



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE
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

**“Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen
SGE1 en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1).**

Elaborado por: Barragán Sánchez, José Leonardo

Director: Flores Flor, Francisco Javier PhD.

Sangolquí, 1 de septiembre de 2022



Tabla de contenido

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos



INTRODUCCIÓN

Banano

Figura 1. Planta de banano

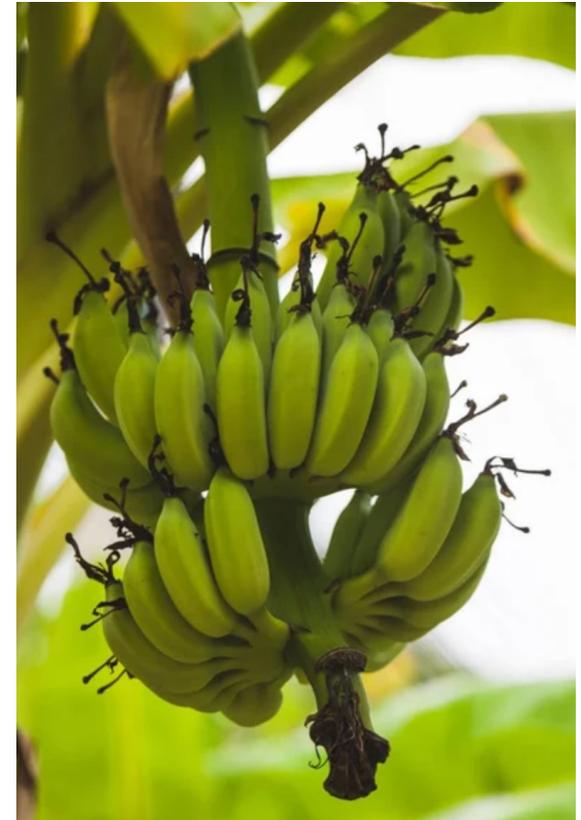


- Planta herbácea monocotiledónea, perenne
- Pertenece a la familia de las musáceas
- Cultivo en regiones tropicales y subtropicales
- En 2018, Ecuador cubre el 34% de las exportaciones de banano en el mercado mundial



6,6 millones de toneladas exportadas

Figura 2. Racimo de banano

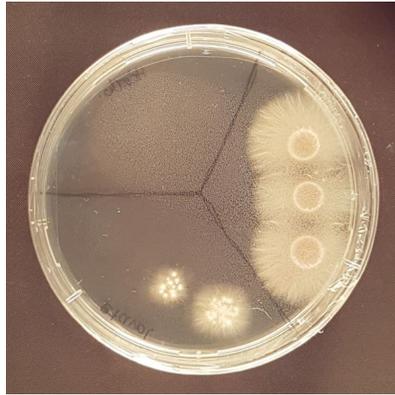


Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (Foc)



-marchitamiento por Fusarium
-enfermedad de Panamá

Figura 3. Crecimiento de Foc TR4



Patógeno vascular

Estructuras de supervivencia: microconidios, macroconidios y clamidosporas

De fácil propagación

Alerta fitosanitaria debido a su dispersión

Figura 4. Infección de Foc

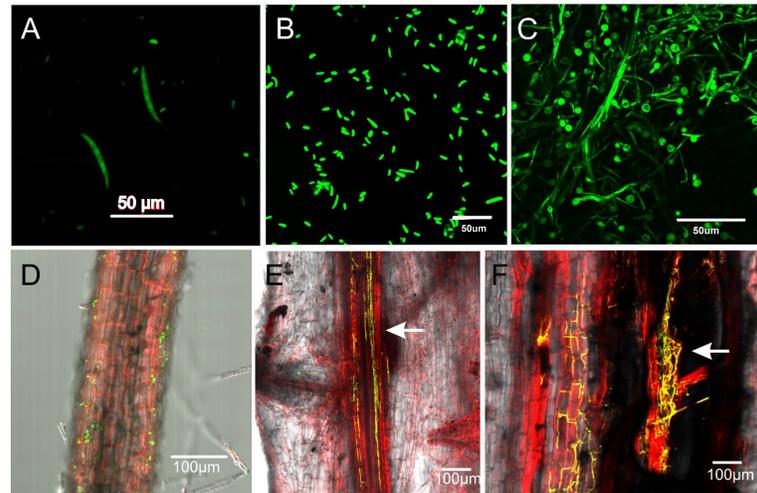


Figura 5. Mapa de distribución de Foc TR4



Biología sintética

SGE1

Regular la expresión de los genes efectores *SIX*

Deleción de este gen no afecta a la colonización de la raíz

SGE1 regula genes para la infección

RNA de interferencia

mecanismo de silenciamiento a nivel postranscripcional

dsRNA → siRNA

Ensamblaje

Overhang PCR

Enzimas de restricción

Clonación de DNA



OBJETIVOS

Objetivo general

Ensamblar un plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen *SGE1* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1).

