

Resumen

El banano (*Musa spp.*), perteneciente a la familia *Musaceae*, es un alimento básico para más de 400 millones de personas. Más del 40% de la producción mundial de bananos y el comercio de exportación se basa en la variedad Cavendish. Sin embargo, Cavendish está amenazado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical raza 4 (FocR4T), que es una cepa virulenta que invade las raíces y posteriormente coloniza y obstruye el sistema vascular, lo que conduce a la muerte de la planta. En ese sentido, el objetivo del presente trabajo es construir un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RPM1, relacionado con resistencia a la fusariosis producida por FocR4T. La estrategia implementada se basa en el diseño *in silico* del vector plasmídico y el ensamblaje *in vitro* del plásmido mediante clonación modular (MoClo) basado en la técnica de Golden Gate. Mediante SnapGene™ fue posible simular el ensamblaje de estas partes y predecir su funcionalidad. Posteriormente, se procedió al ensamblaje *in vitro* del vector plasmídico, a partir del uso de las enzimas BsaI y BbsI. Mediante esta metodología, fue posible obtener un vector plasmídico funcional que contenga el sgRNA, el promotor TaU3, nucleasa SpCas9 y un marcador de selección en plantas.

La transformación en *Escherichia coli* evidenció una mayor eficiencia en la cepa JM109 en comparación a TOP10 y DH5α. La herramienta bioinformática CRISPOR facilitó el diseño de un ARN guía altamente específico, con una efectividad de al menos 97% y un máximo de 8 sitios secundarios predichos. Además, mediante pruebas de validación, como Colony PCR, fue posible validar con precisión el ensamblaje del vector. Estos hallazgos respaldan la viabilidad tanto del ensamblaje de plásmidos mediante Golden Gate, así como de la transformación en *E. coli.*, además de que abren nuevas perspectivas con respecto a la investigación e implementación de la edición genética dirigida a la resistencia a enfermedades en cultivos de interés agronómico como el banano.

Palabras clave: Vector plasmídico, FocR4T, RPM1, Golden Gate.

Abstract

Banana (*Musa spp.*), belonging to the *Musaceae* family, is a staple food for more than 400 million people. More than 40% of the world's banana production and export trade is based on the Cavendish variety. However, Cavendish is threatened by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (FocR4T), a virulent strain that invades the roots and colonizes and clogs the vascular system, leading to plant death. In this sense, the objective of the present work is to construct a plasmid vector for gene editing of the RPM1 gene promoter, related to resistance to fusarium disease caused by FocR4T.

The strategy implemented is based on the in silico design of the plasmid vector and the in vitro assembly of the plasmid by modular cloning (MoClo) based on the Golden Gate technique. Using SnapGene™ it was possible to simulate the assembly of these parts and predict their functionality. Subsequently, the plasmid vector was assembled in vitro using BsaI and BbsI enzymes.

This methodology made it possible to obtain a functional plasmid vector containing the sgRNA, the TaU3 promoter, SpCas9 nuclease, and a selection marker in plants.

Transformation in *Escherichia coli* evidenced higher efficiency in strain JM109 compared to TOP10 and DH5 α . CRISPOR bioinformatics tool facilitated the design of a highly specific guide RNA, with an effectiveness of at least 97% and a maximum of 8 predicted secondary sites. In addition, validation tests, such as Colony PCR, made it possible to accurately validate the vector assembly. These findings support the feasibility of both Golden Gate plasmid assembly and transformation in *E. coli*, as well as open new perspectives regarding the research and implementation of gene editing aimed at disease resistance in crops of agronomic interest such as banana.

Keywords: Plasmid vector, FocR4T, RPM1, Golden Gate.