



**Construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen
RPM1 asociado a la resistencia de fusariosis en banano**

Brun Velásquez, Jesús Andrés

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 Biotecnólogo.

Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

29 de agosto del 2023



Plagiarism report

Tesis Jesus Brun.txt

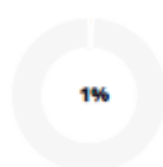
Scan details

Scan time:
August 26th, 2023 at 1:16 UTC

Total Pages:
64

Total Words:
15779

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.2%	34
Minor Changes	0.1%	13
Paraphrased	0.7%	104
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

Plagiarism Results: (6)

T5779e.pdf 0.5%

<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/37963/1...>

PORTADA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD DE CONTABILIDAD Y AUDITORÍA CARRERA DE ECONOMÍA Proyecto de Investigación, previo a la...

First report of Fusarium wilt of Cavendish bananas ... 0.2%

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37340554/>

This site needs JavaScript to work properly. Please enable it to take advantage of the complete set o...

Marchitez por Fusarium raza tropical 4: Estado actu... 0.1%

<https://www.redalyc.org/journal/437/43761812020/html/>

Revisión bibliográfica Marchitez por Fusarium raza tropical 4: ...





Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RPM1 asociado a la resistencia de fusariosis en banano" fue realizado por el señor Brun Velásquez, Jesús Andrés, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 13 de septiembre del 2023



FRANCISCO JAVIER
FLORES FLOR

.....
Flores Flor, Francisco Javier

C.C.: 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo **Brun Velásquez, Jesús Andrés**, con cédula de ciudadanía N° 1724723042, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RPM1 asociado a la resistencia de fusariosis en banano** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 13 de septiembre del 2023

Brun Velásquez Jesús Andrés

C.C.: 1724723042



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Brun Velásquez, Jesús Andrés** con cédula de ciudadanía N° 1724723042, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RPM1 asociado a la resistencia de fusariosis en banano**. en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 13 de septiembre del 2023

Brun Velásquez Jesús Andrés

C.C.: 1724723042

Dedicatoria

Dedico este trabajo a Dios y mi querida familia, cuyo apoyo y aliento inquebrantables han sido los pilares de mi trayectoria académica. A mis padres, que han sacrificado tanto para brindarme un sinfín de oportunidades, les estaré siempre agradecido por creer en mí y por inculcarme una profunda pasión por el conocimiento, así como a mi hermano, por su constante motivación y comprensión; este logro no habría sido posible sin el amor, la paciencia y la orientación que me han brindado. También quiero expresar mi más sincera gratitud a mi tutor, cuya experiencia y orientación han sido inestimables para dar forma al curso de mi investigación. Su tutoría no sólo me ha supuesto un reto intelectual, sino que también me ha inspirado para alcanzar nuevas cotas. Por último, expreso mi sincero agradecimiento a todos los participantes y colaboradores que han compartido generosamente sus ideas y experiencias para este estudio. Su colaboración ha enriquecido mi trabajo y ha contribuido al avance del conocimiento en este campo. Esta tesis está dedicada a todos los que han contribuido a mi crecimiento académico y personal.

Agradecimientos

A mi familia, por ser mi soporte en cada paso que he dado cuyo amor incondicional y apoyo inquebrantable han sido la fuerza impulsora detrás de mi educación y logros académicos. A mis padres Jesús Brun y Mercedes Velásquez y mi hermano Jesús Javier, que han sido mi fuente de inspiración; con su comprensión y aliento constante a lo largo de este arduo pero gratificante viaje. Su respaldo incondicional ha sido mi mayor motivación.

Al Ph.D. Francisco Flores, por permitirme realizar este trabajo de titulación bajo su mentoría, consejos y su guía, en adición a su disponibilidad de tiempo, y colaboración para resolver problemas dados a lo largo de la elaboración de la investigación. De igual manera a Lic. Silvana Granda, por su apoyo brindado en las actividades de laboratorio.

Al Ing. Borys León, que generosamente brindó de su tiempo y experiencia para este estudio, su contribución ha enriquecido este trabajo y ha ampliado nuestro entendimiento en este campo de investigación.

Al Dr. Antonio Bustamante, por permitirme ser parte de este proyecto y aportar con mis conocimientos y descubrimientos al mismo.

A mis amigos y compañeros, que estuvieron conmigo a lo largo de la carrera y me apoyaron cada vez que necesité su ayuda, por estar a mi lado en los momentos difíciles y celebrar conmigo en los triunfos.

A todos los profesores, mentores y profesionales en este campo de estudio que han compartido su conocimiento y han dejado una huella duradera en mi formación académica y desarrollo profesional.

A la Carrera de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, y al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIAP, por abrirnos la oportunidad de formar parte de este proyecto.

Índice de contenido

Informe de originalidad	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenido.....	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	12
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Formulación del problema	16
Justificación del problema	17
Objetivos	20
<i>Objetivo general</i>	20
<i>Objetivos específicos</i>	20
Hipótesis	20
Capítulo II: Marco teórico.....	21
Banano (<i>Musa spp.</i>).....	21
Fusariosis en <i>Musa spp.</i>	22
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> tropical raza 4 (<i>FocR4T</i>).....	23
Gen RPM1	24
Desarrollo de cultivares resistentes a <i>FocR4T</i>	25
Técnica CRISPR-Cas9	25
ARN guía (sgRNA).....	27

Vectores plasmídicos.....	29
Ensamblaje Golden Gate (MoClo).....	30
Transformación	32
Capítulo III: Metodología.....	33
Zona de estudio	33
Procedimiento <i>in silico</i>	33
Identificación del gen RPM1 en <i>Musa acuminata</i>	33
Caracterización de la región promotora putativa RPM1 en <i>M. acuminata</i>	34
Diseño de sgRNA orientados a los promotores putativos del gen RPM1	34
Ensamblaje in silico mediante (MoClo)	34
Procedimiento <i>in vitro</i>	36
Hibridación (annealing) de oligonucleótidos del sgRNA de RPM1.....	37
Siembra de <i>E. coli</i> portadoras de plásmidos.....	37
Extracción de ADN Plasmídico.....	37
Reacción in vitro de corte y ligación Golden Gate (GG).....	39
Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	40
Transformación de células competentes por choque térmico	41
PCR de Colonia (Colony PCR).....	43
Diseño Experimental.....	45
Modelo Estadístico.....	45
Tratamientos	45
Unidades Experimentales.....	46
Variables	46
Hipótesis	46
Capítulo IV: Resultados	47
Resultados <i>in silico</i>	47
Identificación del gen RPM1 en <i>Musa acuminata</i>	47
Diseño de sgRNA dirigidos a los posibles promotores de RPM1 en <i>M. acuminata</i>	48

Ensamblaje in silico mediante clonación modular (MoClo)	48
Resultados <i>in vitro</i>	53
Hibridación (annealing) de oligonucleótidos del sgRNA de RPM1.....	53
Siembra de <i>E. coli</i> portadoras de plásmidos.....	53
Extracción de ADN plasmídico	55
Siembra de <i>E. coli</i> transformadas	58
Colony PCR	61
Extracción de ADN plasmídico de las células de <i>E. coli</i> transformadas	63
Eficiencia de transformación (ET)	67
Diseño experimental	68
Capítulo V: Discusión	71
Conclusiones.....	79
Recomendaciones	81
Bibliografía	83
Apéndices	96

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Plásmidos utilizados para el ensamblaje de MoClo por niveles</i>	34
Tabla 2 <i>Componentes para la reacción de corte y ligación para el Nivel 0 (L0)</i>	39
Tabla 3 <i>Componentes para la reacción de corte y ligación para el Nivel 1 (L1)</i>	39
Tabla 4 <i>Componentes para la reacción de corte y ligación para el Nivel 2 (L2)</i>	40
Tabla 5 <i>Condiciones de reacción de la PCR</i>	43
Tabla 6 <i>Condiciones de la Colony PCR en el Termociclador para los diferentes niveles de ensamblaje</i>	44
Tabla 7 <i>Primers utilizados en la reacción de PCR en cada nivel de ensamblaje</i>	45
Tabla 8 <i>Resultados del mapeo de la secuencia del gen RPM1 en BLASTN</i>	47
Tabla 9 <i>ARN guías sintetizados dirigidos al promotor putativo del gen RPM1</i>	48
Tabla 10 <i>Cuantificación de ADN plasmídico utilizando el protocolo del Miniprep PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit</i>	55
Tabla 11 <i>Cuantificación de ADN plasmídico utilizando el protocolo casero de lisis alcalina</i> ...56	
Tabla 12 <i>Cuantificación del ADN plasmídico del constructo L0 extraído mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM™, basado en Sambrook, et al., (1989)</i>	64
Tabla 13 <i>Cuantificación del ADN plasmídico del constructo L1 extraído mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM™, basado en Sambrook, et al., (1989)</i>	65
Tabla 14 <i>Cuantificación del ADN plasmídico del constructo L2 extraído mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM™, basado en Sambrook, et al., (1989)</i>	66
Tabla 15 <i>Eficiencia de transformación de E. coli DH5α en relación a la inserción del constructo ensamblado de nivel 0 (L0)</i>	67
Tabla 16 <i>Eficiencia de transformación de E. coli DH5α en relación a la inserción del constructo ensamblado de nivel 1 (L1)</i>	67
Tabla 17 <i>Eficiencia de transformación de E. coli DH5α, JM109 y TOP10 en relación a la inserción del constructo ensamblado de L2</i>	68

Índice de figuras

Figura 1 Sistema CRISPR-Cas9	27
Figura 2 Esquema del Ensamblaje MoClo	31
Figura 3 Esquema general de la metodología realizada in silico para la construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RPM1	33
Figura 4 Esquema general de la metodología realizada in vitro para la construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RPM1	36
Figura 5 Protocolo de extracción de ADN plasmídico basado en lisis alcalina propuesto por iGEM™	38
Figura 6 Trasformación de células químicamente competentes por choque térmico.....	44
Figura 7 PCR Colony empleando DreamTaq Green PCR Master Mix.....	43
Figura 8 Oligonucleótidos alineados sgRNA1 RPM1.....	48
Figura 9 Plásmido ensamblado L0.....	49
Figura 10 Plásmido ensamblado L1	50
Figura 11 Plásmido ensamblado L2	51
Figura 12 Mapa completo del ensamblaje in silico mediante clonación modular (MoClo)	52
Figura 13 Comprobación de la hibridación de los sgRNA complementarios de RPM1	53
Figura 14 E. coli con plásmido pICH47751 sembrado en agar LB, con X-gal, IPTG y Amp. ..	54
Figura 15 E. coli con plásmido pFH114 sembrado en agar LB, con X-gal, IPTG y Amp.....	54
Figura 16 Electroforesis gel agarosa al 2% TAE de los plásmidos extraídos mediante un protocolo casero de lisis alcalina propuesto por iGEM™.....	57
Figura 17 Electroforesis gel agarosa al 1,5% TAE de la extracción del plásmido H7 mediante el Kit Miniprep PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification.	58
Figura 18 E. coli DH5α con plásmido ensamblado L0 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Kanamicina (100 mg/mL).....	59
Figura 19 E. coli DH5α con plásmido ensamblado L1 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Ampicilina (100 mg/mL)	59

Figura 20 <i>E. coli</i> DH5 α con plásmido ensamblado L2 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Kanamicina (100 mg/mL).....	60
Figura 21 <i>E. coli</i> JM109 con plásmido ensamblado L2 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Kanamicina (100 mg/mL).....	60
Figura 22 <i>E. coli</i> TOP10 con plásmido ensamblado L2 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Kanamicina (100 mg/mL).....	61
Figura 23 Confirmación de la transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con el plásmido ensamblado de L1 a través de una PCR de colonia.....	62
Figura 24 Confirmación de la transformación de <i>E. coli</i> DH5 α , JM109 y TOP10 con el plásmido ensamblado de L2 a través de una PCR de colonia.....	63
Figura 25 Electroforesis gel agarosa al 1.5% de Buffer TAE del plásmido L0 extraído mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM TM	64
Figura 26 Electroforesis gel agarosa al 1% de Buffer TAE del plásmido L1 extraído mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM TM	65
Figura 27 Electroforesis gel agarosa al 1% de Buffer TAE del plásmido L2 extraído de <i>E. coli</i> DH5 α , JM109 y TOP10 mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM TM	66
Figura 28 Análisis de varianza (ANOVA), respecto a la eficiencia de transformación en las cepas Top10, DH5 α y JM109 de <i>E. coli</i>	69
Figura 29 Gráfico de barras de la media y desviación estándar (SD) de la eficiencia de transformación de las tres repeticiones en las cepas TOP10, DH5 α y JM109 de <i>E. coli</i>	70

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 DH5 α . 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.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

El banano (*Musa spp.*) es un género de plantas con flores tropicales y subtropicales que se conocen comúnmente como plátanos o bananos, siendo un alimento básico para más de 400 millones de personas, estas pertenecen a la familia *Musaceae* y son nativas del sudeste asiático y las islas del Pacífico. El género incluye variedades comestibles y ornamentales, siendo las variedades más cultivadas el banano dulce y el plátano (Perrier et al., 2011). Más del 40% de la producción mundial y el comercio de exportación se basa en el banano Cavendish. Adicionalmente, *Musa AAA* representa el 10% de las exportaciones ecuatorianas en valor y más del 6% de la producción mundial de banano, siendo Ecuador el mayor exportador mundial de banano, con cerca de un tercio de los envíos mundiales en 2021 (Macarof et al., 2022).

Sin embargo, el banano Cavendish está amenazado por un hongo virulento, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical raza 4 (FocR4T) (Dale et al., 2017), que es una cepa particularmente virulenta que invade las raíces del banano y posteriormente coloniza y obstruye el sistema vascular, lo que conduce a un marchitamiento severo y finalmente a la muerte de la planta (Ahmad et al., 2020). El hongo es difícil de controlar ya que puede persistir en el suelo por más de 30 años, y es resistente a muchos fungicidas (Warman & Aitken, 2018).