Objetivos específicos

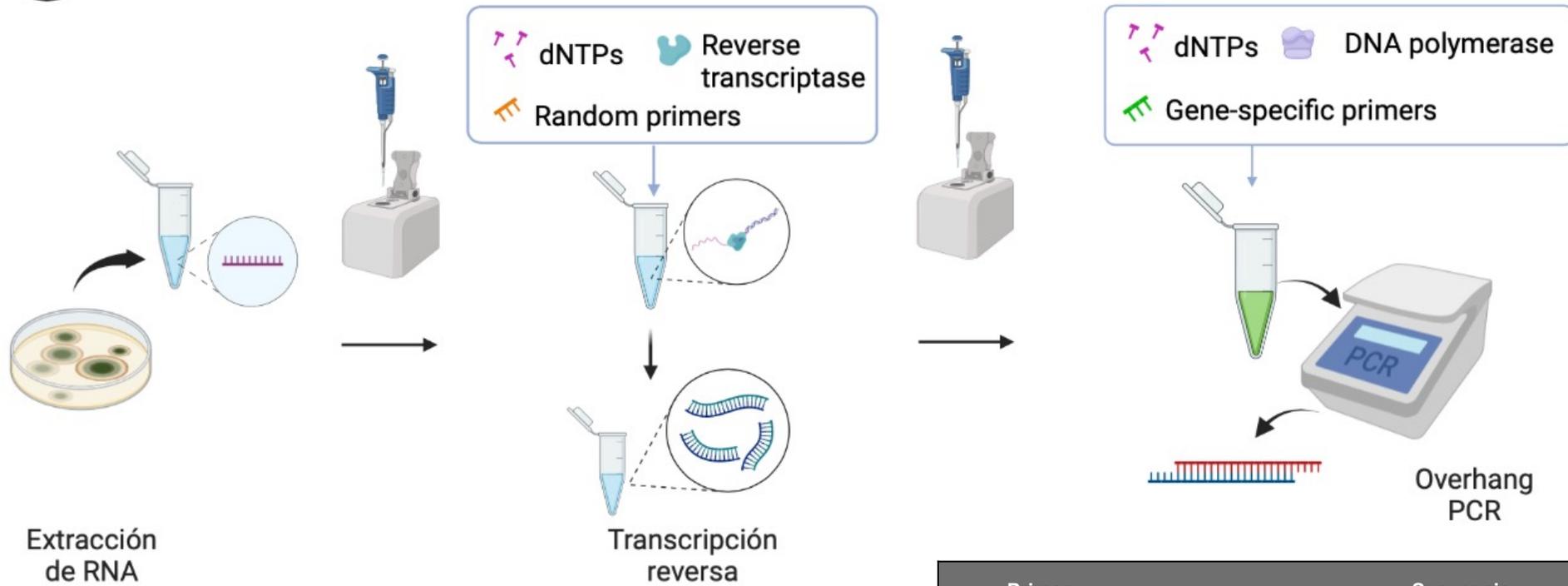
- Obtener un biobrick del gen *SGE1* mediante ensamblaje de restricción y ligación.
- Ensamblar el plásmido para la producción de dsRNA mediante técnicas de restricción y ligación.
- Transformar *Escherichia coli* cepa HT115 con el plásmido ensamblado para producir dsRNA objetivo.

Existe una diferencia significativa en la eficiencia de transformación de *Escherichia coli* con el plásmido PSB1C3_A593 + *SGE1* cuando se varía la temperatura de choque térmico.

METODOLOGÍA

Figura 6. Pasos para al obtención del amplicón del gen SGE1

1 Amplicón del gen SGE1



Foc R1

- Laboratorio de diagnóstico molecular IDgen
- Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Primer	Secuencia
dsRNA_SGE1_F_2	5'-AAAAGATCTCCCTTTCCAAACAGGCC-3'
dsRNA_SGE1_R_2	5'-AAAGGTACCCCGTGTTGAGCTTCCTC-3'

