizó la transformación de *Escherichia coli* HT115 con el plásmido que posee el gen diana *Velvet*. El diseño experimental determinará si existe diferencia significativa en la eficiencia de transformación promedio si se varía el tiempo de shock térmico ($t_1=30$ segundos, $t_2=45$ segundos, $t_3= 60$ segundos) en el proceso de transformación. Se realizó un diseño experimental al azar de las muestras. La eficiencia de transformación se calcula a con las siguientes ecuaciones:

$$Eficiencia\ de\ Transformación = \frac{\#UFC}{DNA\ sembrado\ en\ la\ caja\ (\mu g)}$$

$$DNA\ sembrado\ en\ la\ caja\ (\mu g) = \frac{Volumen\ sembrado\ (\mu L) * DNA\ plasmídico\ (\mu g)}{Volumen\ de\ transformación\ (\mu L)}$$

Los resultados obtenidos se analizaron del promedio de 6 repeticiones por cada tratamiento t ($n=6$), después de 48 horas de incubación a 37 °C. Se realizó un ANOVA y el test de Tukey para identificar diferencia significativa en los tratamientos.

Cepas de *Escherichia coli* y Foc R1

Las cepas de *Escherichia coli* One Shot TOP10 y HT115 usadas para la transformación con el ensamblaje deseado, La cepa de *Escherichia coli* DH5 α que posee el plásmido pSB1C3_A593+EGR11 y Foc R1 usado para la extracción de RNA se obtuvieron del cepario de iGEM ubicado en el laboratorio de diagnóstico molecular IDgen.

Medios de cultivo

El medio caldo Luria Bertani (LB) fue dispensado en tubos de ensayo con tapa rosca de 10 a 25 mL y matraces de 50 mL, 100 mL y 250 mL cubiertos con tapones de gasa con algodón, los cuales, permiten la entrada y salida de oxígeno para las diferentes cepas de *Escherichia coli*. Se dispensó caldo LB con cloranfenicol (LB+Clor) en tubos de ensayo con tapa rosca de 10 y 25 mL, y matraces de 50 mL,

100 mL y 250 mL cubiertos con tapones de gasa con algodón, los cuales, permiten la entrada y salida de oxígeno para las cepas de *Escherichia coli* transformadas con el plásmido ensamblado con el gen *Velvet*. Se preparó agar LB+Clor y se dispensó en cajas Petri con el fin de aislar colonias y analizar la eficiencia de transformación de las cepas de *Escherichia coli* con el plásmido deseado. Adicionalmente se preparó agar papa dextrosa que contenía cloranfenicol y ampicilina (PDA+Clor+Amp) en cajas Petri y caldo papa dextrosa (PDB) en tubos de ensayo con tapa rosca para aislar Foc R1.

Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total de Foc R1 se usó el protocolo estándar de E.Z.N.A.[®] Fungal RNA Mini Kit de Omega Bio-Tek. Para la extracción se usó 100 mg de tejido fúngico fresco de Foc R1. La solución resultante (8 ng/mL) se retrotranscribió de inmediato y posteriormente se almacenó a -80 °C.

Retrotranscripción del RNA total

Para la formación de cDNA se usó el kit GoScript™ Reverse Transcriptase System A500 de Promega. Para la activación de la retrotranscriptasa se incubó la mezcla a 25 °C durante 5 minutos, para la extensión se incubó a 42 °C por 60 minutos y para la inactivación de la retrotranscripción se incubó a 70 °C durante 15 minutos. La solución resultante (863,3 ng/μL) se almacenó a -20 °C hasta su uso.

PCR overhang

Para la PCR overhang se realizó en un tubo de microcentrífuga de 0,2 mL la mezcla de 25 μL de DreamTaq Green PCR Máster Mix (2X) de Thermo Fisher Scientific, 1 μL de primer forward dsRNA_Velvet_F_2 (1 μM), 1 μL de primer reverse dsRNA_Velvet_R_2 (1 μM), 1 μL cDNA (863,3 ng/μL) y 22 μL de agua libre de nucleasas. Posteriormente se llevó al termociclador con la siguiente configuración; 95 °C durante 3 minutos de desnaturalización inicial, 95 °C por 30 segundos de desnaturalización, 56 °C por 30 segundos de annealing, 72 °C por 1 minuto de extensión y 72 °C por 10 minutos de extensión final, durante 35 ciclos. Al terminar el proceso, el amplicón se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Los primers utilizados para la PCR overhang se muestra a continuación:

- Primer forward (dsRNA_Velvet_F_2): 5`AAAAGATCTGCAGCCTCTGGTATCAGA3`
- Primer reverse (dsRNA_Velvet_R_2): 5`AAAGGTACCACTCTCCATCAATCCAGGA3`

Los nucleótidos en negrilla son la secuencia que identifican los primers, el resto son los nucleótidos agregados por la PCR overhang.

Extracción de plásmido

La extracción de plásmido se realizó con dos métodos distintos en las cepas de *E. coli* DH5 α con el plásmido pSB1C3_A593+EGR11 y en las cepas One Shot TOP10 y HT115 transformadas con el plásmido ensamblado con el gen *Velvet*. A continuación, se describen las técnicas usadas.

Kit de extracción de plásmido

La extracción se realizó con el kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep #K210010 de Thermo Fisher Scientific. Para la extracción de plásmido se utilizó 1,5 mL de medio LB con la cepa de *E. coli* que posee el plásmido deseado, el medio fue previamente incubado a 37 °C por al menos 24 horas. Las soluciones resultantes se llevaron a -20 °C hasta su uso.

Método de lisis alcalina para extracción de plásmido

Este método necesita tres soluciones distintas. La solución I es usada para la suspensión de las bacterias, está formada por glucosa 50 mM, Tris-Cl (pH 8,0) 25 mM y EDTA (pH 8,0) 10 mM. La solución II es usada para generar la lisis celular, está formada por NaOH 0,2 N y SDS 1% (w/v). Finalmente, la solución III es usada para neutralizar la lisis celular, está formada por acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial 1% (v/v).

Para la extracción de plásmido se incubó durante 24 horas a 37 °C matraces con medio LB+Clor que contenían la cepa de *E. coli* con el plásmido deseado. Pasado este tiempo se colocó 1,5 mL de cultivo bacteriano en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, se centrifugó a 2600xg durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante sin perturbar el pellet. Se agregó al tubo de microcentrífuga con el pellet

250 μL de la solución I, se homogenizó con un agitador tipo vortex y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 250 μL de la solución II, se homogenizó por inversión 5 veces y se incubó durante 3 minutos a -20°C para producir la lisis celular suficiente que permitir la salida del plásmido. Inmediatamente se añadió 300 μL de la solución III, se homogenizó por inversión 7 veces y se incubó por 10 minutos a -20°C para neutralizar la lisis celular. A continuación, se centrifugó a 9500xg durante 15 minutos para precipitar el DNA genómico y las células bacterianas. Se transfirió 400 μL de sobrenadante a un nuevo tubo y se agregó 800 μL de alcohol absoluto, se homogenizó por inversión 5 veces y se incubó por 20 minutos a -20°C . Después de este tiempo, se centrifugó a 9600xg durante 10 minutos para posteriormente descartar el sobrenadante y agregar 1 mL de etanol al 70%, se mezcló por inversión 10 veces y se centrifugó a 9600xg durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar durante 15 minutos en cámara de flujo laminar, pasado este tiempo se agregó 10 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL de RNAsa, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. La solución resultante se almacenó a -20°C hasta su uso.

Ensamblaje restricción-ligación

El ensamblaje restricción-ligación usada consta de tres pasos, en el primer paso se realizó la digestión para generar los extremos cohesivos con las enzimas de restricción KpnI y BglII, en el segundo paso se purificó el segmento digestado y en el tercer paso se ensambló el plásmido con el gen *Velvet*.

Restricción

Para el proceso de restricción se usó el kit FastDigest™ Value Pack #K1991 de Thermo Fisher Scientific. Se realizó una mezcla con 2 μL del buffer 10X FastDigest™, 10 μL del amplicón del gen *Velvet* (168 ng/mL) o 2 μL de plásmido pSB1C3_A593+ERG11 (0,2 μg), 1 μL de la enzima FastDigest™ KpnI y 1 μL de la enzima FastDigest™ BglII. Para la digestión del inserto se aforó a 30 μL con agua libre de nucleasas y para la digestión del plásmido se aforó a 20 μL con agua libre de nucleasas. Se agitó suavemente y se

incubó a 37 °C por 4 horas. Finalmente se inactivó las enzimas a 80 °C por 5 minutos. Las soluciones resultantes fueron purificadas.