Además, FocR4T se puede propagar a través del suelo, agua, herramientas y materiales vegetales contaminados. Para evitar la propagación de FocR4T, a menudo se destruyen las plantas y el suelo afectados (Aguayo et al., 2021). Debido a que FocR4T puede sobrevivir en el suelo, las personas o los equipos que transportan suelo contaminado, lo propagan fácilmente y actualmente no existe un control químico o biológico efectivo para FocR4T (Dita et al., 2018). Como los bananos cultivados comercialmente son estériles, no es posible utilizar métodos de cruzamiento convencionales para desarrollar resistencia a este hongo. Por lo tanto, es necesario desarrollar variedades modificadas genéticamente con resistencia a FocR4T.

El gen RPM1 codifica una proteína que pertenece a la familia de proteínas de unión a nucleótidos de repeticiones ricas en leucina (LRR), que están involucradas en la inmunidad de las plantas. De esta forma, RPM1 funciona como un sensor que detecta moléculas específicas producidas por bacterias patógenas y desencadena una respuesta inmunitaria que puede limitar la propagación de la infección. Así, cuando se detecta un patógeno, la proteína RPM1 desencadena una cascada de reacciones bioquímicas que conducen a la activación de otros genes relacionados con el sistema inmunitario, la producción de compuestos antimicrobianos y la muerte de las células vegetales infectadas para evitar la propagación de la infección (Grant et al., 2000). De acuerdo a Zhao et al., (2021), el gen de resistencia RPM1 se ha estudiado como modelo para comprender la inmunidad de las plantas y como un objetivo potencial para programas de mejoramiento de cultivos que buscan desarrollar cultivos resistentes a enfermedades.

Métodos tradicionales, han logrado mejorar la resistencia a la marchitez por *Fusarium* en cultivos, como en *Phaseolus vulgaris* L. Sin embargo, en el caso de *Musa* spp., los métodos convencionales de cruzamiento para desarrollar resistencia aún no han dado resultados satisfactorios, ya que el cruce convencional es un proceso lento y puede tomar muchos años desarrollar una nueva variedad que sea resistente a *Fusarium* spp., debido a que el rasgo deseado, como lo es la resistencia a este hongo, debe estar presente en ambos progenitores del cruce (Wang et al., 2021). Además, algunos métodos tradicionales como el control químico por medio de la aplicación a fumigantes en el suelo, pueden suponer riesgos medioambientales y dañar los microbios beneficiosos del suelo (Kaiser et al., 2020). Por lo tanto, se necesitan tecnologías modernas que mejoren los métodos convencionales para resolver estas limitaciones (Franco-Duarte et al., 2019).

Justificación del problema

Abordar la resistencia a *Fusarium* es importante, ya que la marchitez producida por este patógeno representa una amenaza para la producción mundial de plátanos, donde la fusariosis puede afectar a la disponibilidad y asequibilidad de los plátanos para los consumidores, lo que podría tener un impacto significativo en la seguridad alimentaria en

algunas regiones. Por lo tanto, mejorar la resistencia a esta enfermedad es crucial para garantizar la sostenibilidad y la seguridad del suministro de *Musa* spp., así como para apoyar los medios de subsistencia de los productores de banano.

La marchitez provocada por *Fusarium* spp., puede provocar la pérdida total de la cosecha, lo que puede ser devastador para pequeños y medianos productores de banano que dependen de este cultivo para su subsistencia (Dita et al., 2018). De acuerdo a Staver et al., (2020), se estima que el impacto económico de la marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical raza 4 (FocR4T) en la industria bananera mundial podría alcanzar los 121.000 millones de dólares en un periodo de 10 años. Por lo tanto, sin medidas de control eficaces, FocR4T podría seguir amenazando la sostenibilidad del suministro mundial de *Musa* spp. y el bienestar económico de los productores a nivel mundial (Blomme et al., 2017).

La edición genética mediante el uso de un vector plasmídico, puede abordar potencialmente las limitaciones en la resistencia a *Fusarium*, ya que permite realizar modificaciones precisas en el genoma de la planta, centrándose específicamente en genes que desempeñan un papel en la susceptibilidad a la enfermedad (Zaidi et al., 2020). Mediante el uso de ARN guía (sgRNA) y las herramientas de edición genética como CRISPR-Cas9, es posible la modificación precisa del promotor RPM1 para mejorar la resistencia del plátano a *Fusarium* sp. Este enfoque puede conducir a soluciones de mayor especificidad y eficacia, dejando atrás los efectos potencialmente dañinos de las prácticas tradicionales de mejora genética (Borrelli et al., 2018).

Además, CRISPR-Cas9 se ha utilizado para diseñar plantas con mayor resistencia a varios patógenos, al hacer posibles modificaciones precisas en el ADN de una planta, incluida la inserción, eliminación o sustitución de genes específicos. De acuerdo a Yin et al., (2015), se usó CRISPR-Cas9 para modificar el genoma de una planta de banano Cavendish e introducir un gen de resistencia a FocR4T, mediante lo cual, se contr(Zhang et al., 2022)oló la proliferación del hongo, por lo que se centraron en la identificación de genes que están implicados en la respuesta inmunitaria de la planta a FocR4T y en el uso de CRISPR-Cas9 para modificar estos genes y mejorar la resistencia de la planta.

De esta forma, la edición genética supera las barreras reproductivas y la incompatibilidad genética que se encuentra al transferir genes de especies silvestres a variedades comerciales de banano. Al utilizar un sgRNA, es posible dirigir la edición genética directamente en las variedades de banano existentes, evitando la necesidad de cruzamientos complejos y largos periodos de selección (Zhang et al., 2022). A diferencia de la hibridación convencional, que puede llevar a una disminución de la diversidad genética, la edición genética permite mantener las características deseables de las variedades comerciales mientras se introduce la resistencia a la fusariosis (Tripathi et al., 2021). Al utilizar un ARN guía y una endonucleasa, como la Cas9, se puede dirigir la edición hacia la región promotora del gen RPM1, responsable de la resistencia a la fusariosis, lo cual implica que solo se realizan cambios en el promotor de dicho gen, dejando intacta la secuencia de otros genes y regiones del genoma del banano (Vuong et al., 2023). De esta manera, se puede introducir la resistencia a la fusariosis en variedades comerciales de banano sin comprometer sus características agronómicas, como el sabor, la textura, el tamaño y la calidad de los frutos (Ntui et al., 2020), siendo crucial para garantizar la aceptación de las variedades mejoradas por parte de los productores y consumidores, así como para mantener la continuidad de la cadena de suministro y el mercado generado a partir de la producción de *Musa spp.*

Así, la fusariosis en el banano causada por FocR4 es una preocupación creciente a nivel mundial, ya que esta enfermedad puede causar graves pérdidas económicas y afectar la estabilidad del suministro global de este cultivo. Mediante la construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RPM1, se abre la posibilidad de abordar las limitaciones actuales en la mejora de la resistencia a esta enfermedad. En consecuencia, el presente trabajo es esencial para abordar esta problemática en cuestión, así como para contribuir, a través de la biotecnología, al desarrollo de estrategias más efectivas y sostenibles para el control y erradicación de enfermedades dentro del sector agrícola.

Objetivos

Objetivo general

Construir de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RPM1 asociado a la resistencia de fusariosis en banano.

Objetivos específicos

- Diseñar un ARN guía dirigido a la región promotora del gen RPM1 de banano.
- Ensamblar un plásmido que contenga la secuencia del ARN guía diseñado, una nucleasa y un promotor para monocotiledóneas.
- Transformar cepas de *Escherichia coli* con el plásmido ensamblado.

Hipótesis

Existen diferencias significativas en la eficiencia de transformación de diferentes cepas de *Escherichia coli* con el plásmido ensamblado conteniendo al ARN guía complementario a la región promotora del gen RPM1.

Capítulo II: Marco teórico

Banano (*Musa spp.*)

Musa spp. incluye varias especies de banano (*Musa AAA*) y plátano (*Musa AAB*), siendo las especies más comunes *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, que son los principales ancestros de las variedades cultivadas de banano (Torres Bedoya et al., 2021). A partir de estas especies, se han desarrollado numerosos cultivares y variedades híbridas con características específicas en cuanto a tamaño, forma, color y sabor de los frutos (Sardos et al., 2016). Además, cabe destacar que dentro del género *Musa*, existen alrededor de 1.000 variedades de bananos producidos y consumidos a nivel mundial, pero el más comercializado es el banano tipo Cavendish (Padam et al., 2014).

La producción global promedio de banano aumentó a 115 millones de toneladas en el periodo de 2019 a 2022, lo cual expresa un valor aproximado de 40 mil millones de dólares. Entre 2000 y 2022, la producción mundial de bananas creció a una tasa anual compuesta del 3,2 %, alcanzando un récord de 138 millones de toneladas en 2019. Según FAOSTAT (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), la producción mundial de banano alcanzó aproximadamente 116 millones de toneladas métricas en 2021 (Bonavita, 2022). En promedio, más del 90 % de los bananos para exportación provienen de América Central y del Sur y Filipinas, siendo los mayores importadores la Unión Europea, Estados Unidos, China, Rusia y Japón (Birt et al., 2022).

Por otro lado, según los datos disponibles del Ministerio de Agricultura y Ganadería, Ecuador exportó 325.496.680 cajas de banano (22,5 kg/caja) en el primer semestre de 2021, lo que generó 1.278 millones de dólares en ingresos y dio un total de 6.684.916 toneladas para ese año, convirtiendo a Ecuador en uno de los mayores productores y exportadores de banano del mundo, con la mayoría de sus bananos cultivados para la exportación (Macarof et al., 2022). Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos, en 2019 había 511.146 hectáreas de cultivos de banano en Ecuador. Las provincias con mayor producción de banano son Los Ríos, Guayas y El Oro (Anchundia et al., 2021). Además, existen esfuerzos a

nivel nacional para la transición de la producción de banano a prácticas orgánicas y para mejorar la sostenibilidad de la industria (Alzate Acevedo et al., 2021; Castro et al., 2015).

Fusariosis en *Musa* spp.

La fusariosis es una enfermedad fúngica que conduce a la marchitez vascular y afecta a muchas especies de plantas, incluidos los cultivos alimentarios económicamente importantes, como papas, tomates, legumbres, melones y plátanos. La enfermedad es causada por *Fusarium oxysporum*, que habita en el suelo, siendo capaz de prosperar a temperaturas del suelo superiores a 24 °C y vivir indefinidamente en el suelo sin acceso a plantas hospederas vivas (Arie, 2019). Los síntomas de la enfermedad incluyen el amarilleo y la desecación de las hojas inferiores, el marchitamiento de las raíces y, en última instancia, la muerte de la planta. La enfermedad de *Fusarium* es difícil de controlar, causando pérdidas económicas en la agricultura (Nucci & Anaissie, 2007). El hongo puede introducirse en trasplantes infectados o propagarse en equipos contaminados con suelo infestado. La propagación del patógeno se puede controlar de alguna manera mediante el uso de semillas limpias y la eliminación de los tejidos de plantas infectadas del área, aunque las estrategias de manejo más efectivas involucran el uso de cultivares resistentes a enfermedades y la aplicación de fungicidas (Dita et al., 2018).

La fusariosis en el banano (*Musa* spp.), es causada por el hongo transmitido por el suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). La enfermedad se considera devastadora para este género, ya que los plátanos se propagan asexualmente, lo que los hace genéticamente uniformes y, por tanto, susceptibles a la enfermedad, que puede propagarse fácilmente a través del suelo contaminado y los materiales de propagación (Pegg et al., 2019). El primer brote de marchitez por *Fusarium* causado por la Raza 1 que afectó la producción comercial de plátanos *Gros Michel* en la década de 1950 (Dita et al., 2018). Por otro lado, la Raza 2 afecta a una variedad de variedades de banano, incluidas Silk, Bluggoe y Pelipita, provocando su marchitez y retraso en el crecimiento (Raman et al., 2021).

***Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* tropical raza 4 (FocR4T)**

Fusarium oxysporum f. sp. *cupense* tropical raza 4 (FocR4T), al igual que las otras variedades de Foc anteriormente descritas, es un hongo ascomiceto fitopatógeno de la familia *Nectriaceae*, que se identificó por primera vez en la década de 1990 en Taiwán, y desde entonces se ha extendido a varios países de Asia, África, Oriente Medio y Sudamérica (Bragard et al., 2022). Desde la década de 2010, un brote causado por FocR4T, amenaza la producción del plátano Cavendish (AAA), el cultivar de banano con mayor importancia comercial. Específicamente, dentro de la región, este patógeno ya ha sido reportado en Perú y Colombia, por lo que representa una amenaza para la seguridad alimentaria en Ecuador (Magdama et al., 2020).

FocR4T es fácilmente transmisible, presenta resistencia a fungicidas y capacidad para sobrevivir en ausencia de su huésped, lo cual dificulta su control, por lo que sigue siendo una amenaza para la industria bananera (Dale et al., 2017). De esta forma, la prevención y manejo de FocR4T implica el desarrollo de tecnologías para este objetivo, acompañadas de la identificación de prácticas de bioseguridad y manejo de suelos, a partir de la implementación de protocolos de cuarentena para evitar la introducción y propagación de FocR4T, lo cual incluye regular el movimiento de material de plantación, equipo y suelo de las áreas infectadas a las regiones no infectadas (Damodaran et al., 2020). Además, se considera tanto la rotación de cultivos, así como eliminar y destruir las plantas infectadas, parte de las estrategias de manejo para minimizar el impacto de FocR4T, no obstante, por medio de estas prácticas, la erradicación completa de la enfermedad es difícil una vez establecida (Bragard et al., 2022).