Figura 7. Pasos para el ensamblaje del cassette de expresión

2 Ensamblaje del cassette de expresión

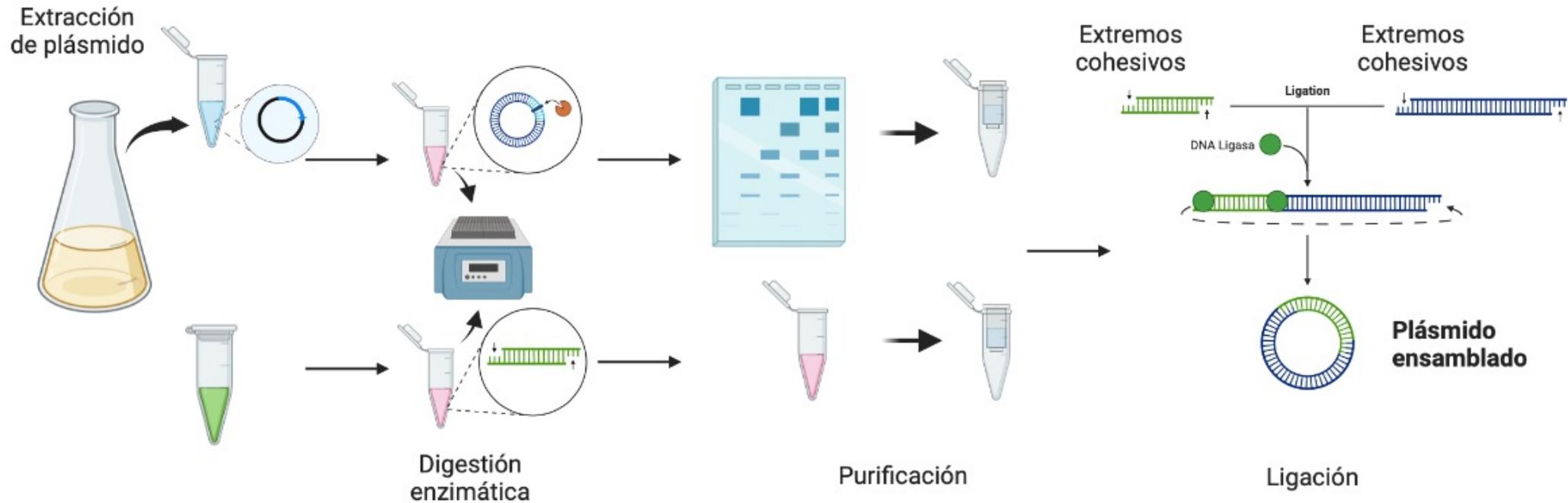
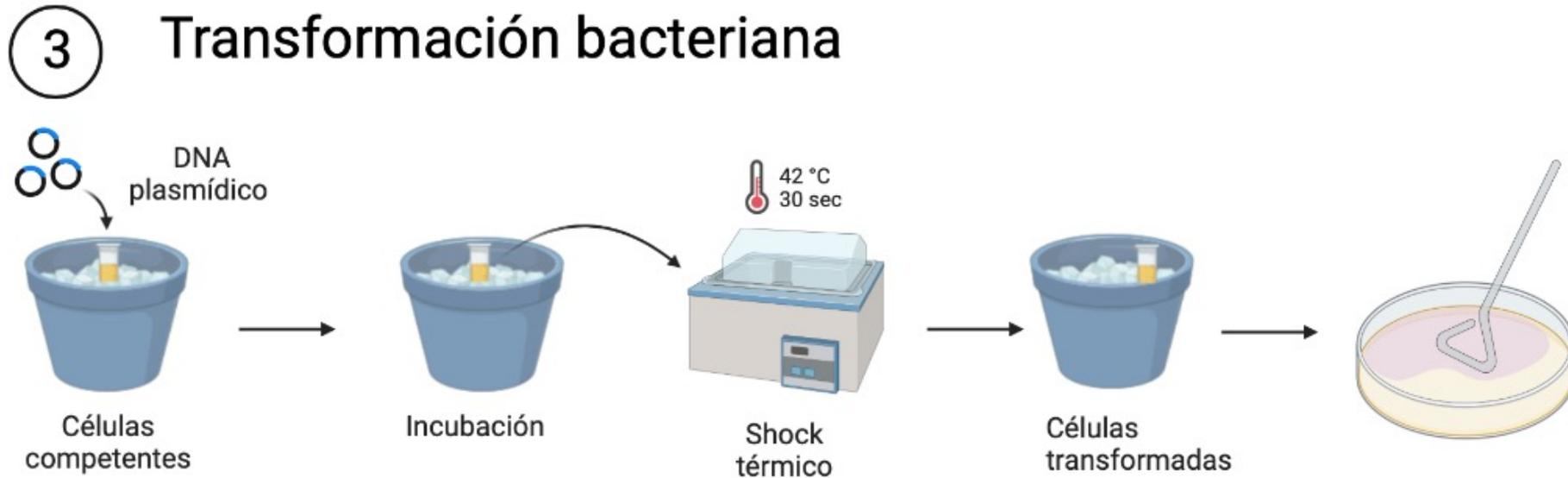


Figura 8. Pasos para la transformación



Cálculo de la eficiencia de transformación

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\# \text{ UFC}}{\text{DNA sembrado } (\mu\text{g})}$$

$$\text{DNA sembrado } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Volumen sembrado } (\mu\text{L}) \times \text{DNA plasmídico } (\mu\text{g})}{\text{Volumen de transformación } (\mu\text{L})}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de RNA Total y transcripción reversa

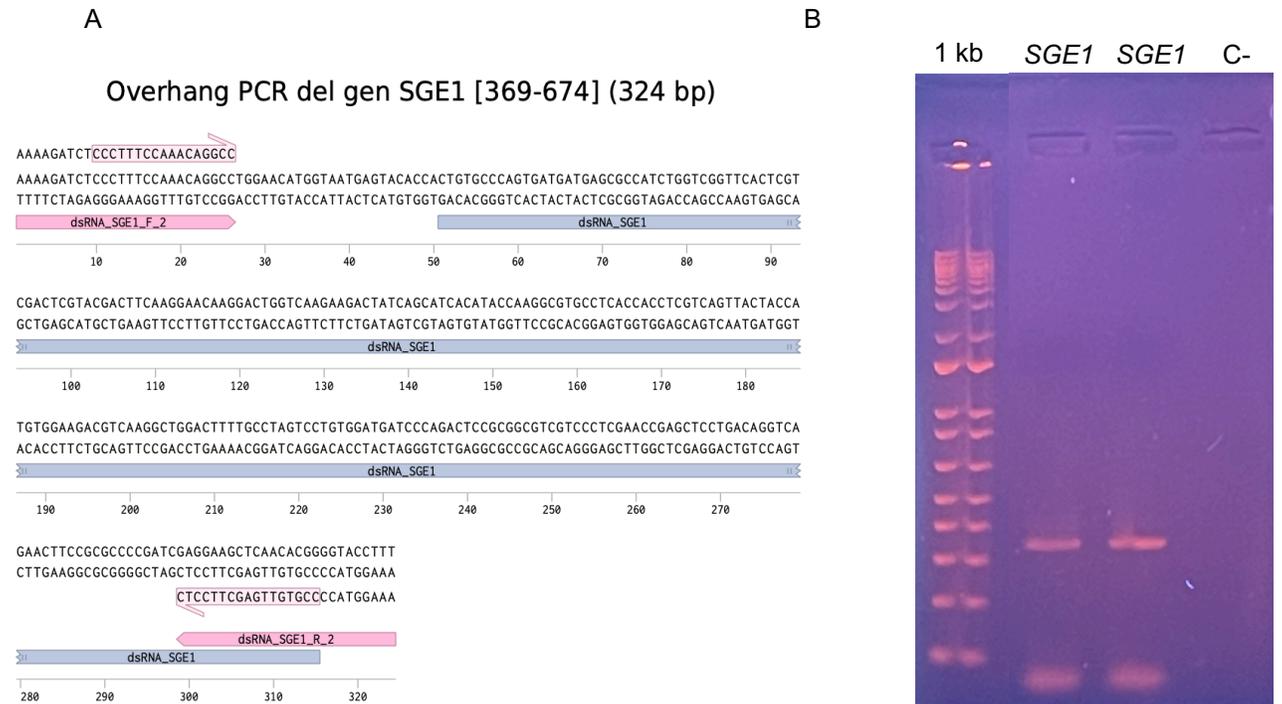
Figura 9. Crecimiento de *Foc R1* en medio PDA