Purificación

Para el proceso de purificación se usó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, este permite purificar secuencia de DNA del gel de electroforesis o PCR para el uso posterior de las secuencias deseadas. Para purificar el plásmido se realizó una electroforesis (95 voltios por 35 minutos) del plásmido digerido, posteriormente se identificó y separó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL el segmento del gel de agarosa que contenía la secuencia de DNA de 2386 pb, finalmente se usó el protocolo de purificación en gel del kit. Para la purificación del amplicón del gen *Velvet* digerido (540 pb) se usó el protocolo de purificación de PCR. Las soluciones obtenidas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Ligación

Para el proceso de ligación se usó el kit T4 DNA Ligase, 1 U/μL #EL0014 de Thermo Fisher Scientific. Como proceso de preparación se midió las concentraciones del inserto y del vector en un espectrofotómetro (NanoDrop). Después se calculó la relación molar del vector (10,6 ng/μL) con respecto al inserto *Velvet* (25,1 ng/μL) de 1:25 mediante la calculadora virtual NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) obteniendo la relación de 10,6 ng de vector y 60,9 ng de inserto. Una vez obtenidos los datos, se realizó una mezcla de 4 μL del buffer 5x Ligase Reaction, 2,4 μL del inserto (25,1 ng/μL), 1 μL de vector (10,6 ng/μL), 11,6 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL de T4 DNA Ligase 1 U. finalmente se incubó a 22 °C por 80 min. El ensamblaje final se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Células competentes

Para la formación de células competentes de las cepas One Shot TOP10 y HT115 de *Escherichia coli* se realizó todo el procedimiento en gradilla fría, se preenfrió tubos de microcentrifuga de 1,5 mL y mantener un OD(600nm) de 0,3 en los medios LB con las cepas.

Se agregó 1,5 mL de medio con la cepa deseada a los tubos de microcentrifuga de 1,5 mL y se centrifugó a 13000xg por 30 segundos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 mL de solución CCMB80 (10 mM de acetato de potasio, 80 mM de CaCl₂.2H₂O, 20 mM de MnCl₂.4H₂O, 10 mM de MgCl₂.6H₂O y 10% v/v de glicerol), se incubó a -20 °C por 10 minutos. Al terminar, se centrifugó a 13000xg por 30 segundos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 200 µL de solución CCMB80. La solución final se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Transformación de células competentes

Para el proceso de transformación se mezcló 50 µL de células competentes y 2 µL de plásmido ligado con el gen *Velvet* en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL y se incubó a -20 °C por 30 minutos. Posteriormente se generó un shock térmico a 42 °C por 30, 45 o 60 segundos, al finalizar de inmediato se incubó a -20 °C por 5 minutos. Al terminar, se agregó 950 µL de medio SOC (50g/L de Triptona, 5g/L de Extracto de levadura, 0,5 g/L de NaCl, 250 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 3,603 g/L de glucosa) y se incubó a 37 °C por 90 minutos, mientras se agitaba a 300 rpm. A continuación, se centrifugó a 6800xg por 3 minutos, se descartó 900 µL del sobrenadante sin perturbar el pellet y se resuspendió el pellet con el medio restante (100 µL). Finalmente, se traspasó los 100 µL de la mezcla obtenida en una caja Petri con agar LB+Clor y se incubó por 48 horas a 37 °C.

PCR de colonias

Para realizar la PCR de colonias se mezcló 6,25 µL de GoTaq Hot Start Green Master Mix de Promega, 0,5 µL del primer forward BBa_G00100 (1µM), 0,5 µL del primer reverse BBa_G00101 (1µM) y 5,25 µL de agua libre de nucleasas en un tubo de microcentrifuga de 0,2 mL. Posteriormente se insertó

una minúscula muestra de la colonia obtenida con la punta de una micropipeta y se llevó al termociclador con la siguiente configuración: 94 °C por 3 min de desnaturalización inicial, 94 °C por 30 segundos de desnaturalización, 55 °C por 30 segundos de annealing, 72 °C por 1 minuto de extensión y 72 °C por 5 minutos de extensión final, durante 35 ciclos. Al terminar el proceso se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el producto de la PCR.

Los primers utilizados para la PCR de colonias son:

- Primer forward (BBa_G00100): 5`TGCCACCTGACGTCTAAGAA3`
- Primer reverse (BBa_G00101): 5`ATTACCGCCTTTGAGTGAGC3`

Capítulo IV: Resultados

Diseño *in silico*

El diseño *in silico* de la PCR overhang del gen *Velvet* se muestra a continuación:

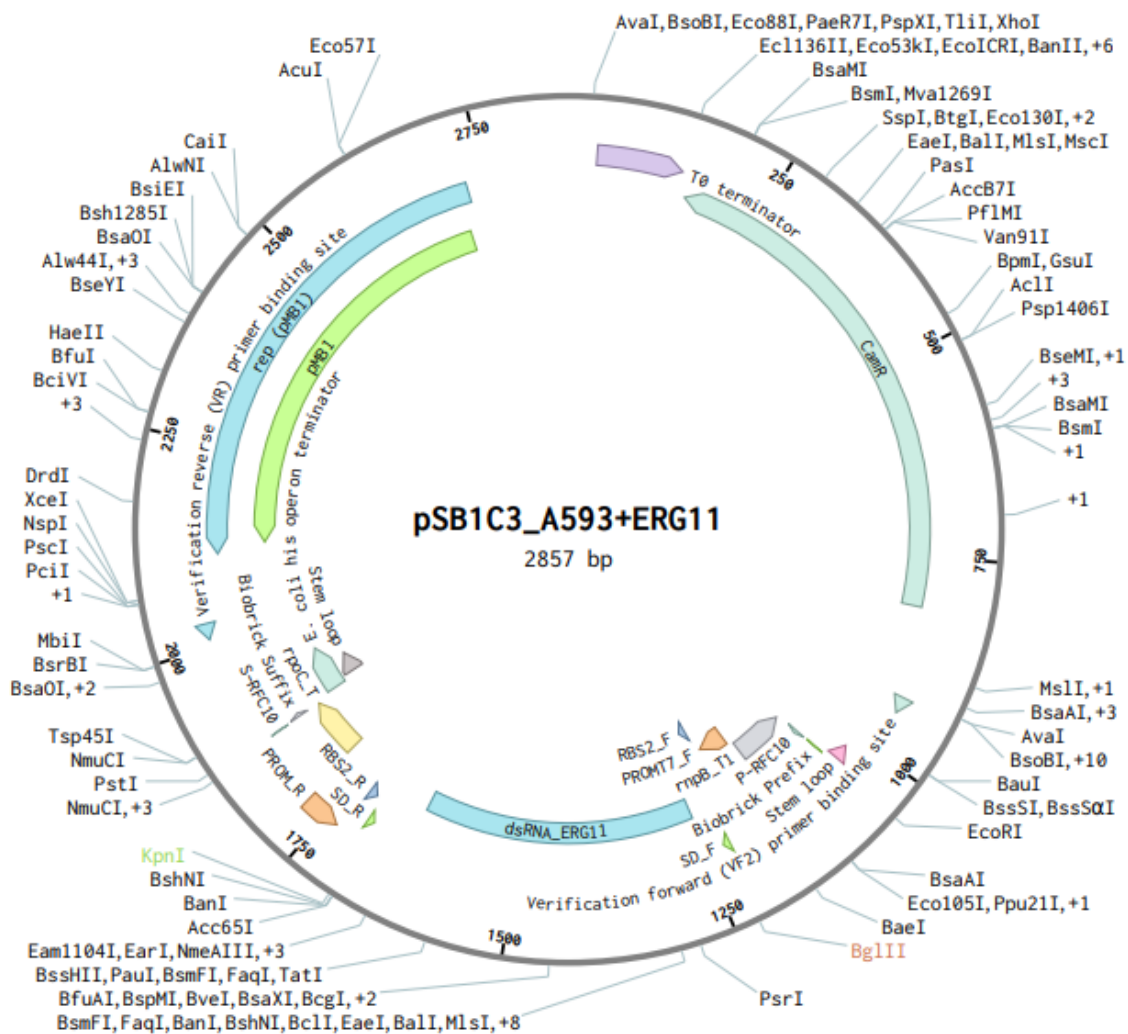
5`AAAAGATCTGCAGCCTCTGGTATCAGATGACTGTTCTGCAGCAACCTGAGCGTGCCCGAGCCTGCGGT
TCTGGTTCAAAGCCAACAGTGACCGCCGACCTGTTGATCCTCCCCAGTTGTCGAGCTTCGGATTATCGAGGGAC
CTAGTGTGGAAGAGGGCAAGGACATCACTTTTGACTACAACGCCAACTTCTTTCTCTACGCCAGTCTCGAGCATGC
CCGTCCACTTGACGCGGTGCGTGTAAATACTCCAGCTGCTGGCAACCCACCCATTCTGACTGGTGTTCGCTTCGG
GCATGGCCTATCTCGACCGTCCCACCGAAGCTGGTTATTCATCTTTCCCGACCTTTCTGTCCGCCACGAGGGCCTC
TACATACTGACCTTCAGTTTGTGGAGACTACCAAGGAGGAAAGAGACTATGATCTGGAACCTGCCGATGGCGATC
TTCCACCCGGAGTCGACTATAGAATGGAAATCAAGACTGAACCTTTCAGCGTCTACAGCGCTAAGAAGTTTCCTGG
ATTGATGGAGAGTGGTACCTTT3`

Los nucleótidos subrayados son los extremos que agregan los primers usados en la PCR y los nucleótidos en negrilla son aquellos identificados por los primers. La PCR overhang permitió agregar los sitios de restricción BglII (5` AGATCT 3`) y KpnI (5` GGTACC 3`).