De esta forma, el desarrollo y búsqueda de cultivares de banano resistentes es una de las principales estrategias para el manejo de FocR4T, (Dita et al., 2018). Como ejemplo, dentro de estas medidas, Damodaran et al., (2020), propusieron el manejo biológico con el aislado fúngico antagonista CSR-T-3 (*Trichoderma reesei*) como una posible medida de control para FocR4T.

Gen RPM1

El gen RPM1 (Resistant to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1) es un gen de resistencia principalmente asociado a la resistencia de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* que producen una proteína efectora llamada AvrRpm1. La interacción entre la proteína AvrRpm1 y RPM1 desencadena una respuesta de defensa en la planta, lo que resulta en la resistencia a la infección por esta bacteria (Mackey et al., 2002). Este gen codifica una proteína NBS-LRR (Sitio de Unión a Nucleótidos, Repetición Rica en Leucina), que puede reconocer y conferir resistencia a patógenos portadores de Avr perteneciente a *Pseudomonas syringae* (Kim et al., 2009). El producto del gen RPM1 desencadena una respuesta de resistencia hipersensible (HR) tras el reconocimiento del (Gao et al., 2011). De esta forma, RPM1 interactúa con otras proteínas señalizadoras y componentes de la vía de señalización, como cinasas (proteínas quinasas), para transmitir la señal de activación y desencadenar la respuesta de defensa (Katagiri et al., 2002). Asimismo, este gen puede interactuar con otras proteínas reguladoras del sistema inmunológico de la planta, como las proteínas EDS1 (Susceptibilidad Mejorada a Enfermedades 1) y PAD4 (Fitoalexina Deficiente 4), las cuales forman parte de la red de señalización de defensa, y hacen posible la activación y regulación de la respuesta inmune (Yoon et al., 2022).

Además, se han investigado homólogos de RPM1 en otras especies vegetales, así como posibles modificaciones del gen para mejorar la resistencia a las enfermedades. De esta forma, se ha encontrado al gen RPM1 en el genoma del banano (*Musa* spp.) (W.-M. Li et al., 2020), lo cual podría dar lugar a desencadenar una respuesta de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical raza IV FocR4T por parte de la planta. En adición, (Li et al., 2012), determinaron que este gen participa en la codificación de proteínas que forman parte de la interacción planta-patógeno mediante la sobreexpresión del complejo RIN4/RPM1 en los cultivares de banano Cavendish, lo cual conduce a la activación de la proteína de resistencia RPM1 (Yoon et al., 2022).

Desarrollo de cultivares resistentes a FocR4T

Las herramientas para el desarrollo de cultivares resistentes a FocR4T incluyen tanto técnicas convencionales, así como de mejora genética mediante herramientas biotecnológicas como la edición y la transformación de genes (Wang et al., 2021). La mejora convencional implica la selección de rasgos deseables mediante la polinización cruzada de plantas con resistencia natural a la fusariosis, mientras que las herramientas biotecnológicas permiten una modificación más específica y precisa de los genes de las plantas para conferirles resistencia (Dong & Ronald, 2019). Así, mediante cultivo de tejidos y la regeneración de plantas *in vitro* es posible propagar y multiplicar de forma masiva de plantas seleccionadas con genes de resistencia a FocR4T. Por otro lado, la embriogénesis somática ofrece la posibilidad de obtener cultivares resistentes o tolerantes a FocR4T, por medio de la formación de embriones a partir de células del callo o tejido vegetal de *Musa* spp. (Bermúdez-Caraballoso et al., 2020).

Por otra parte, dentro de estas posibles herramientas de edición genética, se encuentra el desarrollo de marcadores moleculares, cuya finalidad consta en identificar y seleccionar plantas con genes de resistencia a FocR4T (Vuong et al., 2023). Además, las metodologías para secuenciar ADN, como la secuenciación de nueva generación (NGS), hacen posible el análisis y la comparación de los genomas de diferentes variedades de banano, con lo cual sería posible identificar regiones del genoma relacionadas con la resistencia a FocR4T y, a su vez, comprender los mecanismos de defensa de la planta (Martin et al., 2016). Por otro lado, las tecnologías de ingeniería genética y la edición de genomas, como CRISPR-Cas9, hacen posible introducir o modificar genes específicos en el genoma de *Musa* spp., y de esta forma, insertar genes de resistencia a FocR4T o alterar genes existentes para mejorar la tolerancia a esta enfermedad (Kumar et al., 2015).

Técnica CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 es una tecnología de edición del genoma que permite modificar secuencias de ADN (Redman et al., 2016). El Término CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas) o, hace referencia a una región específica de

ADN que desempeña un rol de defensa inmunitaria contra virus. Por otro lado, la endonucleasa Cas9 (Proteína 9 asociada a CRISPR) es una enzima que actúa como una tijera molecular y es guiada por una o varias moléculas de ARN para dirigirse a secuencias específicas de ADN, con lo cual se producirá un corte del ADN en la ubicación deseada. Así, es posible realizar ediciones precisas en el código genético de un organismo, como la inserción o eliminación de genes específicos (Asmamaw & Zawdie, 2021).

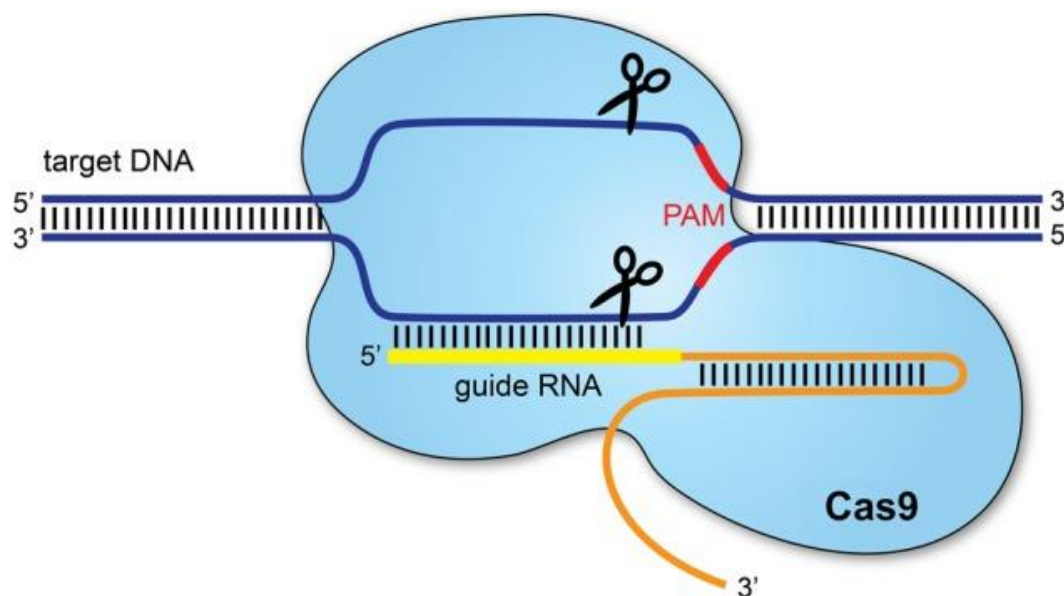
El sistema CRISPR-Cas9 funciona utilizando una molécula de ARN guía (sgRNA) diseñada para localizar una secuencia de ADN complementaria al mismo. El sgRNA orienta a la enzima Cas9 hasta el lugar específico del genoma que debe editarse, creando un complejo de ribonucleoproteína (RNP) Cas9-sgRNA. Una vez que la enzima Cas9 alcanza el sitio objetivo, por medio de un PAM (Protospacer Adjacent Motif) que permite la unión y la actividad de corte de esta enzima, que crea una rotura de doble cadena en el ADN (DSB), la cual activa los mecanismos naturales de reparación del ADN dentro de la célula, que pueden dar lugar a la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o a la reparación dirigida por homología (HDR) (Asmamaw & Zawdie, 2021). Cabe recalcar que, la secuencia PAM se encuentra inmediatamente adyacente a la secuencia de ADN diana que es reconocida por el sgRNA y a la que se dirige para su edición (Gleditsch et al., 2018). En la NHEJ, los extremos rotos del ADN se vuelven a unir, lo que da lugar a pequeñas inserciones o deleciones, que pueden alterar la función del gen afectado. La HDR, por el contrario, utiliza una plantilla de ADN exógena para introducir cambios o inserciones específicos en el lugar de destino, lo cual permite introducir las modificaciones genéticas deseadas o sustituir genes defectuosos por otros funcionales (Lieber, 2010).

De esta forma, el sistema CRISPR-Cas puede utilizarse para insertar genes de resistencia a fitopatógenos, dirigiéndose al genoma de la planta y ayudar a aumentar las defensas naturales de la planta y mejorar la resistencia a las enfermedades (Borrelli et al., 2018). El sistema permite realizar modificaciones específicas y precisas en el genoma, lo que posibilita la introducción de genes específicos de resistencia sin afectar negativamente a

otros aspectos, como el crecimiento o el desarrollo de la planta, con lo cual se podría controlar o erradicar la fusariosis producida por FocR4T en *Musa* spp. (Zaidi et al., 2020).

Figura 1

Sistema CRISPR-Cas9



Nota. La Cas9 es dirigida a su objetivo por un sgRNA, que se une al ADN genómico. Para cortar, se debe contar con una secuencia específica de ADN de entre 2 y 5 nucleótidos (PAM) en el extremo 3' del ARN guía. La reparación después del corte del ADN puede ocurrir a través de la unión de extremos no homólogos o reparación dirigida por homología. Adaptado de: Redman et al., (2016).

ARN guía (sgRNA)

En el sistema CRISPR-Cas9, el ARN guía (sgRNA) permite direccionar la endonucleasa Cas9 a lugares específicos del genoma. Para dirigirse a la región promotora del gen RPM1, se puede diseñar un sgRNA complementario a una secuencia específica dentro de esta región (Gilbert et al., 2014). El ARN guía consiste en una secuencia de ARN de 20 nucleótidos complementaria al ADN diana, llamada espaciador, seguida de una secuencia de ARN que se une a la proteína Cas9, conocida como protoespaciador (PAM) (Wang et al., 2019). Idealmente, el ARN guía debe ubicarse cerca del sitio deseado de

edición y debe ser específico para evitar efectos no deseados fuera del objetivo (Wu et al., 2014). En este caso el promotor de un gen suele estar ubicado en antes del inicio de la secuencia codificante del gen. En los organismos eucariotas, como las plantas, el promotor generalmente se encuentra en la región que abarca desde unos pocos cientos de pares de bases (pb) hasta varios miles de pb antes del sitio de inicio de la transcripción (Juvenger & Kadonaga, 2010)

Se pueden utilizar diferentes herramientas en línea para diseñar y optimizar la secuencia del ARN guía, como lo son CRISPRscan, Cas-OFFinder, CRISPR Design, CRISPOR y Benchling (Mohr et al., 2016); teniendo en cuenta factores como la especificidad de la secuencia diana, la posibilidad de efectos no deseados o sitios fuera de la diana (off-target), así como la formación de estructuras secundarias en el ARN guía para asegurar su eficiencia. Una vez diseñada y sintetizada la secuencia de sgRNA, puede transfectarse en células competentes junto con la endonucleasa Cas9, lo que permitiría la edición de la región promotora del gen RPM1 (Lino et al., 2018).

Una vez diseñado el ARN guía, se puede sintetizar *in vitro* y luego combinarlo con la enzima Cas9 para formar el complejo Cas9-ARN guía, el cual se dirige a la secuencia complementaria en la región promotora del gen RPM1. Al introducir este complejo Cas9-ARN guía en las células de interés, la secuencia complementaria del ARN guía se uniría al ADN objetivo en la región promotora del gen RPM1, siendo que el sgRNA se puede administrar en las células mediante técnicas de transformación, como electroporación, shock térmico, transfección o vectores virales (Liu et al., 2017).

Además, para establecer la secuencia de sgRNA, se debe evitar las regiones del genoma que sean repetitivas o tengan un alto contenido de guanina y citosina (G/C), ya que esto puede disminuir la eficacia de la nucleasa Cas9 (Asmamaw & Zawdie, 2021). De igual forma, es importante evitar la formación de estructuras secundarias en el ARN guía, como horquillas o bucles, que puedan interferir con su funcionalidad. Por otro lado, la longitud de la secuencia debe optimizarse para equilibrar la especificidad y la eficacia, ya que las

secuencias más largas pueden reducir la especificidad, pero aumentar la eficacia (Wu et al., 2014). Por último, el ARN guía debe tener una alta afinidad de unión al ADN objetivo para permitir una edición eficiente. Para esto, se pueden utilizar herramientas bioinformáticas y programas de diseño, como Geneious Prime y SnapGene, para predecir y evaluar la eficiencia de unión y seleccionar la secuencia del ARN guía (Mohr et al., 2016).

Vectores plasmídicos

Los vectores plasmídicos son moléculas de ADN circular de doble cadena, capaces de replicarse automáticamente en una célula huésped y servir de vehículo para la transferencia de secuencias de ADN recombinante. Generalmente, permiten la inserción de ADN exógeno en un objetivo bacteriano (Nora et al., 2018). Dentro del sistema CRISPR-Cas9, los plásmidos son utilizados para introducir y expresar la endonucleasa Cas9 y el ARN guía en células diana para la edición del genoma (Lino et al., 2018).