Concentración de RNA Total = 8.3 ng/μL
 Concentración de cDNA = 873.3 ng/μL

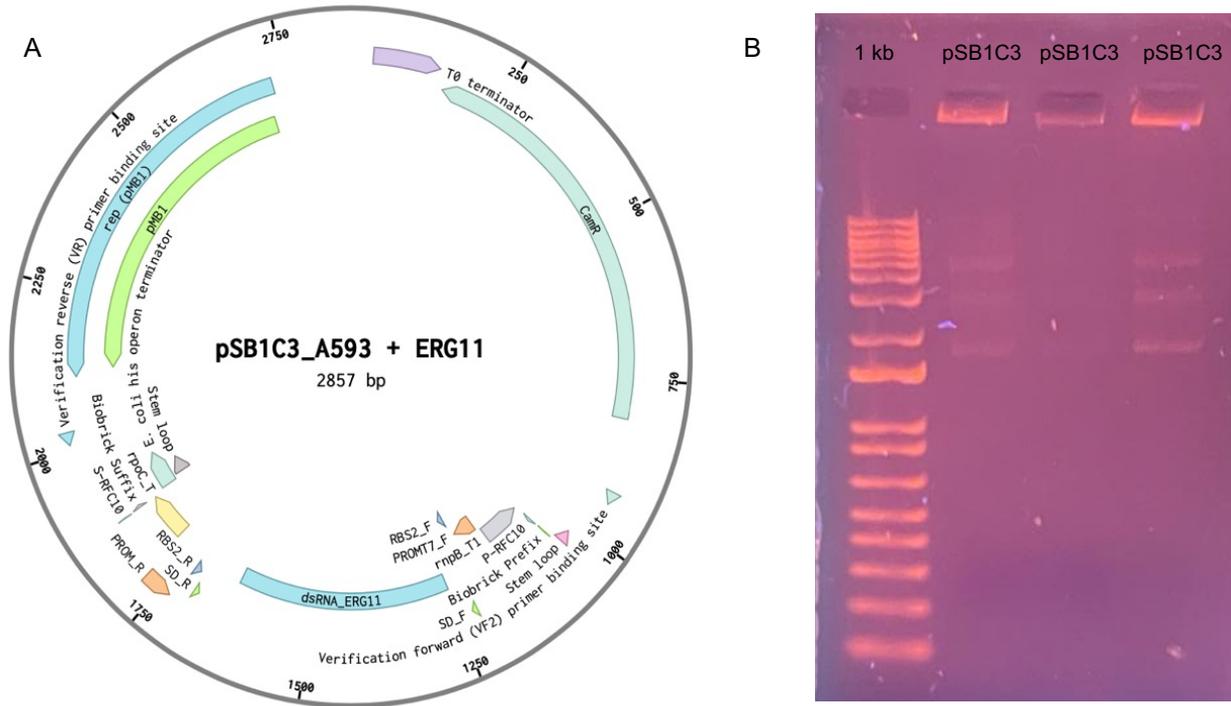
Overhang PCR

Figura 10. Producto de overhang PCR. A) Resultado *in silico*. B) Electroforesis del amplicón.



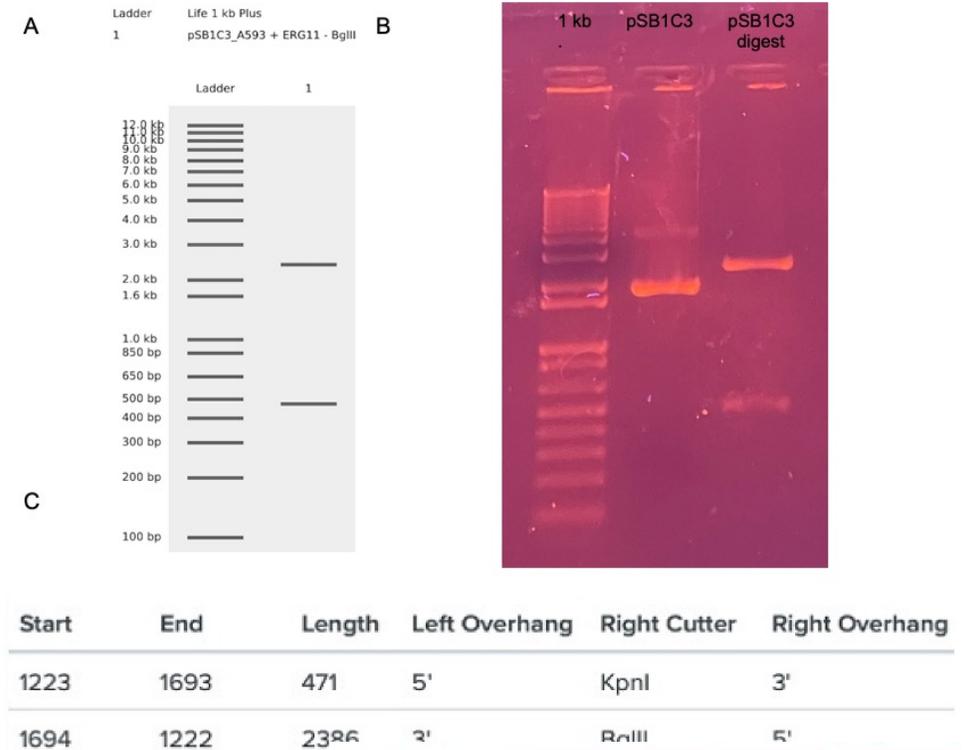
Extracción de plásmido

Figura 11. Tamaño del plásmido extraído. A) Mapa de plásmido usando Benchling. B) Electroforesis del DNA plasmídico.