El plásmido pSB1C3_A593+ERG11 (Figura 10) posee la columna vertebral para agregar dsRNA diseñado por Agrobactory 359 (Figura 8), el cual permite ensamblar a través de técnicas de restricción-ligación el amplicón del gen *Velvet*, eliminando los nucleótidos del gen ERG11 (Figura 11). En la Tabla 3 se resume los datos obtenidos de manera *in silico*.

Figura 10

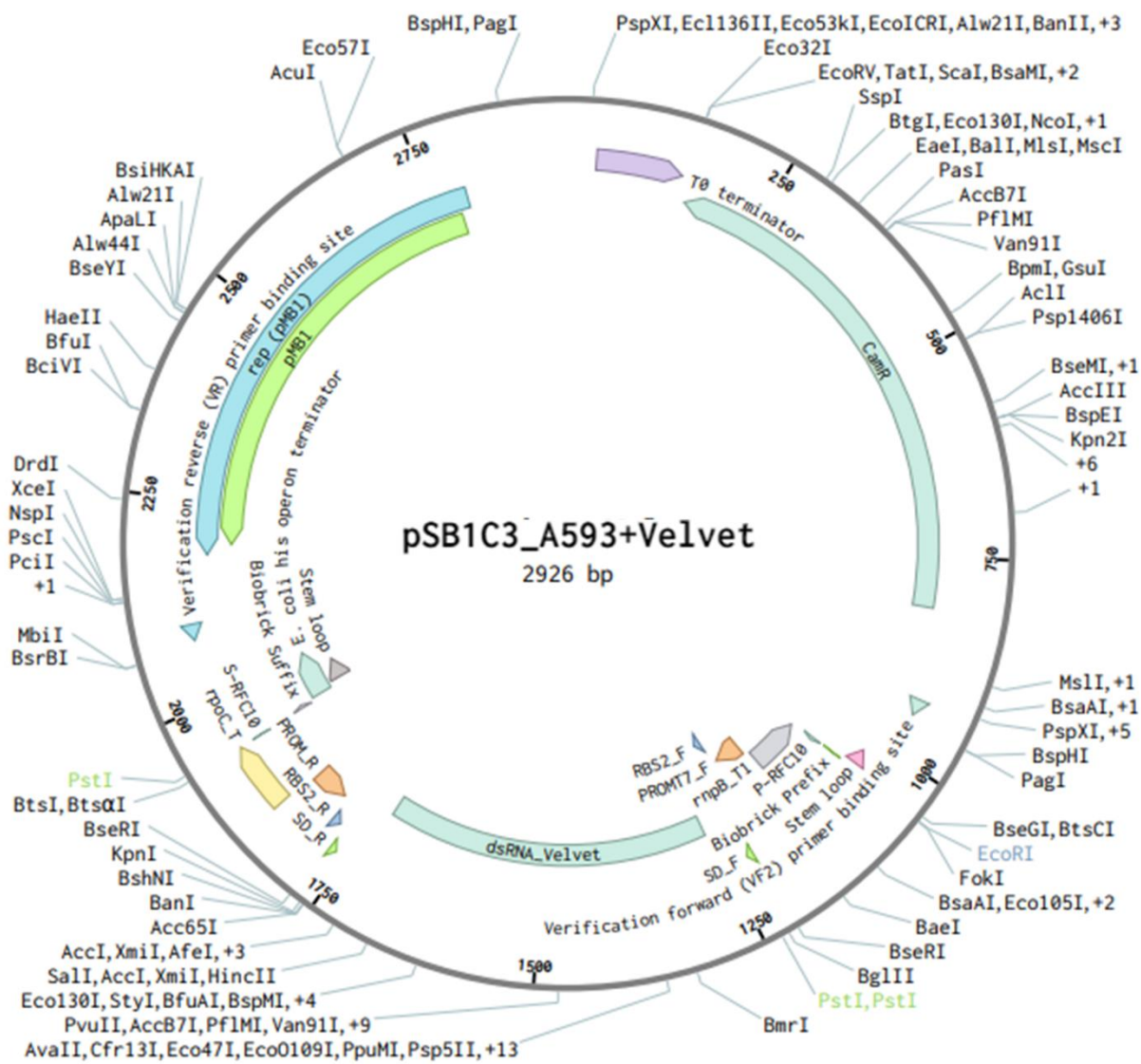
Plásmido pSB1C3_A593+ERG11.



Nota: Plásmido pSB1C3_A593 ensamblado con el gen ERG11.

Figura 11

Plásmido pSB1C3_A593+Velvet.



Nota: Plásmido pSB1C3_A593 ensamblado con el gen *Velvet*.

Tabla 3

Datos de las secuencias obtenido in silico.

Secuencias	Pb
pSB1C3	2070
pSB1C3_A593	2402
pSB1C3_A593+ERG11	2857
pSB1C3_A593+Velvet	2926
pSB1C3_A593 digerado con KpnI y BglII	2386
Gen <i>Velvet</i>	1221
Amplicón del gen <i>Velvet</i>	548
Amplicón del gen <i>Velvet</i> digerado con KpnI y BglII	540

Foc R1, extracción de mRNA y retrotranscripción

Se sembró cuatro muestras de Foc R1 en cajas Petri con medio PDA+Clor+Amp y cuatro muestras de Foc R1 en tubos de ensayo con medio PDB. Al medio PDA fue agregado cloranfenicol y ampicilina para evitar crecimiento bacteriano y la siembra en medio PDB fue una alternativa para la obtención de Foc R1 (Figura 12). Una vez crecido el hongo se extrajo el RNA total obteniendo una concentración de 8 ng/ μ L, de inmediato se realizó la retrotranscripción del mRNA extraído obteniendo cDNA con una concentración de 863,3 ng/ μ L. En la Tabla 4 se resume los resultados de crecimiento de Foc R1, extracción de RNA total y retrotranscripción.

Figura 12

Foc R1 usado para la extracción de RNA total.



Tabla 4

Resultados del crecimiento de Foc R1, extracción de mRNA total y retrotranscripción.

Proceso	Muestra	Replicas	Resultados	Observaciones
Siembra en PDB	Foc R1	4	Crecimiento del hongo	1 contaminación
Siembra en PDA+Clor+Amp	Foc R1	4	Crecimiento del hongo	Sin contaminación
Extracción de mRNA	Foc R1 en PDA	1	8 ng/ μ L	A260/230 = 1,86 A260/280 = 1,64
Retrotranscripción	RNA total	1	863,3 ng/ μ L	A260/230 = 1,96 A260/280 = 1,62

Extracción de plásmido pSB1C3_A593+ERG11 y PCR overhang

Se sembró tres muestras de *E. coli* cepa DH5 α en matraces con medio LB+Clor, esta cepa posee el plásmido pSB1C3_A593+ERG11. Se extrajo el plásmido de todas las siembras. Conjuntamente se hizo dos PCR overhang del gen *Velvet* con el cDNA obtenido de la retrotranscripción. Para observar resultados se realizó una electroforesis (Figura 13). En la Tabla 5 se resume los resultados obtenidos de la extracción de plásmido pSB1C3_A593+ERG11, PCR overhang y electroforesis.

Figura 13

Amplicón del gen Velvet y plásmido pSB1C3_A593+ERG11.



Nota: (A) 1 Kb Plus DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific. (B) & (C) Amplicón del gen *Velvet*. (D), (E) & (F) plásmido pSB1C3_A593+ERG11.