Los vectores plasmídicos suelen constar con un origen de replicación (*ori*), un marcador seleccionable o gen que codifica la resistencia a un agente selectivo, promotores y terminadores reguladores de la transcripción y expresión de los genes de interés, así como un sitio de clonación múltiple (MCS) que contiene sitios únicos de reconocimiento de enzimas de restricción donde se pueden insertar fragmentos de ADN. Adicionalmente, los plásmidos pueden contener genes informadores, etiquetas o promotores inducibles (Rosano & Ceccarelli, 2014). Los vectores plasmídicos de mayor importancia para de la edición y manipulación genética son los plásmidos de clonación y los plásmidos de expresión (Manna et al., 2013). Los plásmidos de clonación están diseñados para la manipulación y amplificación de genes, los cuales suelen contener un marcador seleccionable, un origen de replicación y múltiples sitios de clonación, mientras que los plásmidos de expresión, están diseñados para la expresión de un gen de interés en una célula huésped y suelen contener un promotor inducible, un marcador seleccionable y un sitio de clonación múltiple. Los plásmidos de expresión pueden diseñarse para la expresión génica constitutiva o inducible, lo que permite controlar el nivel de expresión génica (Nora et al., 2018).

En el contexto del sistema CRISPR-Cas9, los vectores plasmídicos se emplean ampliamente para introducir el ARN guía y la Cas9 en las células diana para la edición del genoma (Lino et al., 2018). Tras la transfección o transformación del vector plasmídico en las células diana, éstas expresan la nucleasa Cas9 y el sgRNA, guiando a la Cas9 al sitio donde se induce la rotura de la doble cadena. Seguido de esto, mediante el uso de la secuencia de ADN complementaria a la cromátida hermana u otro cromosoma homólogo, se repara la rotura mediante recombinación homóloga, lo que puede dar lugar al silenciamiento, inserción o expresión de un gen (Wu et al., 2014).

Ensamblaje Golden Gate (MoClo)

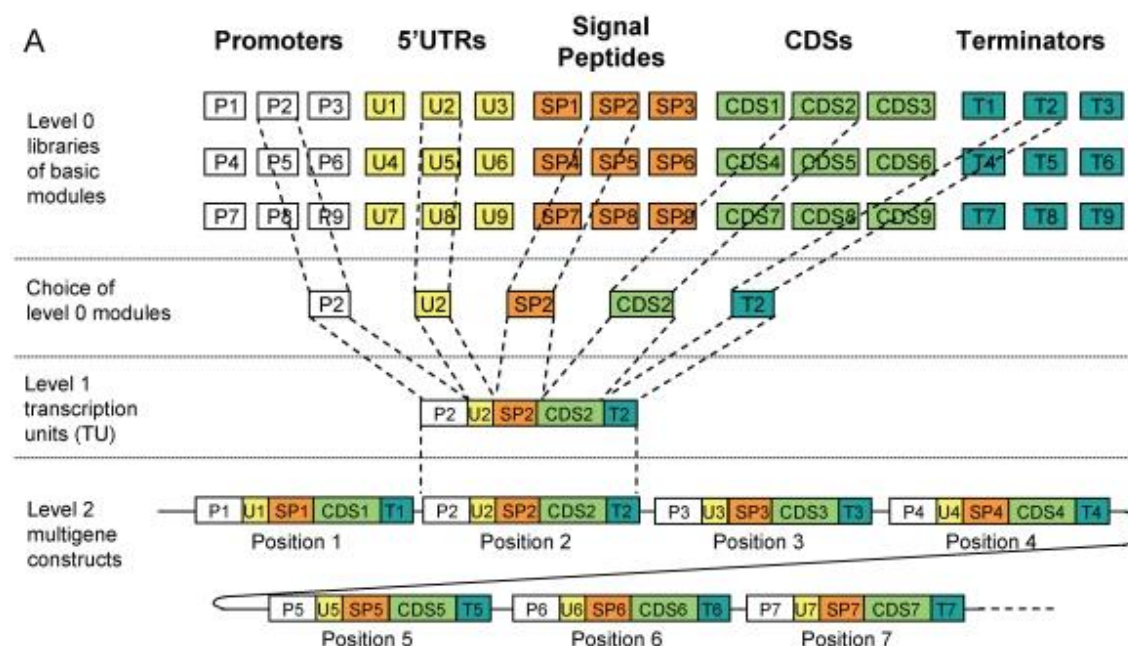
El ensamblaje Golden Gate es un método de clonación molecular que permite el ensamblaje simultáneo de múltiples fragmentos de ADN en una sola pieza, mediante el uso de enzimas de restricción de tipo IIS y ADN ligasa T4 (Engler & Marillonnet, 2014). La técnica MoClo (Modular Cloning), basada en los principios del ensamblaje Golden Gate, se introdujo como una mejora de la misma para el ensamblaje de ADN. En el método Golden Gate, los fragmentos de ADN y los vectores deben tener sitios de reconocimiento específicos que sean compatibles entre sí, para permitir la inserción y ensamblaje, aspecto que puede limitar la versatilidad y la facilidad del diseño de los plásmidos. En MoClo, se utilizan secuencias homólogas específicas en los extremos de los fragmentos de ADN, que reemplazan a los sitios de reconocimiento de restricción. En este caso, las secuencias homólogas son reconocidas por enzimas de recombinasa, como Bsal y BbsI, que generan extremos cohesivos que pueden ser ligados para ensamblar los fragmentos de ADN (Weber et al., 2011). De esta forma, mediante MoClo es posible un mayor grado de modularidad, ya que los fragmentos de ADN se pueden intercambiar y ensamblar de forma más flexible. Además, MoClo permite el ensamblaje de múltiples fragmentos de ADN en una sola reacción, lo que mejora la eficiencia y velocidad del proceso (Larralde, 2022).

De esta forma, el sistema MoClo permite la creación de construcciones monogénicas y multigénicas mediante una serie de tres niveles de ensamblaje (Weber et al., 2011). El nivel 0 se refiere a las partes básicas del ADN, incluyendo promotores, 5'UTRs, 3'UTRs,

secuencias codificantes y terminadores, donde los vectores de nivel 0 compatibles se ensamblan direccionalmente en un primer vector de nivel 1, creando una única unidad transcripcional. Un módulo válido de nivel 1 se obtiene ensamblando una parte de cada tipo en el vector de destino. Se utilizan marcadores de ensamblaje para garantizar que se ensamblan las partes correctas en el orden correcto. De igual forma, un módulo de nivel 2 se crea ensamblando módulos de nivel anterior. Este último paso, permite la formación de construcciones más complejas, limitadas por la capacidad de *E. coli* para mantener el plásmido tras la transformación (Shetty et al., 2008).

Figura 2

Esquema del Ensamblaje MoClo



Nota. Las bibliotecas de módulos básicos (nivel 0) contienen promotores (P), regiones 5' no traducidas (U), péptidos señal (SP), secuencias codificantes (CDS) y terminadores (T), donde las unidades de transcripción se ensamblan a partir de módulos de nivel 0 seleccionados mediante una reacción de un solo paso. Las construcciones multigénicas se ensamblan en un segundo paso de clonación. Adaptado de: Weber et al., (2011).

Transformación

La transformación es una técnica utilizada para introducir ADN extraño, generalmente en células bacterianas competentes, como las cepas Top10, DH5- α y JM109 *Escherichia coli*. El proceso de transformación suele implicar la captación e integración de ADN exógeno en el genoma bacteriano o el mantenimiento del ADN como plásmido extracromosómico (Gelvin, 2003).

Los dos métodos más populares de transformación bacteriana son el choque térmico de células competentes preparadas químicamente (transformación química) y la electroporación de células competentes (Ren et al., 2019). En la transformación química, las células se tratan con una solución de cloruro de calcio (CaCl_2), que hace que las membranas celulares sean más permeables al ADN. A continuación, las células se someten a un choque térmico, que ayuda a que las células absorban el ADN. Luego de un periodo de recuperación, las células transformadas pueden seleccionarse y conservarse (Chang et al., 2017). Por otro lado, la electroporación implica el uso de un impulso eléctrico para crear poros temporales en las membranas celulares, permitiendo que el ADN entre en las células. Las células bacterianas se mezclan con el ADN y se someten a un breve impulso eléctrico que facilita la absorción del ADN (Gonzales et al., 2013). Además, existen otros métodos de transformación como la biobalística, la lipofección y la conjugación (Ren et al., 2019)

Una vez transformadas, las células deben seleccionarse y mantenerse para propagar el material genético recién introducido. Esto se consigue incorporando marcadores seleccionables, como genes de resistencia a antibióticos en la construcción de ADN que se transforma (Yang et al., 2022). Las células transformadas se cultivan en medios selectivos que contienen el antibiótico correspondiente, donde sólo podrán crecer las células que hayan absorbido con éxito el ADN y adquirido el gen de resistencia al antibiótico (Munita & Arias, 2016). Para garantizar la estabilidad y la integridad del ADN transformado, se realizan periódicamente subcultivos y almacenamiento a bajas temperaturas (por ejemplo, $-80\text{ }^\circ\text{C}$) en reservas de glicerol (Peterson & Kaur, 2018).

Capítulo III: Metodología

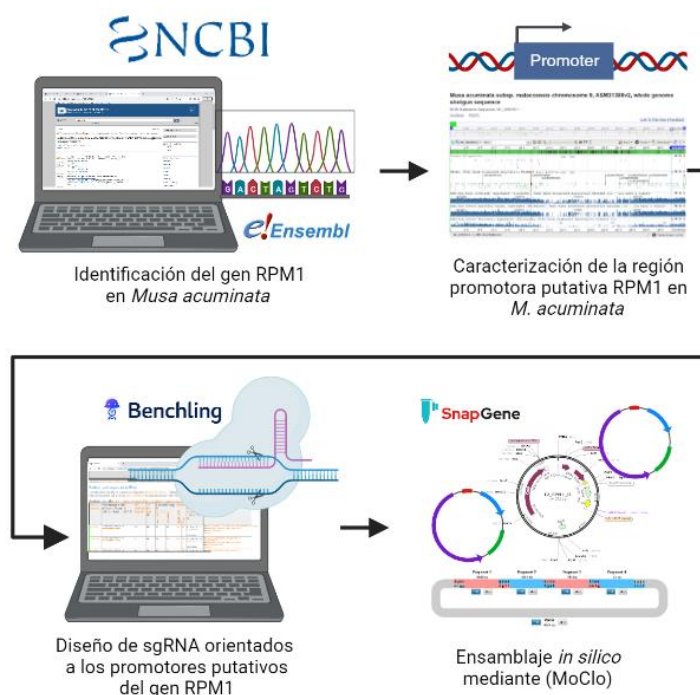
Zona de estudio

El proyecto de titulación se desarrolló en el laboratorio de microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, ubicado en la ciudad de Sangolquí, cantón Rumiñahui, Pichincha, Ecuador. El proyecto abarcó un período de 6 meses, desde su inicio en abril de 2023 hasta su conclusión y presentación en septiembre de 2023.

Procedimiento *in silico*

Figura 3

Esquema general de la metodología realizada *in silico* para la construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen *RPM1*



Nota. Elaborado con BioRender

Identificación del gen *RPM1* en *Musa acuminata*

Se realizó la búsqueda del gen *RPM1* en el genoma de *Musa acuminata*, a partir de la exploración en bases de datos biológicas y artículos científicos, con el propósito de identificar la secuencia genética de *RPM1* presente en el genoma del banano que podría estar involucrada en los mecanismos de defensa contra *FocR4T*. Para esto, se utilizó la base de datos "Nucleotide" de National Center for Biotechnology Information (NCBI), además de una

revisión bibliográfica donde se reporta a RPM1 como un gen potencial de resistencia contra *F. oxysporum* (Sun et al., 2019; Zhang et al., 2022). Para hallar la secuencia y la posición de RPM1 presente en el genoma de *M. acuminata* se utilizó Ensembl Plants, seguido de su mapeo e identificación mediante NCBI “BLASTN”.

Caracterización de la región promotora putativa RPM1 en *M. acuminata*

A partir de la identificación de RPM1 en *M. acuminata*, se consideró una región de 500 pb antes del inicio de la secuencia codificante del gen. Mediante el programa “New Place” se realizó un análisis de elementos que constituyen la región promotora, entre ellos, las cajas TATA, GATA o CAAT (Anexo 1). Además, por medio de ORF Finder de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder) (Anexo 2) se determinaron secuencias de ADN que contengan un marco de lectura. Esta información fue especificada en la región promotora mediante el software “Benchling”.

Diseño de sgRNA orientados a los promotores putativos del gen RPM1

Se utilizaron las plataformas “CRISPOR” (Anexo 3) y “Benchling” (Anexo 4), para el diseño del sgRNA. Los posibles ARN guías dirigidos a los promotores putativos del gen RPM1 fueron escogidos considerando su eficacia, eficiencia y off-targets.

Ensamblaje *in silico* mediante (MoClo)

El ensamblaje *in silico* se realizó mediante el programa “SnapGene” utilizando la metodología de clonación modular (MoClo) basada en los principios del ensamblaje Golden Gate. Este método consta de tres niveles, en los cuales se ensamblan las unidades de transcripción consideradas (plásmidos) para la edición genética del promotor del gen RPM1.

Tabla 1

Plásmidos utilizados para el ensamblaje de MoClo por niveles

Nombre (Vector)	Código	Aplicación	Descripción	ID AddGene	Marcador
Nivel 0 (L0)					

pFH113	E4	tRNA – sgRNA Columna Vertebral	Esqueleto de sgRNA.	128210	Kan
Nivel 1 (L1)					
pICH47751	D3	Aceptor / Backbone.	Posición 3, Forward.	48002	Amp
pFH31	B11	Pol III Promotor (Monocotiledóneas).	Promotor TaU3 de Trigo.	125884	Str
pAK-EL-01	C11	End-linker para tRNA – sgRNA.	Uso para sgRNA en el sistema tRNA – sgRNA	125760	Kan
Nivel 2 (L2)					
pAGM4723	A5	Aceptor / Backbone.	Posición 3, Forward.	48015	Kan
pFH114	H7	Marcador plantas (Monocotiledóneas).	ZmUBI::BAR:N:OSt.	148015	Amp
pFH23	G2	SpCas9	ZmUBIp::SpCas9	128408	Amp
pICH41766	D5	End-linker.	End-linker 3.	48018	Str

Nota. Los códigos vienen dados por las posiciones de los plásmidos (vectores) en el Kit *MoClo CRISPR/Cas Toolkit for Plants - #1000000159* de AddGene™ (Anexo 5) para B11, C11, D5, E4, G2 y H7 y en *MoClo Tool Kit - #1000000044* (Anexo 6) para A5, D3 y D5 de AddGene™. Además, los marcadores de resistencia bacteriana (antibióticos): Kan = Kanamicina; Amp = Ampicilina; Str = Estreptomicina.