Ensamblaje de restricción y ligación Digestión

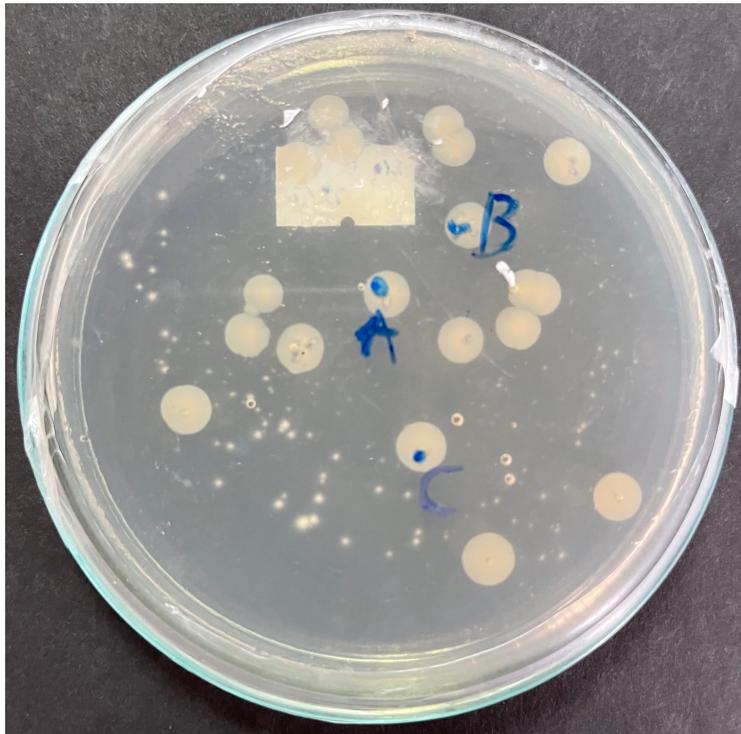
Figura 12. Digestión del plásmido. A) Electroforesis virtual B) Electroforesis en gel de agarosa 1% C) Tamaño de las bandas obtenidas en Benchling en la digestión



Transformación bacteriana mediante shock térmico

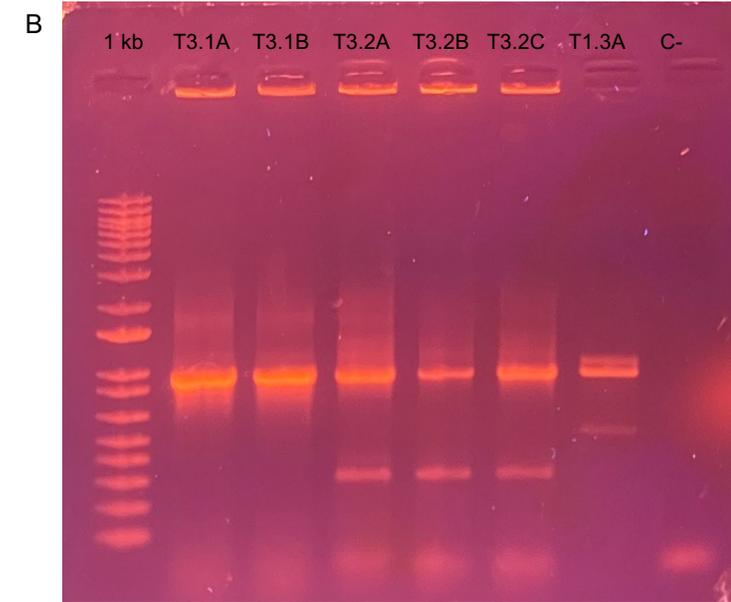
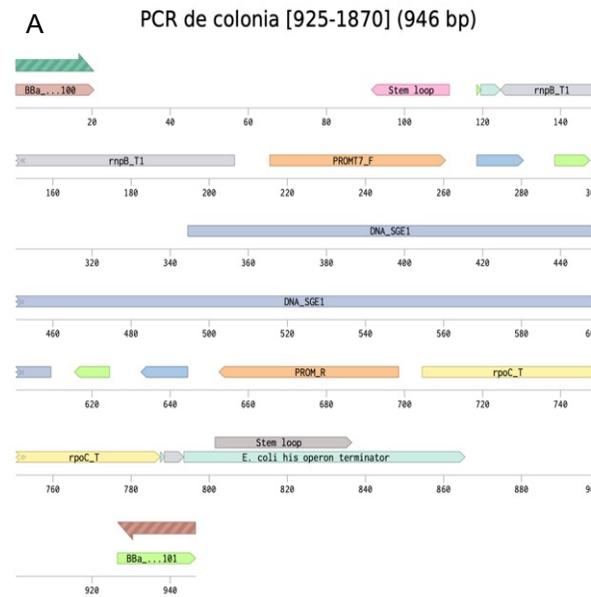
PCR de colonia

Figura 14. Cultivo puro de *E. coli* Top 10 transformado con el plásmido pSB1C3_A593 + SGE1 con resistencia a cloranfenicol.



medio LB agar + cloranfenicol (25 µg/mL)