Tabla 5

Resultados del crecimiento de E. coli DH5 α , extracción de plásmido y PCR overhang.

Proceso	Muestra	Replicas	Resultados	Observaciones
Siembra en LB+Clor	HD5 α con plásmido	3	Crecimiento de la cepa	Sin contaminación
Extracción de plásmido	HD5 α con plásmido	3	Extracción del plásmido exitosa	Vo= 30 μ L
PCR overhang	cDNA	2	Amplificación del gen <i>Velvet</i>	Vo= 25 μ L
Electroforesis	Plásmido & PCR	1	Electroforesis con resultados exitosos	v= 95 volt t= 35 min

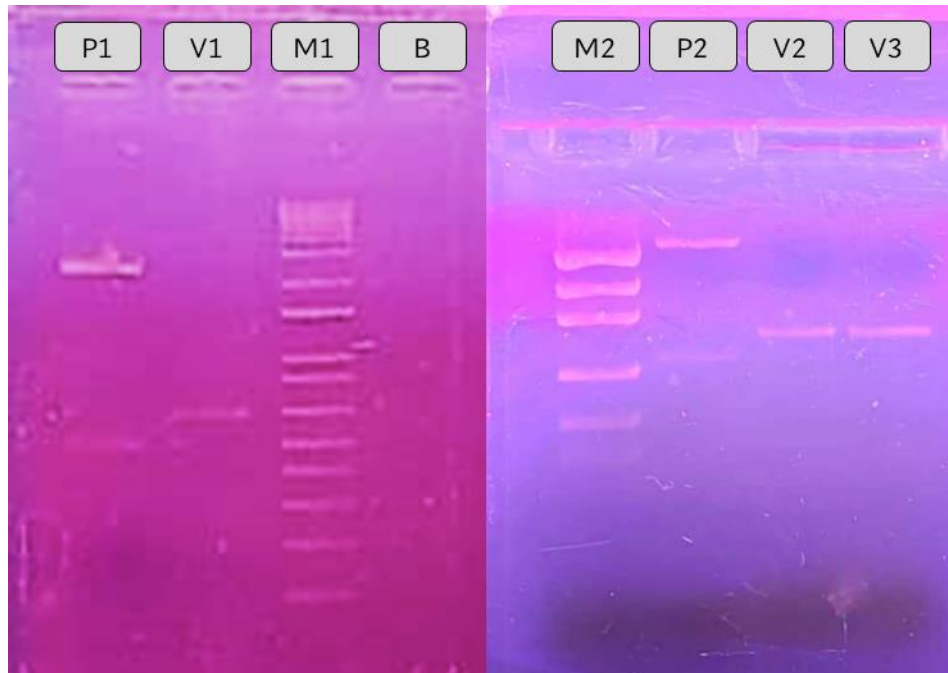
Nota: Vo= volumen obtenido, v= voltios, t= tiempo.

Restricción-ligación

Se realizó dos procesos de digestiones, el primer proceso se digirió una muestra de plásmido pSB1C3_A593+ERG11 y el amplicón del gen *Velvet*. El segundo proceso se digirió el plásmido pSB1C3_A593+ERG11 y por duplicado el amplicón del gen *Velvet* (Figura 14). Los digestados se purificaron y posteriormente se ligaron. Se realizó 3 ligaciones distintas, para la primera ligación se usó el primer digestado, sin embargo, no se dio el ensamblaje, para el segundo y tercer ligado se usó el segundo proceso de digestión obteniendo el ensamblaje del amplicón con el plásmido. Además, se realizó PCR con los primers BBa_G00100 y BBa_G00101 en los ligados para identificar si se ensambló correctamente (Figura 15). En la Tabla 6 se resume los resultados obtenidos.

Figura 14

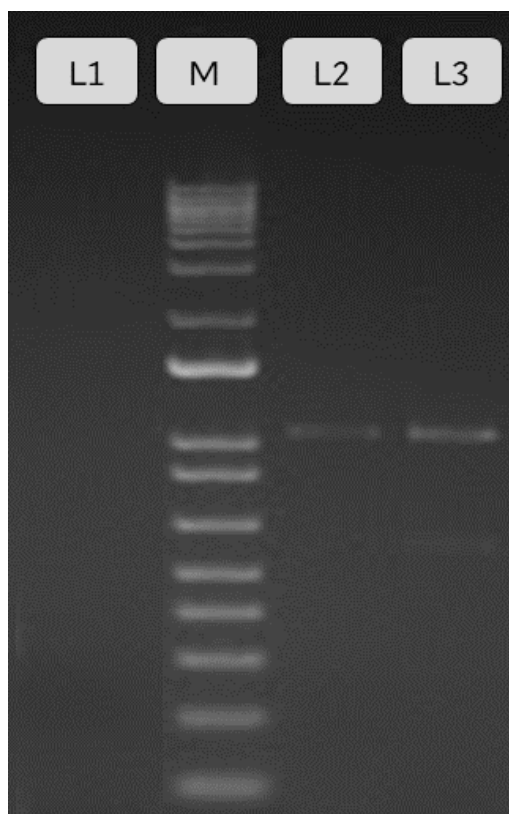
Resultados de la digestión con las enzimas KpnI y BglII.



Nota: (P1) & (P2) plásmido pSB1C3_A593+ERG11 digerido con las enzimas KpnI y BglII. (V1), (V2) & (V3) amplicón del gen *Velvet* digerido con las enzimas KpnI y BglII. (B) control negativo del digerido. (M1) 1 Kb Plus DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific. (M2) Low DNA Mass Ladder de Thermo Fisher Scientific.

Figura 15

Electroforesis de la PCR de los ligados.



Nota: se usaron los primers BBa_G00100 y BBa_G00101. (L1) ligado de P1 y V1, (L2) ligado P2 y V2, (L3) ligado de P2 y V3. (M) 1 Kb Plus DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific.

Tabla 6

Resultados obtenidos del proceso de restricción-ligación.

Proceso	Muestra	Replicas	Resultados	Observaciones
Digestión del plásmido	pSB1C3_A593+ERG11	2	Digestión exitosa	Vo= 20 µL
Digestión del amplicón	Amplicón del gen <i>Velvet</i>	3	Digestión exitosa	Vo= 30 µL
Purificación del plásmido	Digestado del plásmido	2	Purificación sin novedades	2386 pb
Purificación del amplicón	Digestado del amplicón	3	Purificación sin novedades	540 pb
Ligación	Plásmido & amplicón purificados	3	2 ligados exitosos	Primera ligación no se obtuvo.
Electroforesis	Plásmido & amplicón purificados	2	6 bandas visibles y 2 marcadores	v= 95 volt t= 35 min
Electroforesis	Ligados	1	2 bandas visibles y 1 marcador	v= 100 volt t= 50 min

Nota: Vo= volumen obtenido, v= voltios, t= tiempo.

Células competentes, transformación y PCR de colonias

Se sembró *E. coli* cepa One Shot TOP10 y HT115 en matraces con medio LB. En ambos casos hubo crecimiento de las cepas deseadas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Posteriormente las células bacterianas se usaron para hacer células competentes de ambas cepas.

Se usó células competentes de *E. coli* One Shot TOP10 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) para hacer la transformación de los ligados (L2 & L3). En el primer intento de transformación (T1) no hubo crecimiento celular en cajas Petri con LB+Clor. En un segundo intento de transformación (T2) si existió crecimiento bacteriano, sin embargo, las cajas Petri se contaminaron con hongos y bacterias ambientales antes de ser analizadas debido a problemáticas externas al proyecto. Finalmente, en una tercera transformación (T3) se identificaron colonias de células transformadas (**¡Error! No se**

encuentra el origen de la referencia.). Los resultados de células competentes y transformación se resumen en la Tabla 7 y la Tabla 8.

Tabla 7

Resultados de células competentes y transformación en E. coli One Shot TOP10.

Proceso	Muestra	Replicas	Resultados	Observaciones
Preparación de células competentes	<i>E. coli</i> One Shot TOP10	6	Se obtuvo células competentes	Cada C.C. sirven para 4 transformaciones
Preparación de células competentes	<i>E. coli</i> HT115	12	Se obtuvo células competentes	Cada C.C. sirven para 4 transformaciones
Transformación T1	C.C. TOP10, L2	1	No se logró la transformación	Sin contaminación, ni crecimiento
Transformación T2	C.C. TOP10, L2 & L3	1	Se logró la transformación	con contaminación y crecimiento
Transformación T3	C.C. TOP10, L3	1	Se logró la transformación	Sin contaminación, ET: 68958,3 UFC/μg

Nota: ET= Eficiencia de transformación, C.C.= células competentes. L2 & L3= ligados, UFC= unidades formadoras de colonias.