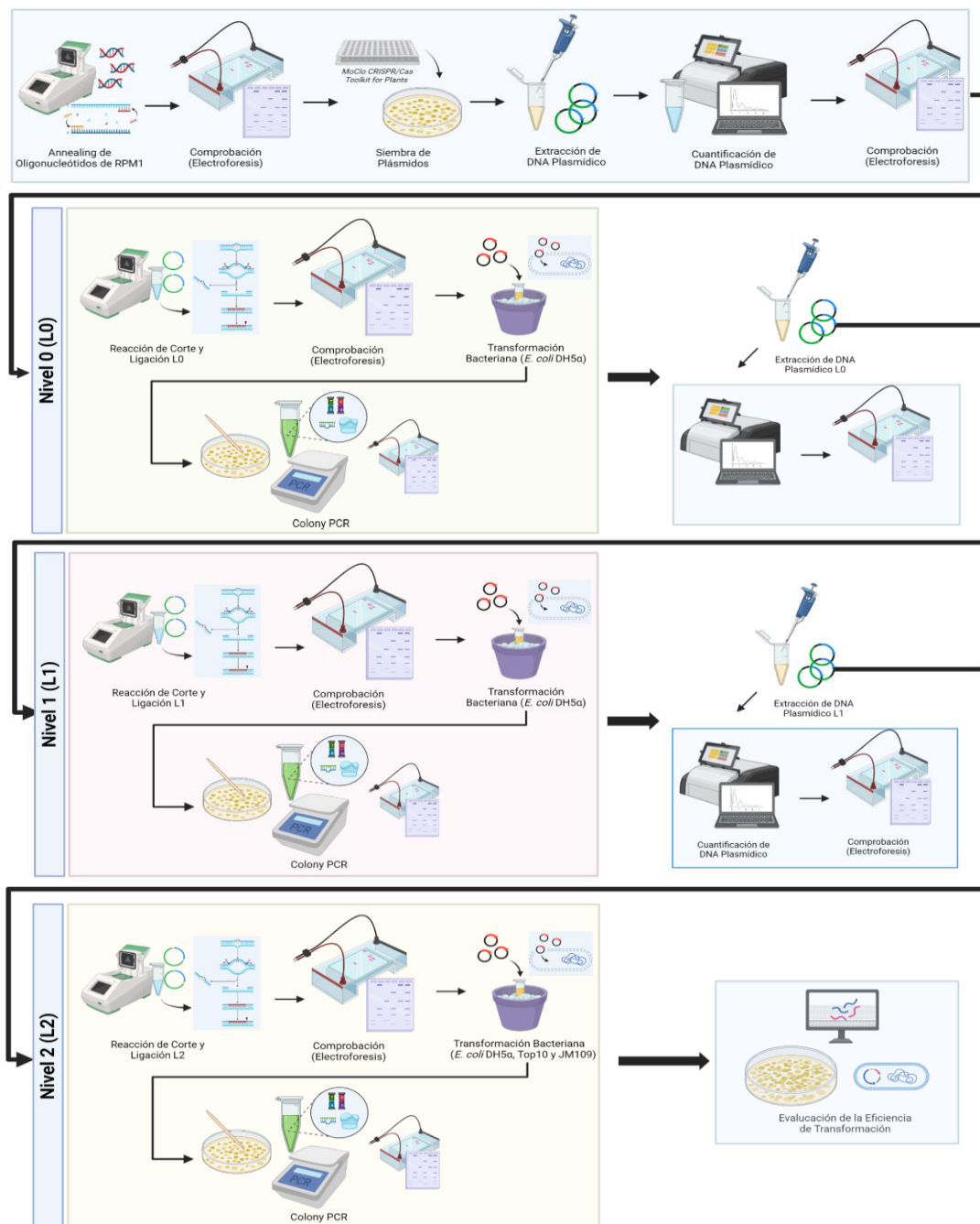
En el nivel 0 (L0), se ensambló el backbone pFH113 y el sgRNA sintetizado mediante la opción “Golden Gate Assembly”. A continuación, por medio de la enzima BbsI se realizó la digestión del backbone y la posterior ligación de ambas partes, a través de su unión por medio de la formación de nuevos enlaces fosfodiéster entre los extremos de los fragmentos de ADN. Para el nivel 1 (L1), mediante la misma herramienta del nivel anterior, se ensamblaron múltiples fragmentos los cuales son pICH47751 (backbone); pFH31 (promotor Pol III); plásmido ensamblado L0 y pAK-EL_01 (end-linker). En este caso, para el corte se utilizó la enzima BsaI. Finalmente, para el nivel 2 (L2) se ensamblaron los siguientes

plásmidos: pAGM4723 (backbone); pFH114 (marcador de selección); pFH23 (SpCas9); Plásmido ensamblado L1 y pICH41766 (terminador). Para este caso, la digestión se realizó mediante la enzima BbsI (Anexo 5 y 6).

Procedimiento *in vitro*

Figura 4

Esquema general de la metodología realizada in vitro para la construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RPM1



Nota. Elaborado con BioRender.

Hibridación (annealing) de oligonucleótidos del sgRNA de RPM1

Para la hibridación de los sgRNA complementarios del gen RPM1 se utilizó el protocolo de la sugerencia técnica No. 45 de Thermo Scientific™ (Anneal complementary pairs of oligonucleotides). Para este caso, se mezclaron los oligonucleótidos complementarios en proporción molar de 1:1, la cual fue diluida hasta llegar a una concentración final de 10 µM en tampón Tris. Posteriormente, se incubó la reacción a 95 °C durante 5 minutos. Al transcurrir este tiempo se dejó enfriar los oligonucleótidos hibridados a aproximadamente 25 °C durante 45 minutos (Anexo 7).

Siembra de *E. coli* portadoras de plásmidos

Se sembraron en cajas Petri con Agar Luria-Bertani (LB), IPTG (0.1 M), X-Gal (20 mg/mL) (Anexo 8) y el antibiótico sugerido por el proveedor (Tabla 1), a concentraciones de 200 mg/mL de Ampicilina para los plásmidos pICH47751, pFH114 y pFH23; 100 mg/mL de Kanamicina para pFH113, pAK-EI-01, pAGM4723 y 50 mg/mL de Estreptomina para pFH31 y pICH41766. Los plásmidos fueron extraídos de los kits *MoClo CRISPR/Cas Toolkit for Plants - #1000000159* de AddGene™ (A5, D3 y D5) y *MoClo Tool Kit - #1000000044* (B11 C11, E4, H7 y G2) de AddGene™ los cuales se encuentran clonados en *Escherichia coli* DH5α. Las cajas se llevaron a incubación a 37°C durante aproximadamente 24 horas. Luego, se seleccionaron colonias aisladas en las placas Petri, y se sembraron cada en un tubo Eppendorf en 1.5 mL de caldo LB adicionando reiteradamente el antibiótico de resistencia específico para cada plásmido. Adicionalmente, se inocularon de 3 a 5 colonias azules de cada plásmido en matraces Erlenmeyer de 250 mL con caldo LB y antibiótico. Los tubos y matraces se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

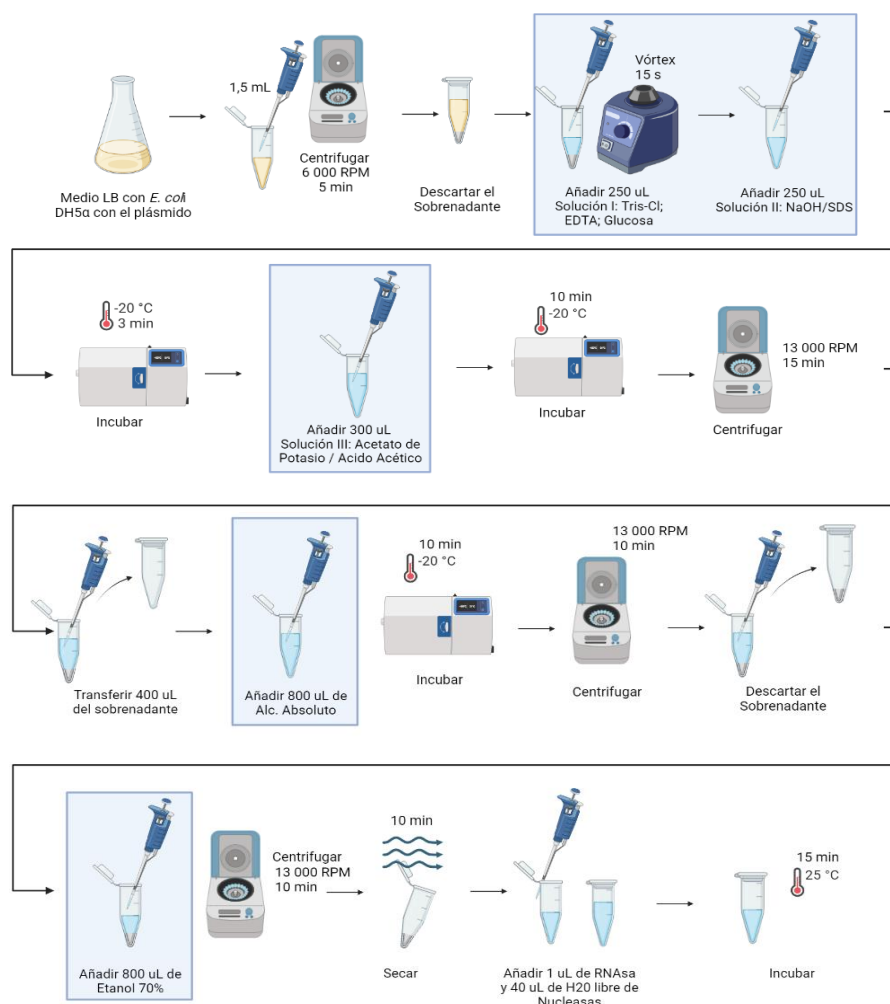
Extracción de ADN Plasmídico

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de extracción Miniprep PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification de Invitrogen™ (Anexo 9) y el protocolo de extracción de plásmido basado en lisis alcalina propuesto por International Genetically Engineered Machine (iGEM™), basado en Sambrook et al., (1989) (Anexo 10). La calidad y la cantidad del ADN se

cuantificó por espectrofotometría UV-Vis, mediante el equipo Thermo Scientific™ μ Drop Plate, colocando 2 μ L de ADN plasmídico extraído en cada uno de los pocillos y 2 μ L de agua libre de nucleasas como blanco, ya que es el buffer de elución para este caso. La integridad del ADN se determinó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa. Se utilizó un gel de agarosa al 1,5% con SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™), empleando una cámara electroforética (Owl™ EasyCast™ B1-BP Electrophoresis Systems). Por último, la visualización del gel se realizó en el fotodocumentador UVP™ Gel Imaging System – DigiDoc-It 120. Para comparar los pesos moleculares de los plásmidos, se utilizó el marcador de peso de 1kb DNA Ladder y buffer de carga Blue/Orange Loading Dye 6x, ambos de Promega™.

Figura 5

Protocolo de extracción de ADN plasmídico basado en lisis alcalina propuesto por iGEM™



Nota. Elaborado con BioRender

Reacción *in vitro* de corte y ligación Golden Gate (GG)

La reacción de corte y ligación se realizó mediante el protocolo de clonación modular (MoClo) propuesto por Hahn et al., (2020), el cual se constituye de tres niveles. Los reactivos y cantidades usadas para la reacción en cada nivel se describen en las siguientes tablas.

Tabla 2

Componentes para la reacción de corte y ligación para el Nivel 0 (L0).

Componente	Volumen
Backbone L0 (pFH113)	1 μ L
sgRNA (Hibridado)	1 μ L
Mix de ADN Ligasa T4 (10X)	2,5 μ L
Albúmina de suero bovino (BSA) (1 mg/mL)	1,5 μ L
Enzima BbsI-HF (New England Biolabs™)	1 μ L
Agua Libre de Nucleasas	8 μ L
Volumen Total	15 μL

Nota. Cada elemento del ensamblaje se encuentra ajustado a una concentración de 100 ng/ μ L; mientras que el sgRNA hibridado, está a 10 μ M.

Tabla 3

Componentes para la reacción de corte y ligación para el Nivel 1 (L1).

Componente	Volumen
Backbone L1 (pICH47751)	1 μ L
Promotor Pol III (pFH31)	1 μ L
Plásmido Ensamblado L0	1 μ L
End-linker (paK-EI-01)	1 μ L
Mix de ADN ligasa T4 (10X)	2,5 μ L
Albúmina de suero bovino (BSA) (1 mg/mL)	1,5 μ L
Enzima Eco31-BsaI (Thermo Scientific™)	1 μ L
Agua Libre de Nucleasas	6 μ L

Volumen Total	15 μ L
----------------------	------------

Nota. Cada elemento del ensamblaje se encuentra ajustado a una concentración de 100 ng/ μ L; mientras que el plásmido ensamblado está a 10 μ M.

Tabla 4

Componentes para la reacción de corte y ligación para el Nivel 2 (L2).