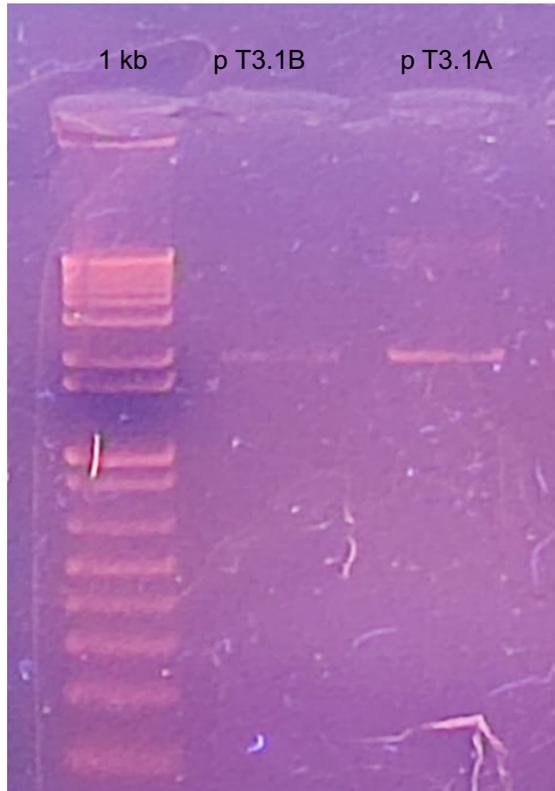
Figura 15. Amplicón obtenido a partir de la PCR de colonia A) Resultado in silico realizado en Benchling. B) Electroforesis



Primer	Secuencia
BBa_G00100	5'-TGCCACCTGACGTCTAAGAA-3'
BBa_G00101	5'-ATTACCGCCTTTGAGTGAGC -3'

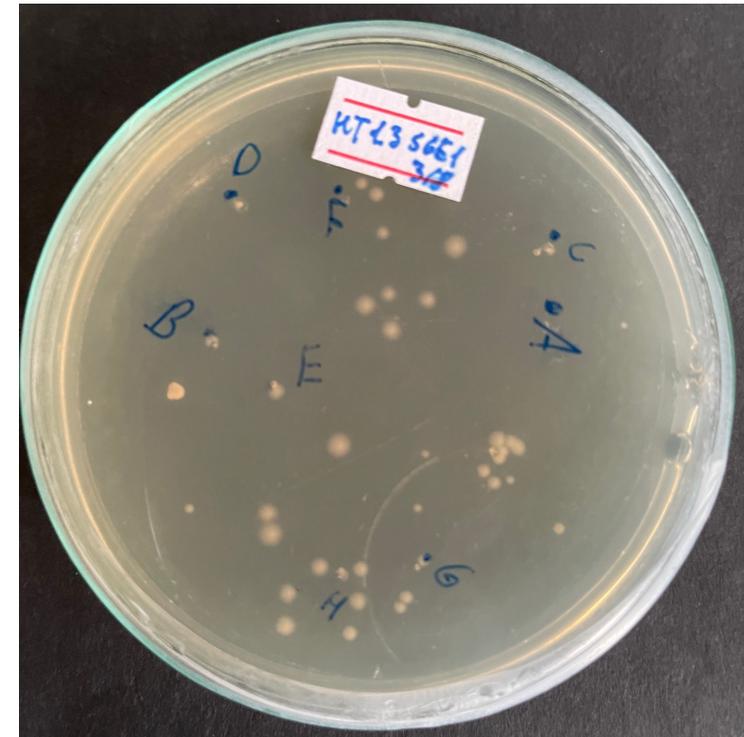
Extracción de plásmido

Figura 16. Electroforesis del plásmido plásmido pSB1C3_A593 + SGE1 extraído



Transformación bacteriana en *E. coli* HT115

Figura 17. Cultivo puro de *E. coli* HT115 transformado con el plásmido ensamblado