Tabla 8

Eficiencia de Transformación en células competentes de E. coli One Shot TOP10.

Muestras	UFC	ET (UFC/μg)
Blanco	0	0
1	137	85625,0
2	58	36250,0
3	141	88125,0
4	225	140625,0
5	23	14375,0
6	78	48750,0
7	∞	∞

Promedio	110,33	68958,3
-----------------	--------	---------

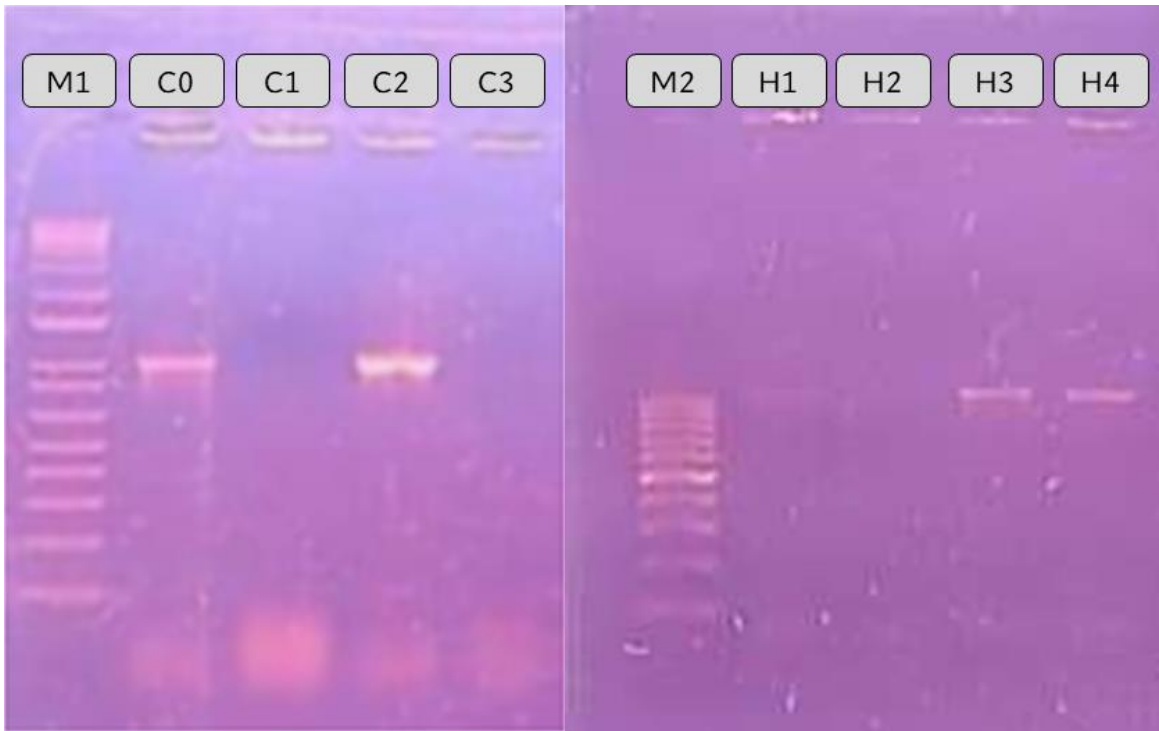
Nota: ET= Eficiencia de transformación UFC/ μ g, UFC= unidades formadoras de colonias. ∞ = crecimiento masivo.

Una vez se observó crecimiento de las células transformadas se marcó y se realizó una PCR de colonias para comprobar la transformación de las colonias con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet. Se realizó PCR de colonias en cuatro colonias distintas (C0, C1, C2 & C3), donde, la colonia C0 y C2 tuvieron resultados esperados observados en la electroforesis (Figura 16). Las colonias C0 y C2 se sembraron en matraces con medio LB+Clo, del crecimiento bacteriano obtenido en los matraces se almacenó en crioviales con glicerol (1:1) (Figura 18). Además, se extrajo el plásmido pSB1C3_A593+Velvet de la colonia C0 obteniendo 50 μ L del plásmido con una concentración de 34,0 ug/uL.

Una vez obtenido el plásmido ensamblado y clonado se realizó otra transformación en células competentes de *E. coli* HT115 y el plásmido pSB1C3_A593+Velvet. Su crecimiento fue visible en la primera transformación (TH1). Se realizó cuatro PCR de colonias a cuatro colonias distintas (H1, H2, H3 & H4) donde se corroboraron resultados esperados en H3 y H4 (Figura 16). Las colonias H3 y H4 se sembraron en matraces con medio LB+Clor, del crecimiento bacteriano obtenido en los matraces se almacenó en crioviales con glicerol (1:1) (Figura 18). Para validar los resultados se hizo PCR de colonias con los primers dsRNA_Velvet_F_2 y dsRNA_Velvet_R_2, y los primers BBa_G00100 y BBa_G00101 de las colonias C0, C2 y H3 crecidas en matraces con medio LB+Clor (Figura 17).

Figura 16

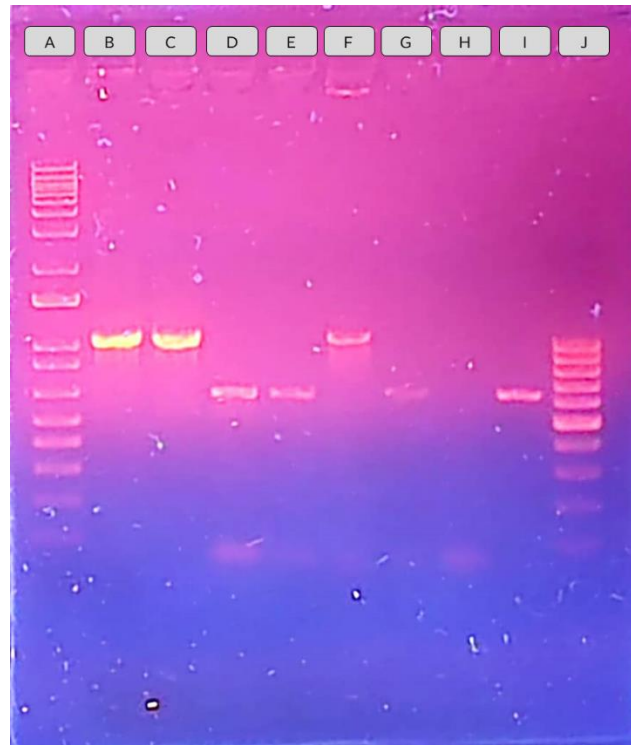
PCR de colonias de las células transformadas con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet.



Nota: la PCR se realizó con los primers BBa_G00100 y BBa_G00101. (M1) 1 Kb Plus DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific. (C0), (C1), (C2) & (C3) PCR de colonias en *E. coli* One Shot TOP 10 transformadas. (M2) GeneRuler 100pb DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific. (H1), (H2), (H3) & (H4) PCR de colonias en *E. coli* HT115 transformadas.

Figura 17

Electroforesis de PCR de colonias para comprobar las transformaciones obtenidas.



Nota: (A) 1 Kb Plus DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific. (B) & (C) PCR de colonias de *E. coli* One Shot TOP 10 transformada con los primers BBa_G00100 y BBa_G00101, (D) & (E) PCR de colonias de *E. coli* One Shot TOP 10 transformada con los primers dsRNA_Velvet_F_2 y dsRNA_Velvet_R_2, (F) PCR de colonias de *E. coli* HT115 transformada con los primers BBa_G00100 y BBa_G00101, (G) PCR de colonias de *E. coli* HT115 transformada con los primers dsRNA_Velvet_F_2 y dsRNA_Velvet_R_2, (H) control negativo de la PCR de colonias de *E. coli* HT115, (I) amplicón del gen *Velvet*, (J) GeneRuler 100pb DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific.

Tabla 9

Resultados de PCR de colonias.