Componente	Volumen
Backbone nivel 1 (pAGM4723)	1 μ L
Marcador de Selección (pFH114)	1 μ L
SpCas9 (pFH23)	1 μ L
Plásmido Ensamblado L1	1 μ L
End-linker 2 (pICH41766)	1 μ L
Mix de ADN ligasa T4 (10X)	2,5 μ L
BSA (1 mg/mL)	1,5 μ L
Albúmina de suero bovino (BSA) (1 mg/mL)	1 μ L
Enzima BbsI-HF (New England Biolabs™)	5 μ L
Volumen Total	15 μ L

Nota. Cada elemento del ensamblaje se encuentra ajustado a una concentración de 100 ng/ μ L; mientras que el plásmido ensamblado está a 10 μ M.

La reacción de corte y ligación se llevó a cabo en un termociclador. Para este proceso, inicialmente, se somete a los componentes de la reacción a una etapa de 37°C durante 20 segundos. A continuación, se efectúan sobre los mismos 50 ciclos de 37°C por 3 minutos; seguido de períodos de 16°C, 50°C y 80°C por 5 minutos cada uno. Finalmente, se mantuvo el resultado de la reacción a 16 °C.

Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

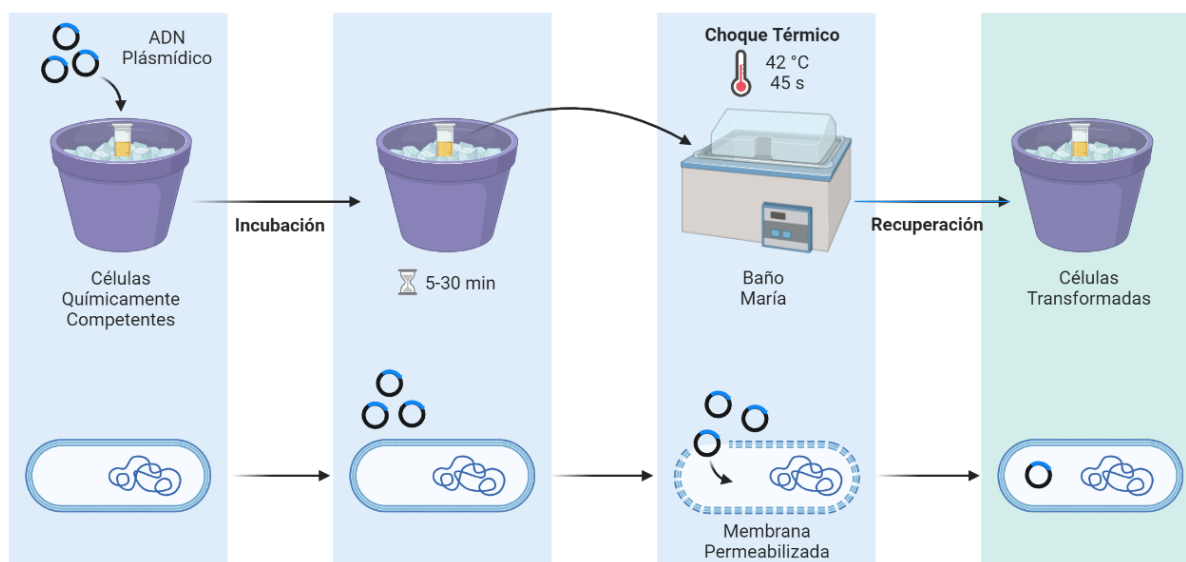
Para la preparación de células competentes de las cepas DH5 α y TOP10 se utilizó el protocolo de Hanahan et al., (1991), adaptado por iGEM™ (Anexo 11). Para este caso, se

inoculó 100 μL de ambas cepas de forma separada y se agregó Estreptomicina a una concentración de 50 mg/mL, para su posterior incubación a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, los cultivos bacterianos fueron sembrados en 250 mL de medio SOB (Anexo 8) y e incubados a 20 °C durante 24 horas. El cultivo fue transferido a tubos de centrifuga previamente enfriados y se centrifugó durante 10 minutos a 3.000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el sedimento se resuspendió en 16 mL de tampón CCMB80 (Anexo 8), y se colocó en hielo 20 minutos. El procedimiento anterior se repitió una vez y finalmente se resuspendió el sedimento en 2mL de tampón CCMB80. Para la cepa JM109, se adquirió el kit de células competentes JM109 de Promega™ (Anexo 12), por lo que no hizo falta seguir un protocolo previo para volver competentes a las células esta cepa, por lo que se utilizaron directamente en la transformación.

Transformación de células competentes por choque térmico

Figura 6

Trasformación de células químicamente competentes por choque térmico



Nota. Elaborado con BioRender.

Para la transformación de *E. coli* DH5 α y Top 10 con el plásmido ensamblado, se utilizó el protocolo propuesto por iGEM™ adaptado de Hanahan et al., (1991). Las células competentes fueron descongeladas, de las cuales se tomaron 50 μL para posteriormente

mezclarlas con 2 μL de ADN plasmídico extraído en un tubo Eppendorf. La mezcla de células competentes y ADN plasmídico fue colocada en hielo durante 30 minutos, y seguido de esto se colocó los tubos a 42°C por 45 segundos en baño María. A continuación, se puso la reacción en hielo durante 5 minutos. Finalmente, se agregaron 950 μL de medio SOB (Anexo 8) al producto de la transformación y se incubó a 37 °C durante 60 minutos a 200 rpm en un Thermomixer. En el caso de la transformación de *E. coli* JM109, el procedimiento es el mismo, no obstante, a estas se les agregó 900 μL de medio SOC.

Finalmente, se agregaron 100 μL de las células transformadas en cajas Petri con medio LB, X-Gal (120 μL) e IPTG (40 μL) y un antibiótico por nivel (L0: 100 mg/mL (Kan); L1: 200 mg/mL (Amp); L2: 100 mg/mL (Kan)). Las cajas inoculadas se incubaron a 37°C durante 24 horas. No obstante, la transformación de *E. coli* en los niveles L0 y L1, se efectuó únicamente en la cepa DH5 α , debido a que los vectores plasmídicos ensamblados de los kits #1000000159 y #1000000044 de AddGene™ se conservan en estas células. De esta forma, para las cepas Top10 y JM109 incluida DH5 α se realizó la transformación en L2 a partir del plásmido extraído L1 de *E. coli* DH5 α . Adicionalmente, se verificó para cada nivel de ensamblaje, que en el control negativo no haya crecimiento y se contaron las colonias obtenidas en las cajas Petri con bacterias transformadas. Luego, se calculó la eficiencia de transformación como indica la fórmula Liu et al. (2018):

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

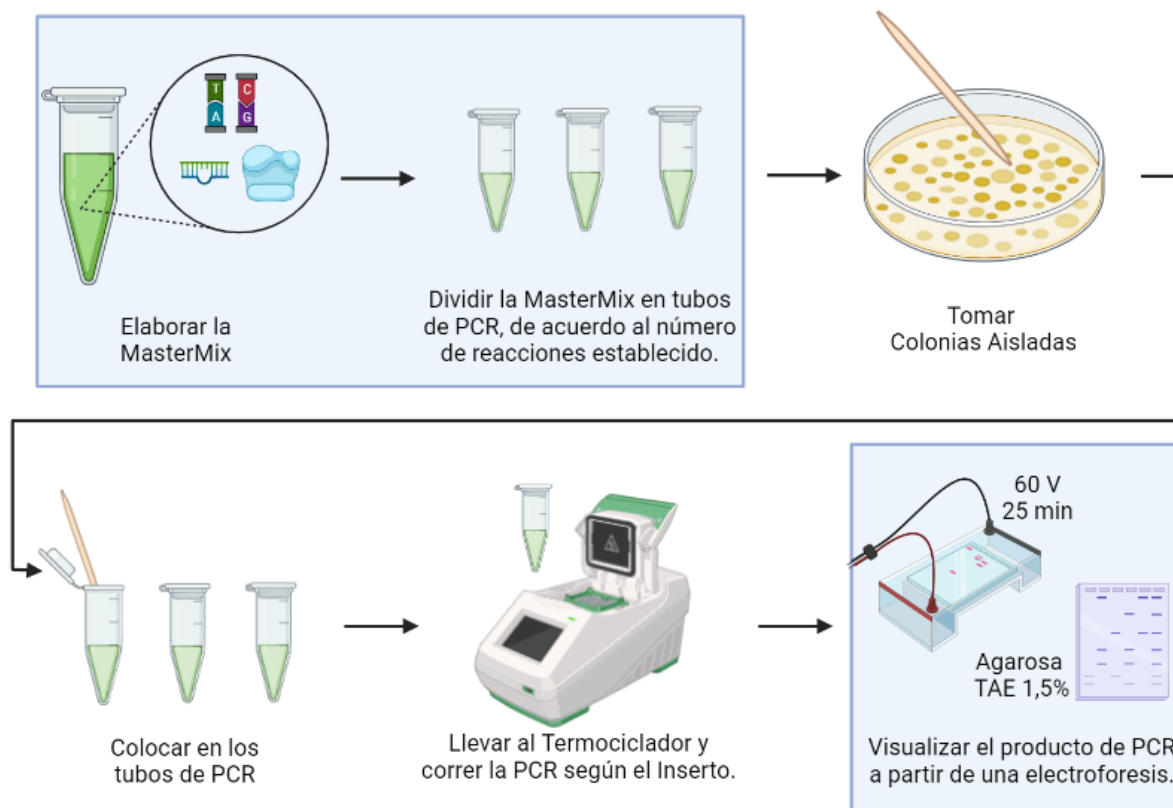
$$\#UFC = \frac{\#Colonias \text{ Transformadas} \times \text{Tasa Dilución} \times \text{Volumen de transformación } (\mu\text{L})}{\text{Volumen sembrado } (\mu\text{L})}$$

$$\text{DNA Sembrado en la Caja } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Volumen Sembrado } (\mu\text{L}) \times \text{DNA Plasmídico } (\mu\text{g})}{\text{Volumen de Transformación } (\mu\text{L})}$$

PCR de Colonia (Colony PCR)

Figura 7

PCR Colony empleando DreamTaq Green PCR Master Mix



Nota. Elaborado con BioRender.

Se realizó una Colony PCR empleando el Kit DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) de Thermo Scientific™, con el objetivo de comprobar la transformación de las células competentes con el plásmido ensamblado en L0, L1 y L2.

Tabla 5

Condiciones de reacción de la PCR

Componentes	Volúmen 1X
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	6.25µL
Primer Reverse (10µM)	1.25 µL
Primer Forward (10µM)	1.25 µL
Agua libre de nucleasas	3 µL

Volumen Total	12.5 μ L
----------------------	--------------

Nota. Valores basados en las instrucciones del inserto del Kit DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) de Thermo Scientific™.

A los reactivos de la PCR, se les añadió con un asa estéril de una a dos colonias blancas de las placas Petri que contenían los plásmidos ensamblados y transformados, para cada nivel de ensamblaje. Posteriormente, se llevó la reacción al termociclador, siguiendo las condiciones presentadas en la Tabla 6.

Tabla 6

Condiciones de la Colony PCR en el Termociclador para los diferentes niveles de ensamblaje.

Etapas de la PCR	Temperatura	Tiempo	Ciclos de PCR
Desnaturalización Inicial	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	
Hibridación	$T_m - 5$ °C	30 segundos	35
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión Final	72 °C	5 minutos	1

Nota. Se muestran las condiciones de para la PCR siguiendo las recomendaciones del Kit DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) de Thermo Scientific™. T_m hacer referencia a la temperatura de melting de los primers de acuerdo a cada nivel de ensamblaje.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™) empleando una cámara electroforética (Owl™ EasyCast™ B1-BP Electrop. Systems). Finalmente, la visualización del gel se realizó en el fotodocumentador UVP™ Gel Imaging System – DigiDoc-It 120. Para comparar los pesos moleculares de los plásmidos ensamblados, se utilizó el marcador de peso de 1kb DNA Ladder de Promega™.

Tabla 7

Primers utilizados en la reacción de PCR en cada nivel de ensamblaje

Región	Forward	Reverse
L0	TTCGATTCCCGGCTGGTGCA	AGCATAGCTCTGAAACAATC
Backbone+ sgRNA	Tm: 67,4 °C	Tm: 53,1 °C
L1	ACTCTTCCTTTTTCAATATT	AAAAAAAAAAAAAGCACCGAC
Promotor + sgRNA + Terminador 1	Tm: 47,6 °C	Tm: 51,9 °C
L2	TTACGAGGATGCACATGTGA	AGCGCAGTAACATAGATGAC
Marcador + Cas9 + L1 + Terminador 2	Tm: 57,8 °C	Tm: 54,9 °C

Nota. Se detalla la secuencia de cada oligonucleótido y su temperatura de melting (T_m). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Macrogen, Inc.

Diseño Experimental

Para el análisis de los datos experimentales, se efectuó un diseño completamente al azar (DCA), con tres repeticiones y se ejecutó un análisis de varianza (ANOVA), mediante el programa informático GraphPad Prism™ a un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0,05$).

Modelo Estadístico

$$Y_{ij} = \mu + c_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} : Eficiencia de transformación en cada cepa de *E. coli*.

μ : Media de la eficiencia de transformación calculada en DH5 α , TOP10 y JM109.

c_i : Efecto de la i-enésima cepa de *E. coli*

ε_{ij} : Error experimental asociado a la j-enésima unidad experimental

Tratamientos

T1: *E. coli* DH5 α

T2: *E. coli* JM109

T3: *E. coli* TOP10

Unidades Experimentales

Se llevaron a cabo tres repeticiones para cada uno de los tratamientos, lo que resultó en un conjunto total de nueve unidades experimentales. Cada una de estas unidades experimentales concierne a una caja Petri que contenía aproximadamente 20 mL de agar LB donde fueron sembradas células transformadas de *E. coli* que contenían el plásmido ensamblado de L2, lo que sumó un total de nueve unidades en total.

Variables

- **Variable Dependiente:** Eficiencia de transformación expresada en unidades formadoras de colonias por cantidad de ADN plasmídico (UFC/ μ g).
- **Variable independiente:** Cepas de *E. coli* (DH5 α , JM109 y Top10).