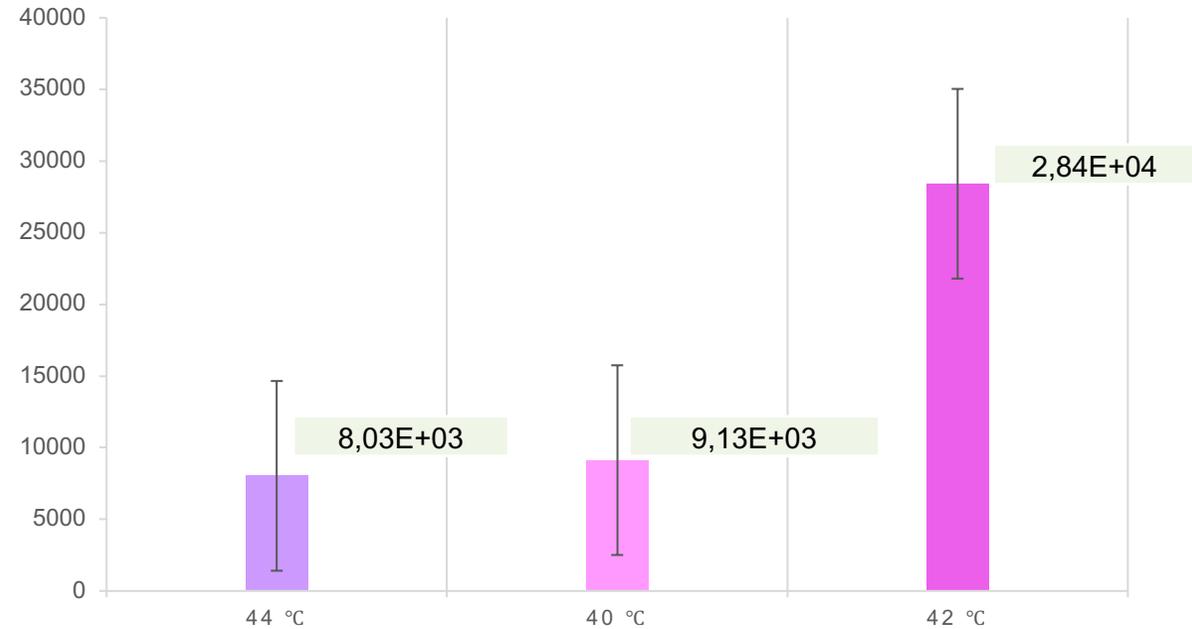


Análisis estadístico

Tabla 2. ANOVA para la eficiencia de transformación

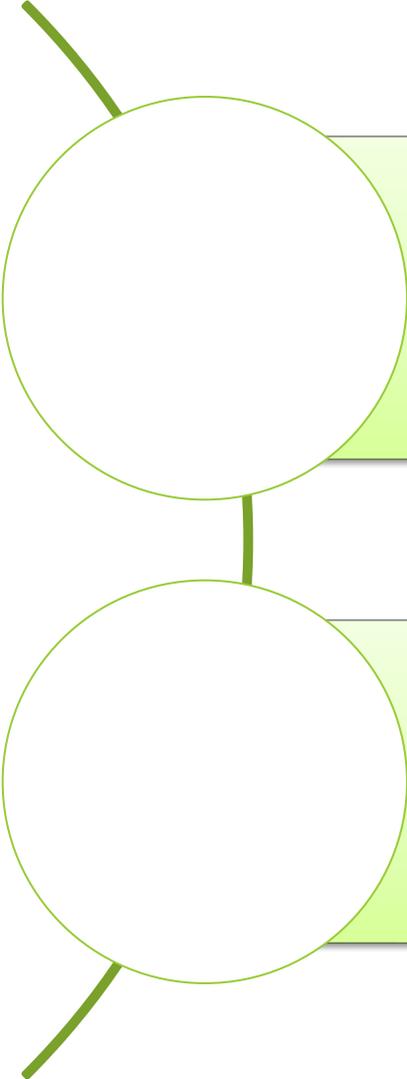
F. V.	G. L	S. C.	C. M.	F	F (0,95)	p-valor
Tratamiento	2	1,58E+09	7,89E+08	6,92	3,68	0,0074
Error	15	1,71E+09	1,14E+08			
Total	17	3,29E+09				

Figura 18. Temperatura de choque térmico vs Eficiencia de transformación



CONCLUSIONES

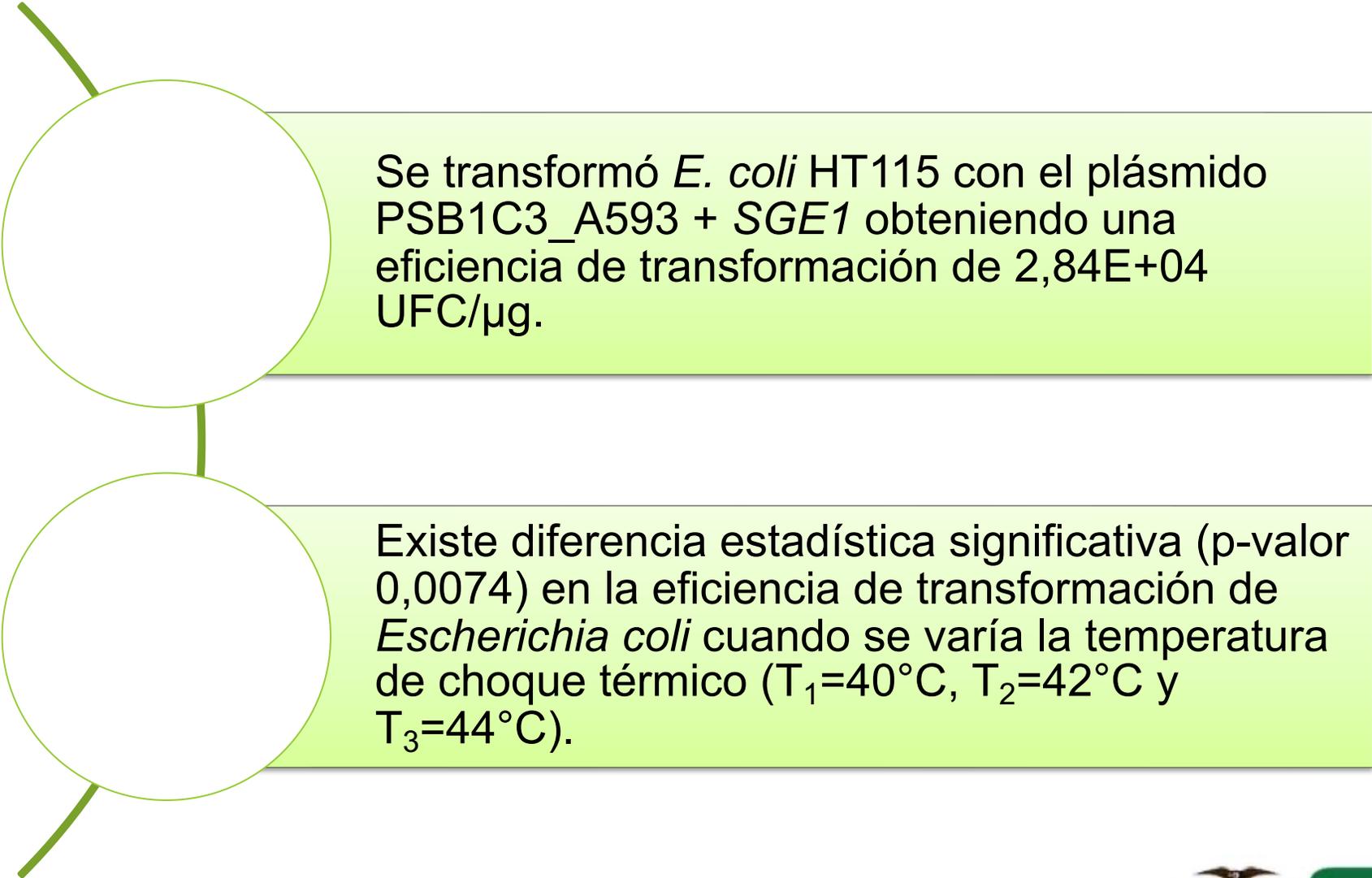




Mediante la técnica de overhang PCR se pudo obtener un amplicón del gen *SGE1*, este contiene en los extremos los sitios de corte de las enzimas de restricción.