Técnica	Muestra	Replicas	Resultados	Observaciones
PCR de colonias del plásmido	<i>E. coli</i> One Shot TOP10	4	2 comprobaciones por PCR de colonias	1170 pb
PCR de colonias del plásmido	<i>E. coli</i> HT115	4	2 comprobaciones por PCR de colonias	1170 pb
PCR de colonias del gen <i>Velvet</i>	<i>E. coli</i> One Shot TOP10	2	2 comprobaciones por PCR de colonias	548 pb
PCR de colonias del gen <i>Velvet</i>	<i>E. coli</i> HT115	1	1 comprobación por PCR de colonias	548 pb
Electroforesis de PCR de colonias 1	PCR de colonias de 1	1	2 bandas visibles y 1 marcador	v= 95 volt t= 35 min
Electroforesis de PCR de colonias 2	PCR de colonias de 2	1	2 bandas visibles y 1 marcador	v= 95 volt t= 35 min
Electroforesis de PCR de colonias 3	PCR de colonias en matraces	1	7 bandas visibles y 2 marcadores	v= 100 volt t= 60 min

Nota: Vo= volumen obtenido, v= voltios, t= tiempo. PCR de colonias del plásmido se realiza con los primers

BBa_G00100 y BBa_G00101. PCR de colonias del gen *Velvet* se realiza con los primers dsRNA_Velvet_F_2

y dsRNA_Velvet_R_2.

Figura 18

Almacenamiento de células transformadas con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet.



Nota: se colocó 0,5 mL de glicerol y 0,5 mL de medio LB con células transformadas con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet.

Diseño experimental

En el diseño experimental se realizó 3 transformaciones con tratamientos diferentes (t=30s, t=45s y t=60s) en células competentes de *E. coli* HT115 con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet. Se llevó a cabo 6 repeticiones (n=6) y un control negativo por tratamiento. Los tratamientos consisten en variar el tiempo de shock térmico, el primer tratamiento es de 30 segundos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), el segundo tratamiento es de 45 segundos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y en el tercer tratamiento es 60 segundos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Los blancos se observan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Análisis estadístico

Los resultados del diseño experimental se observaron a las 48 horas de la transformación incubando a 37°C (Tabla 10). El promedio del tratamiento t=30s es 7,5 UFC con una eficiencia de

transformación de 1102,9 UFC/ μ L, el promedio del tratamiento t=45s es 89,5 UFC con una eficiencia de transformación de 13161,8 UFC/ μ L y el promedio del tratamiento t=60s es 35,2 UFC con una eficiencia de transformación de 5171,6 UFC/ μ L. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 10 y en la Tabla 11. Se realizó un ANOVA de la eficiencia de transformación promedio, el cual, demuestra que existe diferencia significativa en los tratamientos (Tabla 12). Se realizó el test de Tukey donde se identificó que el tratamiento t=45s es significativamente diferente a los otros tratamientos y de mayor eficiencia de transformación (Figura 19), además, en los tratamientos t=30s y t=60s no existen diferencia significativa en la eficiencia de transformación (Tabla 13).

Tabla 10

Resultados de las células E. coli HT115 transformadas.

Tratamientos, tiempo de shock térmico (t)			
nº	30s (UFC)	45s (UFC)	60s (UFC)
1	0	107	39
2	1	81	44
3	44	113	23
4	0	141	62
5	0	63	42
6	0	32	1
Control (-)	0	0	0

Tabla 11

Eficiencia de transformación de E. coli HT115.

	nº	Tratamientos, tiempo de shock térmico (t)		
		30s (UFC/µg)	45s (UFC/µg)	60s (UFC/µg)
Eficiencia de transformación (ET)	1	0,0	15735,3	5735,3
	2	147,1	11911,8	6470,6
	3	6470,6	16617,6	3382,4
	4	0,0	20735,3	9117,6
	5	0,0	9264,7	6176,5
	6	0,0	4705,9	147,1
	Control (-)	0	0	0

Tabla 12

ANOVA de la eficiencia de transformación de células E. coli HT115.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	F α	p-valor
TRATAMIENTO	2	451624375,24	225812187,62	13,78	3,68	0,0004
ERROR	15	245800893,89	16386726,26			
Total	17	697425269,13				

Nota: F.V.= Factor de variaciones, G.L.= grado de libertad, S.C.= suma de cuadrados, C.M.= promedio de cuadrados, F= F de Fisher calculado, F α = F de Fisher con grado de libertad 2 y 15, y error 0,05.

Tabla 13

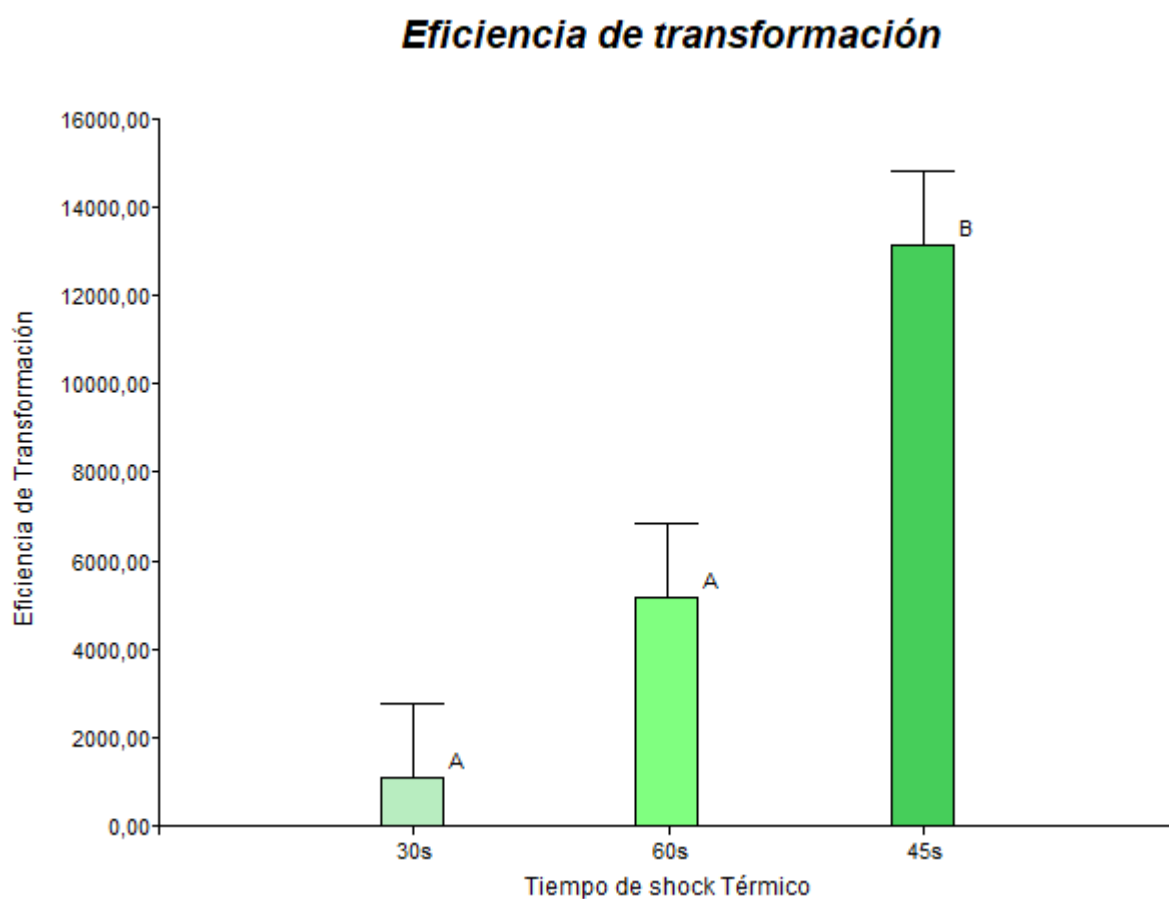
Test de Tukey de la eficiencia de transformación de *E. coli* HT115.

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
30s	1102,94	6	1652,61	A
60s	5171,57	6	1652,61	A
45s	13161,76	6	1652,61	B

Nota: A & B= Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) con un error de 0,05. E.E.= Error estándar.

Figura 19

Gráfica de barras del promedio de la eficiencia de transformación por tratamiento.



Capítulo V: Discusión

El presente proyecto reporta el ensamblaje del plásmido pSB1C3_A593 con el gen *Velvet* mediante técnicas de restricción-ligación. El plásmido pSB1C3 es un backbone de ensamblaje BioBrick de alto número de copias, posee resistencia a cloranfenicol y fue diseñado por iGEM para las competiciones de biología sintética (Austin Che, 2008). Se usó el gen *Velvet* debido a ser un regulador clave para otros genes de virulencia y patogenicidad en las células fúngicas, además, es un gen altamente conservado en *Fusarium oxysporum* (Mukherjee & Kenerley, 2010).