Hipótesis

- **Nula:** $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$
No existe diferencia significativa en la media de la eficiencia de la transformación (ET) obtenida en las cepas de *E. coli* DH5 α , JM109 y Top10.
- **Alternativa:** $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$
Existe diferencia significativa en la eficiencia de la transformación en las cepas de *E. coli* DH5 α , JM109 y Top10.

Capítulo IV: Resultados

Resultados *in silico*

Identificación del gen RPM1 en *Musa acuminata*

Para identificar la secuencia genética de RPM1 presente en el genoma de *Musa acuminata* se partió de la base de datos “Nucleotide” de National Center for Biotechnology Information (NCBI), además de una revisión bibliográfica (Sun et al., 2019; Zhang et al., 2022), donde se halló que RPM1 se encuentra presente en los cromosomas 6 (Ma06_g31500), 8 (Ma08_g31160) y 9 (Ma09_g28690) de esta especie, siendo este último escogido para el análisis y predicción de la región promotora.

Tabla 8

Resultados del mapeo de la secuencia del gen RPM1 en BLASTN

Descripción	Query Cover	E-Value	Per. Ident
PREDICTED: <i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> disease resistance protein RPM1-like (LOC103999252), mRNA	100%	0	100%
<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> strain			
Doubled-haploid Pahang (DH-Pahang) genome assembly, chromosome: A09	100%	0	100%
<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> isolate AA Chromosome 20	100%	0	99,15%
<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>Malaccensis</i> isolate AA Chromosome 9	100%	0	99,15%
PREDICTED: <i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> disease resistance protein RPM1 - like (LOC103999439), mRNA	100%	0	90,80%

<i>Musa acuminata</i> clone NBD-09 NBS/LRR	8%	8e-57	88,42%
disease resistance - like gene, partial cds			

Diseño de sgRNA dirigidos a los posibles promotores de RPM1 en *M. acuminata*

De acuerdo a lo planteado en la sección 3.1 de la metodología, se eligieron dos parejas sgRNA (forward y reverse) dirigidos al promotor putativo del gen RPM1 (Tabla 8). De acuerdo a los criterios planteados en la sección de metodología, los sgRNA que fueron elegidos presentaron una eficiencia y especificidad >90%. De los dos ARN guía predichos, se eligió el sgRNA1 debido a que presentaba una menor probabilidad de off targets (10,9), como se observa en el Anexo 4.

Tabla 9

ARN guías sintetizados dirigidos al promotor putativo del gen RPM1

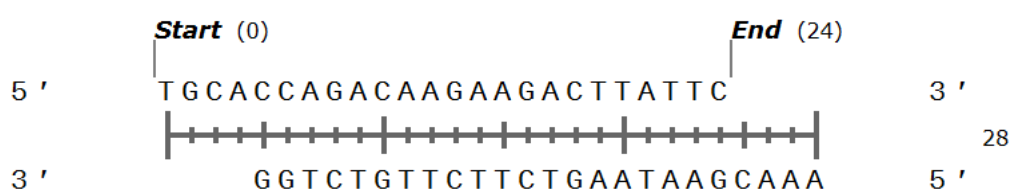
Nombre	Secuencia
<i>sgRNA1 RPM1 FW</i>	5'-TGCA ATATACTTCTTCTGACTTAC-3'
<i>sgRNA1 RPM1 REV</i>	3'-AAAC GTAAGTCAGAAGAAGTATAT-5'
<i>sgRNA2 RPM1 FW</i>	5'-TGCA TTCTCTTAGTAAAAGAACAA-3'
<i>sgRNA2 RPM1 REV</i>	3'-AAAC TTGTTCTTTTACTAAGAGAA-5'

Ensamblaje *in silico* mediante clonación modular (MoClo)

En la figura 8, se evidencia la hibridación de los oligonucleótidos dirigidos a los posibles promotores de RPM1 el plásmido ensamblado *in silico*.

Figura 8

Oligonucleótidos alineados sgRNA1 RPM1.

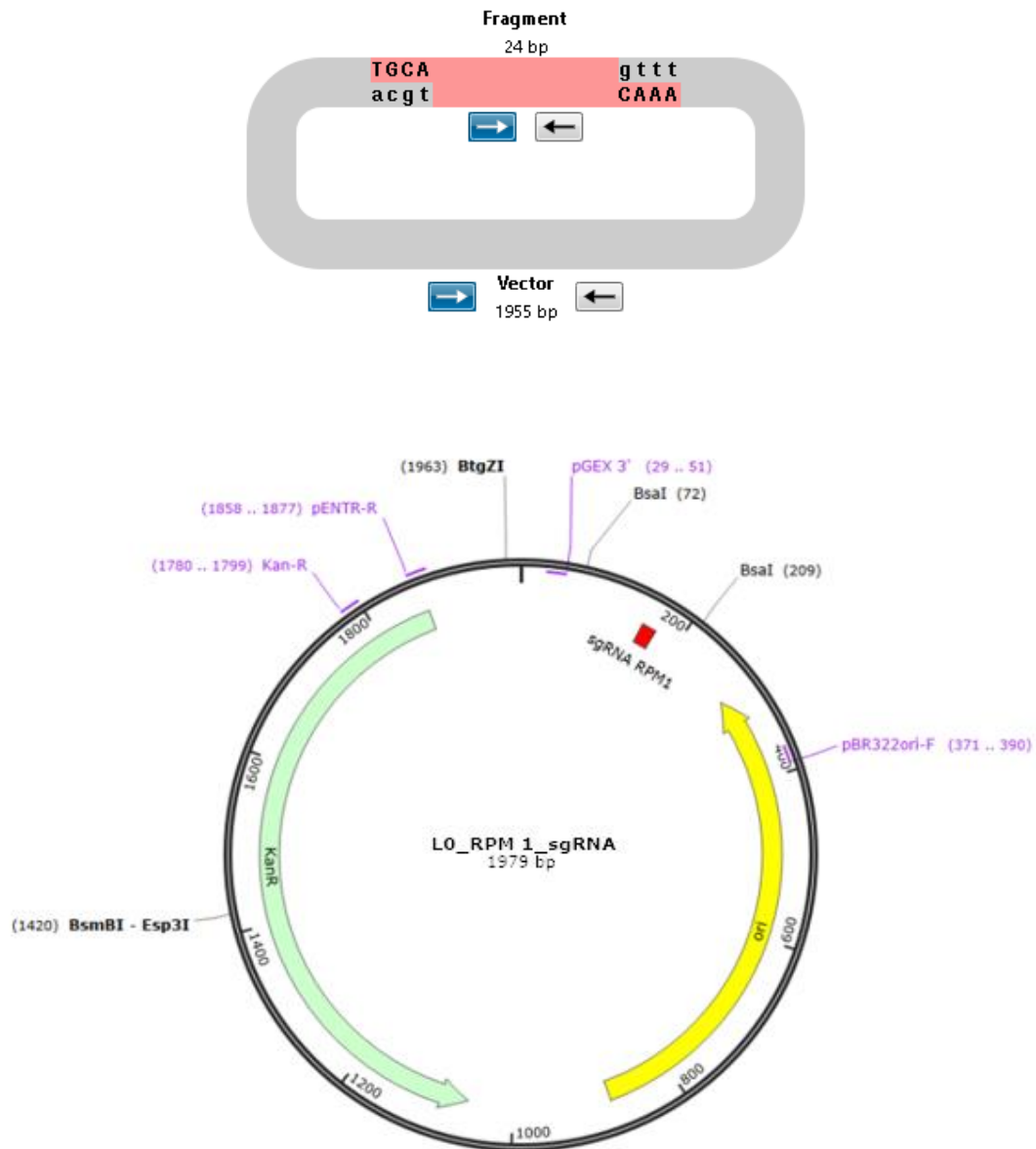


Nota. Elaborado con SnapGene™.

La figura 9 se demuestra el ensamblaje del plásmido en el nivel 0 que contiene los sgRNA dirigidos a los posibles promotores de RPM1 y a la vez que ha perdido el gen LacZ del backbone original (pFH113).

Figura 9

Plásmido ensamblado L0

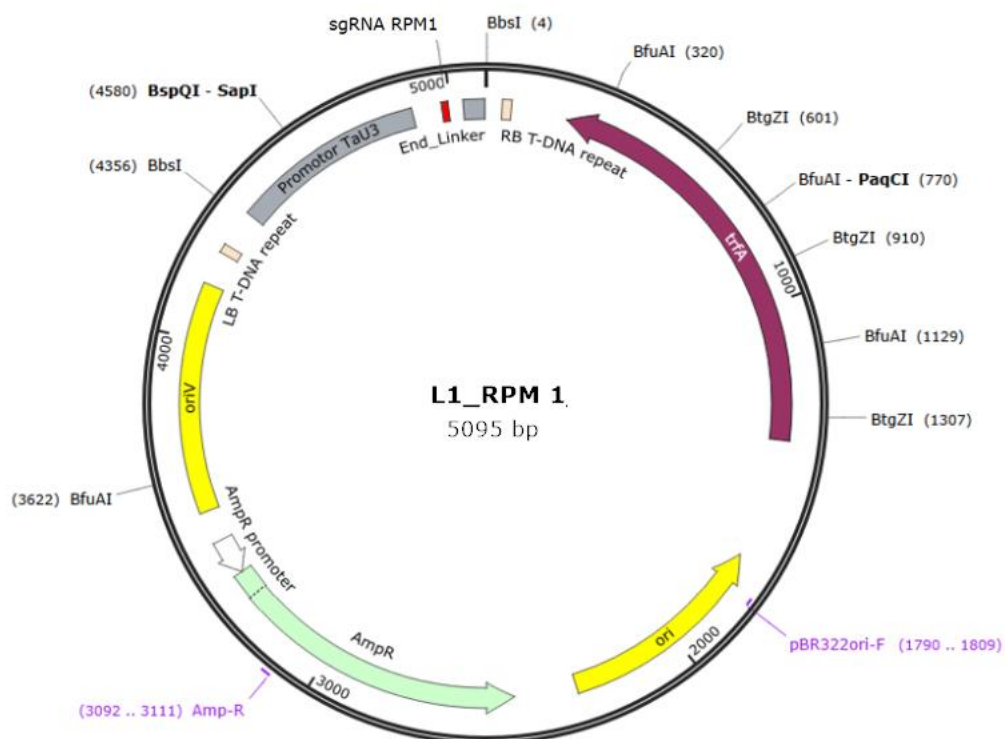
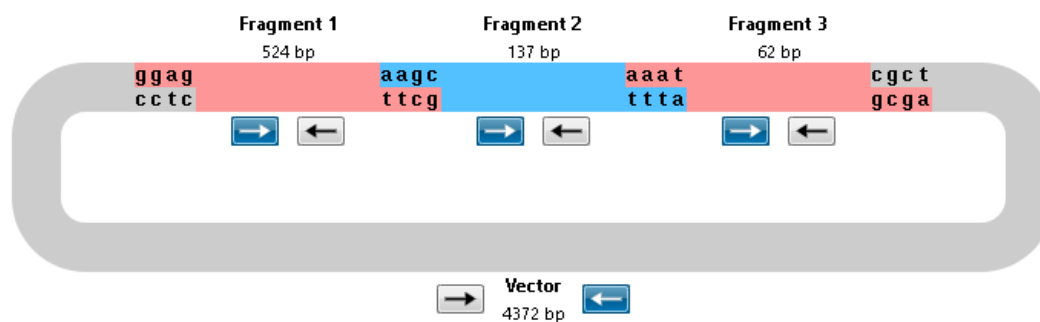


Nota. Plásmido ensamblado de L0. El fragmento de 24 pb corresponde a los oligonucleótidos hibridados y el vector de 1955 pb corresponde al Backbone pFH113. Elaborado con SnapGene™.

La Figura 3 representa el ensamblaje de L1, cuyo plásmido contiene el promotor Pol III, la secuencia del sgRNA del ensamblaje en L0 y un End-linker. De igual manera, se evidencia en L1 la pérdida del gen Lac Z en el backbone inicial (pICH47751).