Se llevó a cabo el ensamblaje del plásmido pSB1C3_A593 + *SGE1* para la producción de dsRNA, el cual requirió un mayor tiempo de incubación que el recomendado por los fabricantes en las etapas de digestión y ligación, además, el tamaño del plásmido ensamblado coincide con el modelo *in silico*.

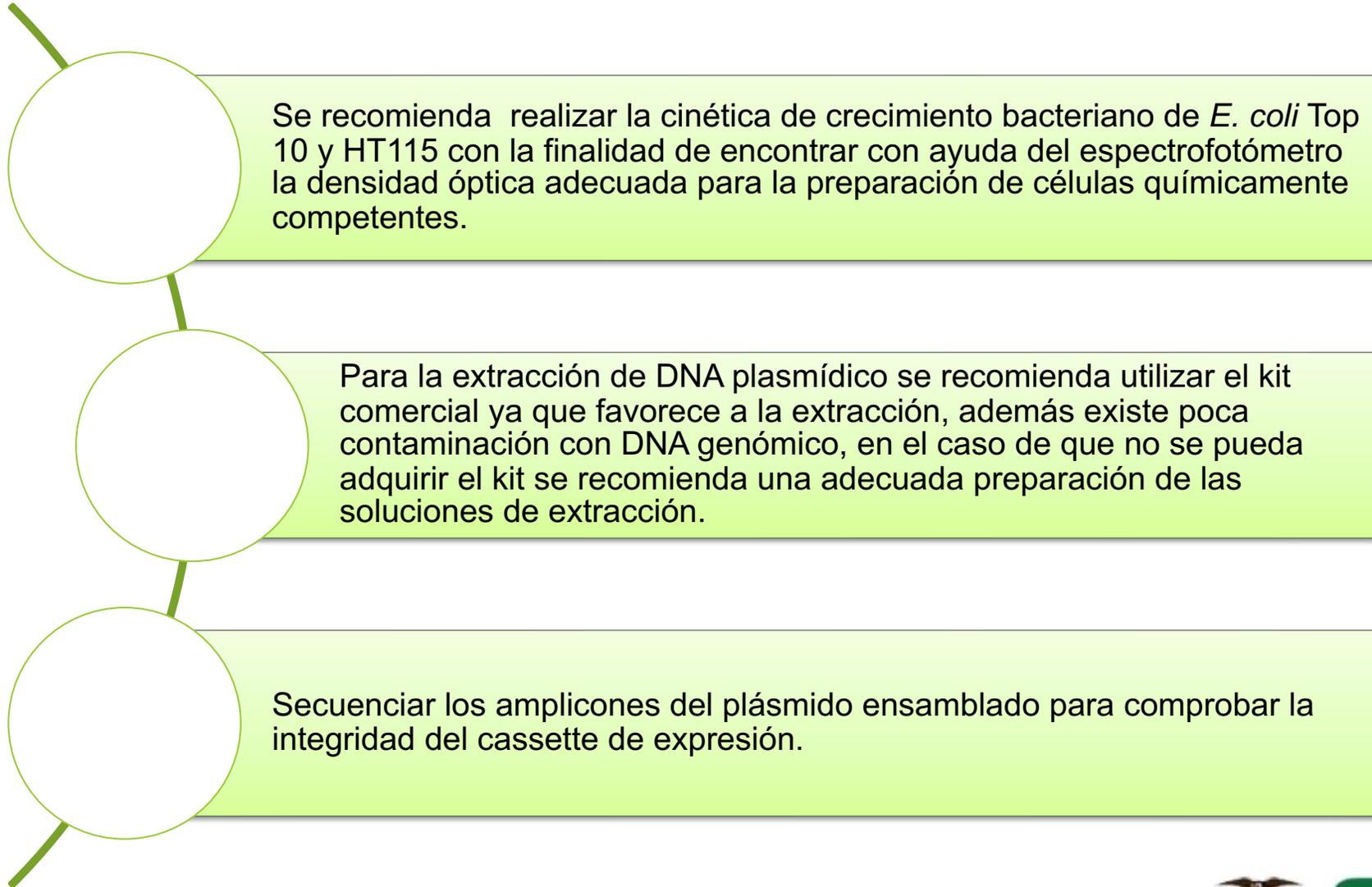




Se transformó *E. coli* HT115 con el plásmido PSB1C3_A593 + *SGE1* obteniendo una eficiencia de transformación de $2,84E+04$ UFC/ μ g.

Existe diferencia estadística significativa (p-valor 0,0074) en la eficiencia de transformación de *Escherichia coli* cuando se varía la temperatura de choque térmico ($T_1=40^{\circ}\text{C}$, $T_2=42^{\circ}\text{C}$ y $T_3=44^{\circ}\text{C}$).







Francisco Flores, Ph.D.
Director del proyecto
Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE

Laboratorio de diagnostico molecular Idgen



Grupo iGEM Ecuador y su proyecto
Agrobactory 593



Familia y amigos