En una primera instancia se realizó el proceso de extracción de RNA total De Foc R1 mediante el kit E.Z.N.A.® obteniendo una concentración final de 8 ng/μL. El kit E.Z.N.A.® tiene una mayor eficiencia de extracción a comparación de otros kits comerciales como TRIzol o RNeasy, sin embargo, tiene menor pureza y esto puede llevar a errores en la retrotranscripción (Bernáldez et al., 2017), a pesar de esto la extracción del RNA total posee valores aceptables de pureza $A_{260}/A_{230} = 1,86$ y $A_{260}/A_{280} = 1,64$ (Thermo Fisher Scientific, 2021). La retrotranscripción del RNA total no se vio afectado por las impurezas, lo cual, permitió que la PCR overhang del gen *Velvet* dé resultados esperados.

El plásmido pSB1C3_A593+ERG11 es un proyecto desarrollado por iGEM Ecuador, (2021) el cual se usó como backbone para el ensamblaje del gen *Velvet* reemplazando el gen ERG11, el plásmido se encontraba en el repositorio del laboratorio de diagnóstico molecular IDgen en la cepa de clonación *E. coli* DH5α. En las extracciones de plásmido por el método de lisis alcalina se obtuvo concentraciones superiores a 200 ng/μL, sin embargo, presentaban impurezas y DNA genómico que pueden afectar resultados. La pureza y calidad de la extracción por lisis alcalina depende del tamaño del plásmido, el número de copias del plásmido y de la producción de carbohidratos de la bacteria (Rojas et al., 2017). En la extracción de plásmido mediante el kit PureLink™ se obtuvo concentraciones alrededor de 30 ng/μL con una alta pureza, este kit permite aislar DNA plasmídico de alta calidad apta para transformación, PCR, clonación y digestión (Thermo Fisher Scientific, 2019). Al momento de correr el plásmido en un gel

de agarosa, se llegó a visualizar diferentes tamaños de banda, estos son debido al superenrollamiento del DNA generado por las topoisomerasas. El superenrollamiento del DNA plasmídico tiene la función de compactar el DNA para ocupar un volumen inferior, acercar regiones alejadas en la estructura primaria y la regulación genética de la replicación y transcripción (Drlica, 1990).

El proceso de restricción-ligación se realizó con la digestión del plásmido pSB1C3_A593+ERG11 y el amplicón del gen *Velvet* con las enzimas de restricción FastDigest KpnI y BglIII, Se purificó con el kit Wizard® y se ligó los fragmentos deseados (pSB1C3_A593+Velvet) con DNA T4 ligasa. Se usó las enzimas FastDigest por su compatibilidad del 100% entre enzimas de restricción y el buffer de digestión, además, permite una digestión en 15 minutos y la posibilidad de cargar directamente al gel (Thermo Fisher Scientific, 2018). Se aumentó el tiempo de incubación a 4 horas. El aumento del tiempo de digestión se realizó debido a que la velocidad de reacción se ve disminuido con respecto a la disminución del sustrato, lo que puede producir que en tiempos cortos no se digeste el 100% del DNA deseado (Matsumura, 2015). Otro proceso modificado fue en la ligación, el ligado L1 se realizó a 26 °C por 60 minutos, sin embargo, este no tuvo resultados esperados en la PCR, esto puede deberse a que temperaturas altas DNA T4 ligasa puede llegar a ser ineficiente, temperaturas bajas y tiempos largos mejoran la ligación (Hernández et al., 1995). Por esta razón en posteriores ligaciones (L2 & L3) se disminuyó la temperatura a 22 °C y se aumentó el tiempo de incubación a 80 minutos mejorando sustancialmente la ligación.

Las células competentes obtenidas fueron viables con el protocolo usado, sin embargo, en la transformación T1 no se obtuvo resultados esperados, esto puede deberse a que el tiempo de shock térmico no fue suficiente (30 segundos), para posteriores transformaciones (T2, T3 & TH1) se usó 45 segundos de shock térmico (Gómez Arias et al., 2018), obteniendo crecimiento celular. Se comprobó la transformación en las colonias C0, C2, H3 y H4 mediante PCR de colonias. La PCR de colonias es un método para la detección rápida de bacterias y levaduras, el cual permite identificar un constructo

después de un proceso de transformación y crecimiento celular. Este método puede llegar a fallar si no se obtiene el DNA deseado de la cepa, esto puede mejorar si se realiza una etapa previa de lisis celular (Bergkessel & Guthrie, 2013). Además, puede existir crecimiento inespecífico de colonias sin resistencia a cloranfenicol en un medio LB+Clor, esto debido al mecanismo de transportadores multidrogas, este es usado por bacterias para evitar el efecto de compuestos tóxicos, otra opción es la secreción al medio de la proteína que permite la resistencia al cloranfenicol, permitiendo el crecimiento celular de colonias no resistente a su alrededor (Morales et al., 2007).

En el diseño experimental se analiza tres tratamientos para mejorar la eficiencia de transformación. Los tratamientos consisten en variar el tiempo de shock térmico en el proceso de transformar células competentes *E. coli* HT115 con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet. El ANOVA determinó que existe diferencia significativa entre tratamientos, además, el test de Tukey determinó que el tratamiento t=45s tiene una eficiencia de transformación significativamente mayor que los demás, los tratamientos t=30s y t=60s son significativamente iguales. los protocolos de Promega, (2022) y los estudios de Gómez Arias et al., (2018) determinan que el tiempo de shock térmico óptimo para la transformación es de 45 segundos a 42 °C respaldando los datos del diseño experimental de este proyecto, pero las transformaciones son desarrolladas en *E. coli* DH5 α . Moreno (2018) determina que entre 45 a 50 segundos es el tiempo óptimo para el shock térmico a 42 °C. Por otro lado, Pope & Kent, (1996) determinaron que la mejor eficiencia de transformación es con un shock térmico de 2 a 3 minutos, sin embargo, este cambio drástico es debido a que la temperatura del shock térmico es disminuida a 37 °C.

Capítulo VI: Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

En el presente proyecto se obtuvo el ensamblaje del plásmido pSB1C3_A593 con el amplicón del gen *Velvet* mediante técnicas de restricción-ligación. El ensamblaje obtenido tiene las cualidades necesarias para generar sdrRNA del gen *Velvet* regulado por una polimerasa T7, el ensamblaje obtenido se lo nombro pSB1C3_A593+Velvet.

Mediante técnica de PCR overhang y el cDNA obtenido a partir de mRNA de Foc R1 se amplificó un segmento del gen *Velvet* compatible con técnicas de restricción-ligación. Debido a que el primer forward agregó el sitio de restricción BglII y el primer reverse el sitio de restricción KpnI.

Se ensambló el plásmido pSB1C3_A593 con el amplicón del gen *Velvet*, mediante la restricción del plásmido y del amplicón con las enzimas BglII y KpnII durante 4 horas a 37 °C, y ligando las secuencias digeridas con T4 DNA ligasa durante 80 min a 22 °C.

Por medio del método de choque térmico se transformó *Escherichia coli* cepa One Shot TOP10 y cepa HT115 con el plásmido pSB1C3_A593+Velvet. El crecimiento celular en Agar LB+Clor y la PCR de colonias comprobaron la presencia del plásmido deseado en las células transformadas.

De acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) la variación del tiempo de shock térmico en el proceso de transformación de células competentes genera diferencia significativa en la eficiencia de transformación (valor - $p = 0,0004$). Mediante el análisis por test de Duncan se determina que los tratamientos $t=30s$ y $t=60s$ son significativamente iguales y $t=45s$ significativamente diferente a los otros tratamientos. Además, estadísticamente el tratamiento $t=45s$ posee la mejor eficiencia de transformación ($ET = 1,3 \times 10^4 \text{ UFC}/\mu\text{g}$).

Recomendaciones

- Evaluar otras variables en la transformación de células competentes para maximizar la eficiencia de transformación.
- Verificar la secuencia del amplicón ensamblado mediante secuenciación.
- Analizar la producción del dsRNA del plásmido ensamblado.
- Usar el kit de extracción PureLink™ para evitar contaminación genómica y obtener resultados más robustos en la eficiencia de transformación.
- Analizar la eficiencia de transformación a las 48 horas de incubación a 37°C.

Capítulo VII: Bibliografía

- Arias, P., Dankers, C., Liu, P., & Pilkauskas, P. (2004). *La economía mundial del banano 1985-2002: Vol. Vol. 50*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
<https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=vaNJC7-F5WIC&oi=fnd&pg=PA4&dq=banano&ots=VVx8zc-KgV&sig=klWPMjrbbZ5FZ4Jeq3XPr10yraY#v=onepage&q=banano&f=false>
- Austin Che. (2008). *pSB1C3: High copy BioBrick assembly plasmid*. <http://parts.igem.org/Part:pSB1C3>
- Bayram, Ö., & Braus, G. H. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the *velvet* family of regulatory proteins. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 1–24.
<https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00285.X>
- Bergkessel, M., & Guthrie, C. (2013). Colony PCR. *Methods in Enzymology*, 529, 299–309.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2>
- Bernaldez, V., Rodríguez, A., Rodríguez, M., Sánchez-Montero, L., & Córdoba, J. J. (2017). Evaluation of different RNA extraction methods of filamentous fungi in various food matrices. *LWT*, 78, 47–53.
<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.12.018>
- Boada Acosta, Y. F. (2018). *A systems engineering approach to model, tune and test synthetic gene circuits*. <https://doi.org/10.4995/THESIS/10251/112725>
- Bragard, C., Baptista, P., Chatzivassiliou, E., di Serio, F., Gonthier, P., Jaques Miret, J. A., Justesen, A. F., MacLeod, A., Magnusson, C. S., Milonas, P., Navas-Cortes, J. A., Parnell, S., Potting, R., Stefani, E., Thulke, H. H., van der Werf, W., Civera, A. V., Yuen, J., Zappalà, L., ... Reignault, P. L. (2022). Pest categorisation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Tropical Race 4. *EFSA Journal*, 20(1), 7092.
<https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2022.7092>

- Capa Benítez, L. B., Alaña Castillo, T. P., & Benítez Narváez, R. M. (2016). Importancia de la producción de banano orgánico. caso: provincia el Oro, Ecuador. *Universidad y Sociedad*, 8(3), 64–71.
<http://scielo.sld.cu/pdf/rus/v8n3/rus08316.pdf>
- Chiu, Y. L., & Rana, T. M. (2003). siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA*, 9(9), 1034–1048. <https://doi.org/10.1261/RNA.5103703>
- Clarke, L., & Kitney, R. (2020). Developing synthetic biology for industrial biotechnology applications. *Biochemical Society Transactions*, 48(1), 113. <https://doi.org/10.1042/BST20190349>
- Drlica, K. (1990). Bacterial topoisomerases and the control of DNA supercoiling. *Trends in Genetics*, 6(C), 433–437. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(90\)90306-Q](https://doi.org/10.1016/0168-9525(90)90306-Q)
- Morales, E. Y., Herrera, C., & Muñoz, J. (2007). Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(1), 58–69.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57938108>
- Ghag, S. B., Shekhawat, U. K. S., & Ganapathi, T. R. (2014). Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal*, 12(5), 541–553. <https://doi.org/10.1111/PBI.12158>
- Gómez Arias, L. Y., Gómez Daza, S., & Núñez Zarrantesc, V. (2018). Estandarización de protocolos de transformación genética en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* para la generación de una colección de constructos génicos. *Ciencia En Desarrollo*, 9(2), 9–16.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882018000200009
- Hernández, C., Vadallo, M., & Avila, A. M. (1995). *Análisis del DNA-II: clonar, secuenciar y PCR.: Vol. VOL. 15* (s2 ed., pp. 1–117). <https://www.revistanefrologia.com/es-analisis-del-dna-ii-clonar-secuenciar-articulo-X0211699595022870>
- iGEM Ecuador. (2021). *Agrobactory 593*. iGEM. <https://2021.igem.org/Team:Ecuador/Description>

- Jain, P. K., Bhattacharya, R., Kohli, D., Aminedi, R., & Agrawal, P. K. (2018). RNAi for Resistance Against Biotic Stresses in Crop Plants. *Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 2*, 67.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-90650-8_4
- Jangir, P., Mehra, N., Sharma, K., Singh, N., Rani, M., & Kapoor, R. (2021). Secreted in Xylem Genes: Drivers of Host Adaptation in *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science, 12*, 628611.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.628611/FULL>
- Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Lamprecht, S. C., & Crous, P. W. (2019). Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 43*, 1. <https://doi.org/10.3767/PERSONIA.2019.43.01>
- López-Zapata, S. P., & Castaño-Zapata, J. (2019). Manejo integrado del mal de Panamá [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. sp. cubense (E.F. SM.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 22*(2).
<https://doi.org/10.31910/RUDCA.V22.N2.2019.1240>
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., Onofre, J. G., & Jiménez-Gasco, M. D. M. (2020). Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the *Fusarium* Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants, 9*(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9091133>
- Matsumura, I. (2015). Why Johnny can't clone: Common pitfalls and not so common solutions. *BioTechniques, 59*(3), 4–13.
<https://doi.org/10.2144/000114324/ASSET/IMAGES/LARGE/TABLE1.JPEG>
- Moreno, J. (2018). Determinar la eficiencia de transformación genética mediante el método químico y método físico (Electroporación) a través de la bacteria *Escherichia coli*. [Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra]. In *Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra*.
<http://190.15.137.77/handle/11010/218>

- Mukherjee, P. K., & Kenerley, C. M. (2010). Regulation of Morphogenesis and Biocontrol Properties in *Trichoderma virens* by a VELVET Protein, Vel1. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2345. <https://doi.org/10.1128/AEM.02391-09>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). *Todo sobre los bananos: lo que debería saber acerca de esta fruta tropical*. FAO. <https://www.fao.org/zhc/detail-events/es/c/447827/>
- Panchana, C. (2021). *dsRNA diseñado para el gen diana Velvet BBa_K3893001*. IGEM2021. http://parts.igem.org/Part:BBa_K3893001
- Pérez, V. L. (2004). Marchitamiento por *fusarium* (mal de panamá) en bananos: una revisión actualizada del conocimiento presente sobre su agente causal. *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal*, 8(4), 27–38. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209117865005.pdf>
- Pope, B., & Kent, H. M. (1996). High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 24(3), 536–537.
- Promega. (2022). *pGEM®-T Easy Vector Systems*. Promega Corporation. <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>
- Rojas, C., Santillan, O., & Andrade-Dominguez, A. (2017). *Método: Extracción de ADN plasmídico (Lisis alcalina modificado)*. Conogasi. <https://conogasi.org/articulos/metodo-extraccion-de-adn-plasmidico-lisis-alcalina-modificado/>
- Rojas Miranda, T. (2018). Guía para la aplicación de medidas fitosanitarias contra *Fusarium* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (Foc R4T). *Servicios Fitosanitario Del Estado*, 1, 1–51. <https://www.sfe.go.cr/DocsFocR4TSFE/OR-RN-I-02.pdf>

SADER, & SENASICA. (2016). FUSARIOSIS DE LAS MUSÁCEAS. *Sinavef*, 1(2), 1–26.

<https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas%20tecnicas/Ficha%20T%C3%A9cnica%20Fusariosis%20de%20las%20mus%C3%A1ceas.pdf>

Setten, R. L., Rossi, J. J., & Han, S. ping. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 2019 18:6, 18(6), 421–446.

<https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>

Shapira, P., Kwon, S., & Youtie, J. (2017). Tracking the emergence of synthetic biology. *Scientometrics*, 112(3), 1439. <https://doi.org/10.1007/S11192-017-2452-5>

Smith, E. F. (1910). A Cuban banana disease. *Science*, 31(802), 746–757.

<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.31.802.746>

Song, J., Lee, M., Kim, T., Na, J., Jung, Y., Jung, G. Y., Kim, S., & Park, N. (2018). A RNA producing DNA hydrogel as a platform for a high performance RNA interference system. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-06864-0>

Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(2), 106–114.

<https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2004.12.007>

Thermo Fisher Scientific. (2018). *Enzimas de restricción FastDigest*.

<https://www.thermofisher.com/ec/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/fastdigest-thermo-scientific.html>

Thermo Fisher Scientific. (2019). *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kits*.

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K210010>

Thermo Fisher Scientific. (2021). *TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers: 260/280 and 260/230 Ratios* . www.nanodrop.com

Vásquez Orozco, R. (2017). El impacto del comercio del Banano en el desarrollo del Ecuador. *AFESE*, 53, 163–182. <https://www.afese.com/img/revistas/revista53/comerbanano.pdf>

Villarraig, R. A. (2020). *Diseño de un circuito genético de adaptación y estudio de sus aplicaciones en la industria biotecnológica* [Universidad Politécnica de Valencia].
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/149568/Andreu%20-%20Dise%C3%B1o%20de%20un%20circuito%20gen%C3%A9tico%20de%20adaptaci%C3%B3n%20y%20estudio%20de%20sus%20aplicaciones%20en%20la%20industr....pdf?sequence=1>

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3), 228–234.
<https://doi.org/10.1038/NCB0309-228>

Zhiminaicela Cabrera, Quevedo Guerrero, & García Batista. (2020). La producción de banano en la Provincial de El Oro y su impacto en la agrobiodiversidad . *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(3), 189–195. <http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/327/350>