Figura 10

Plásmido ensamblado L1

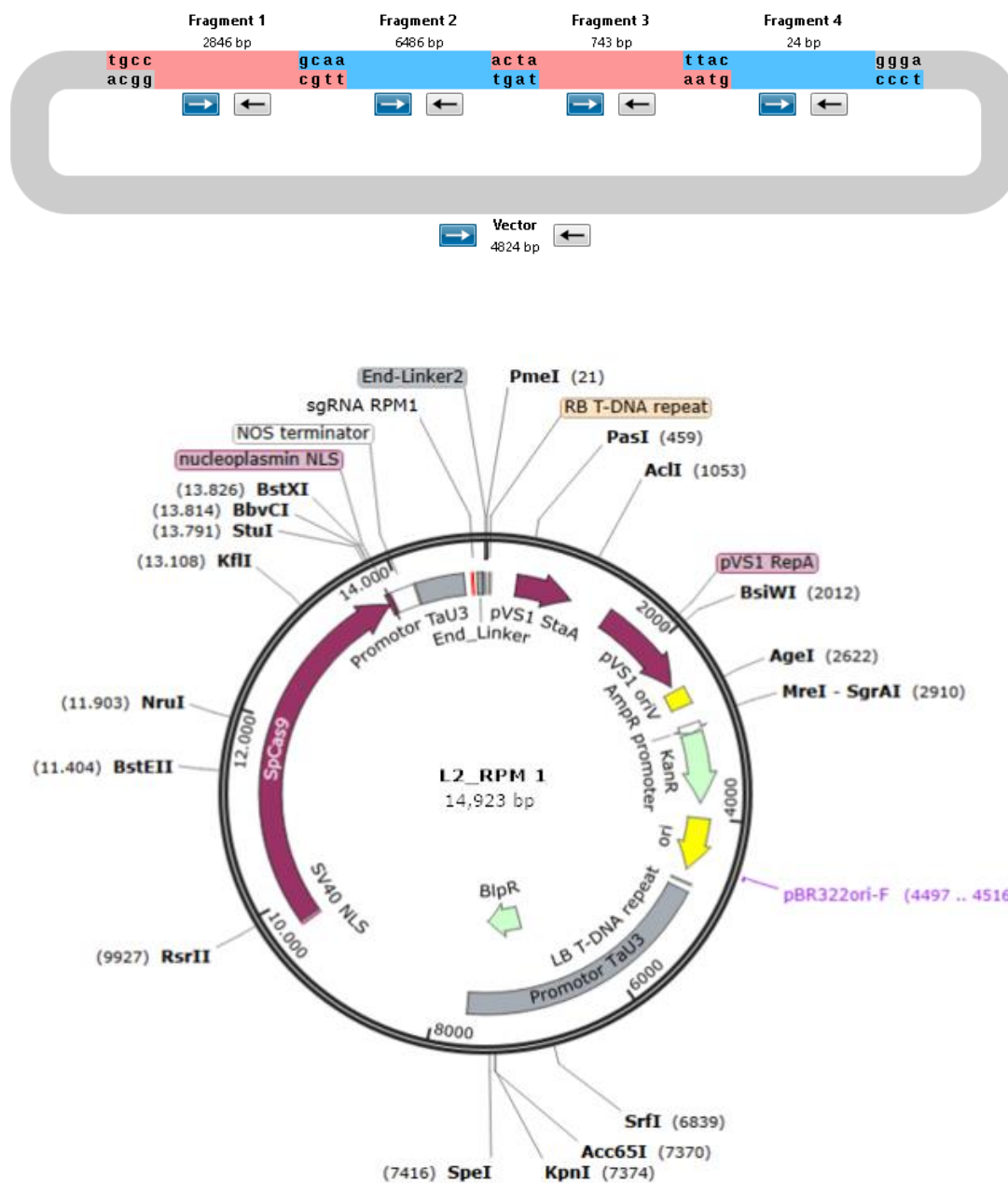


Nota. Plásmido ensamblado en L1, el cual contiene el promotor Pol III (524 bp), el sgRNA (137 pb) y un End-linker (62 pb). Elaborado con SnapGene™.

La Figura 3 representa el ensamblaje de L2, que presenta un marcador de selección, el promotor Pol III, los vectores acoplados en L1, la SpCas9 y un End-linker de nivel 2.

Figura 11

Plásmido ensamblado L2



Nota. Plásmido ensamblado en L2, que presenta el promotor Pol III y el sgRNA (473 pb), un marcador de selección (2864 bp), SpCas9 (6486 bp) y un End-linker (24 bp). Elaborado con SnapGene™.

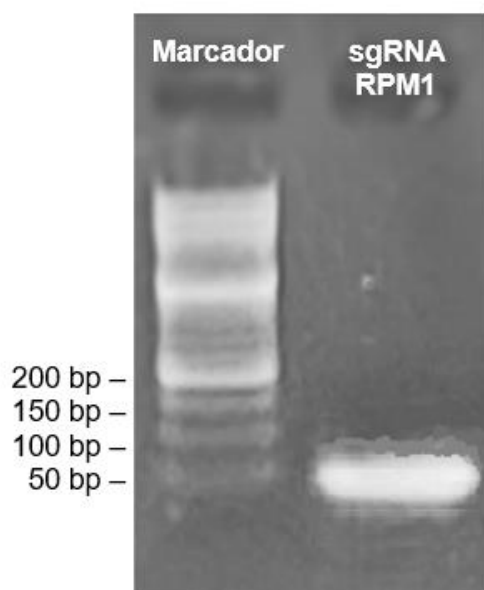
Resultados *in vitro*

Hibridación (annealing) de oligonucleótidos del sgRNA de RPM1

En la figura 13, se muestra el resultado de una electroforesis para la comprobación del annealing de los sgRNA de RPM1, donde se aprecia que se presentan bandas por debajo de los 50 pb, lo cual denota la correcta hibridación de los oligonucleótidos complementarios de RPM1, ya que estos presentan un tamaño de 24 bp.

Figura 13

Comprobación de la hibridación de los sgRNA complementarios de RPM1.



Nota. La figura representa una electroforesis de gel agarosa al 2%. Marcador de peso molecular: 100bp Opti-DNA Marker (ABM™).

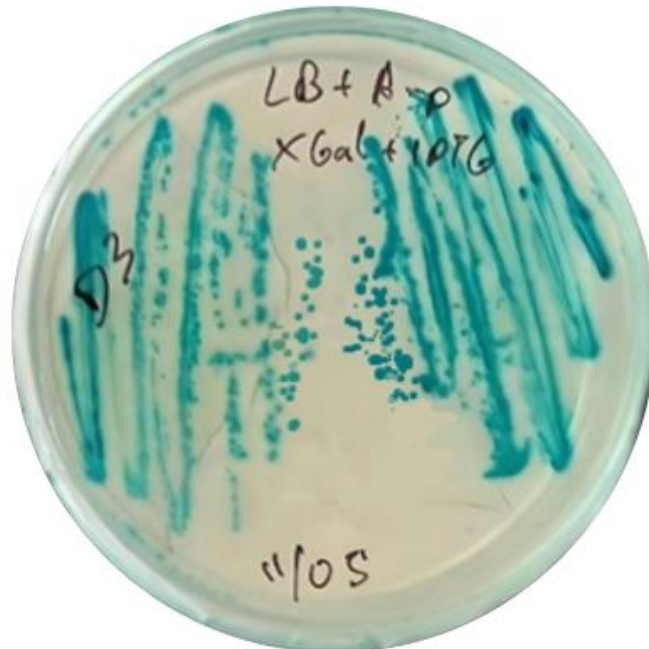
Siembra de *E. coli* portadoras de plásmidos

Aproximadamente a las 24 horas de incubación a 37 °C, se observó la formación de colonias de *E. coli* DH5α de los kits - #1000000159 y #1000000044 de AddGene™ (Anexo 5) en las placas Petri que contenían los diferentes plásmidos en medio LB, con IPTG, X-gal y el respectivo antibiótico. Los plásmidos pFH113 (E4), pICH47751 (D3), pAGM4723 (A5) se encuentran en colonias azules debido a la presencia del gen LacZ en su estructura,

mientras que pFH31 (B11), pAK-EI-01 (C11), pFH114 (H7), pFH23 (G2) y pICH41766 (D5), se encuentran presentes colonias blancas, por la ausencia del mismo.

Figura 14

E. coli con plásmido pICH47751 sembrado en agar LB, con X-gal, IPTG y Amp. (200 mg/mL).



Nota. Plásmido pICH47751 (D3) (Backbone L1).

Figura 15

E. coli con plásmido pFH114 sembrado en agar LB, con X-gal, IPTG y Amp. (200 mg/mL).



Nota. Plásmido pFH114 (H7) (Marcador de Selección L2).

Extracción de ADN plasmídico

Respecto a los protocolos de extracción considerados, solo fue posible detectar material genético únicamente con el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM™, a excepción de pFH113 (E4), en cuyo proceso de extracción con Miniprep PureLink™ se logró evidenciar la presencia de ADN plasmídico (figura 16).

En la Tabla 9, se demuestran los valores de concentración ($\mu\text{g/mL}$) y de pureza obtenidos durante la cuantificación de ADN plasmídico utilizando el equipo Thermo Scientific™ $\mu\text{Drop Plate}$. La existencia de valores de concentración negativos y menores a $20 \mu\text{g/mL}$, muestran que no se logró obtener ADN plasmídico con el protocolo del Miniprep PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit. En adición, los valores de pureza (A260/280) mayores a 1,6 y menores 1,5 en el caso de (A260/230), evidencian que se obtuvo un ADN altamente contaminado. No obstante, para las construcciones de L0, se utilizó el ADN plasmídico obtenido mediante Miniprep PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification para E4 (pFH113), ya que se obtuvo una concentración de $384,2 \mu\text{g/mL}$ y una pureza mayor a 1,8.

Tabla 10

Cuantificación de ADN plasmídico utilizando el protocolo del Miniprep PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit.

Fecha	Plásmido	Muestra	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/230)
29/05/2023	<i>pFH113</i>	E4	-9,898	1,143	-0,4148
	<i>pAGM4723</i>	A5	3,367	2,538	0,3708
	<i>pFH31</i>	B11	-4,184	2,158	0,4184
	<i>pAK-EI-01</i>	D3	-2,755	1,688	0,403
12/06/2023	<i>pICH47766</i>	D5	-3,061	1,765	0,4412
	<i>pFH113</i>	E4	-5,000	1,885	0,2952
	<i>pFH114</i>	H7	-6,122	1,622	0,4511
	<i>pFH23</i>	G2	-0,3061	-0,75	0,15
15/06/2023	<i>pFH113</i>	E4	384,2	1,801	2,183

16/6/2023	pAGM4723	A5	2,653	1,733	5,2
	pFH31	B11	2,959	1,318	1,933
	pAK-EI-01	D3	6,327	2,067	1,771
	pICH47766	D5	16,12	2,107	0,6031
	pFH114	H7	434,4	1,753	1,505
	pFH23	G2	37,65	1,873	1,708
20/06/2023	pAGM4723	A5	8,673	2,297	0,7589
	pFH31	B11	4,796	2,136	0,379
	pAK-EI-01	D3	11,53	0,9113	0,6647
	pICH47766	D5	12,45	1,649	2,346
	pFH114	H7	134,7	1,833	2,26
	pFH23	G2	12,14	1,469	1,469
27/06/2023	pAGM4723	A5	7,653	1,974	2,143
	pFH31	B11	7,245	1,868	1,203
	pAK-EI-01	D3	19,69	1,206	0,9847
	pICH47766	D5	9,694	1,836	1,696
	pFH114	H7	6,939	1,511	1,659
	pFH23	G2	8,061	1,58	1,795

Nota. Datos tomados con el equipo Thermo Scientific™ μ Drop Plate.

Las construcciones de L1 y L2 se realizaron a partir del ADN plasmídico extraído mediante el protocolo de lisis alcalina, ya que mediante este método se lograron obtener concentraciones de ADN superiores 1000 μ g/mL y purezas A260/280 mayores o iguales a 1.8; A260/230 menores o iguales a 2. De esta forma, se estableció que el protocolo casero de lisis alcalina permitió obtener altas concentraciones de ADN plasmídico purificado.

Tabla 11

Cuantificación de ADN plasmídico utilizando el protocolo casero de lisis alcalina.

Fecha	Plásmido	Muestra	Concentración	Pureza	Pureza
			(μ g/mL)	(A260/A280)	(A260/230)
29/06/2023	pAGM4723	A5	2933	2,015	1,949
	pFH31	B11	3014	2,049	2,022
	pAK-EI-01	D3	2862	2,065	2,047

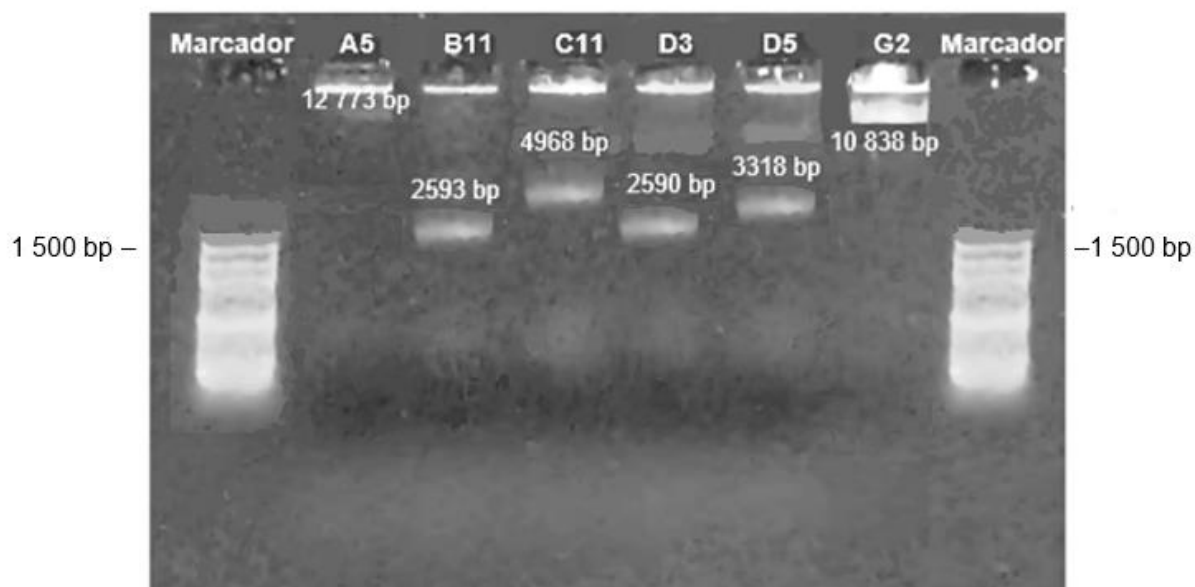
	<i>pICH47766</i>	D5	2284	2,13	2,015
	<i>pFH23</i>	G2	2094	2,067	1,665
	<i>pFH114</i>	H7	2927	2,097	1,987
	<i>pAGM4723</i>	A5	2930	1,808	1,776
	<i>pFH31</i>	B11	2818	1,239	1,231
04/07/2023	<i>pAK-EI-01</i>	D3	3407	1,755	1,720
	<i>pICH47766</i>	D5	2816	2,008	1,974
	<i>pFH23</i>	G2	2902	1,952	1,887
	<i>pFH114</i>	H7	2805	2,014	2,026

Nota. Datos tomados con el equipo Thermo Scientific™ *μDrop Plate*.

A partir de la electroforesis de los plásmidos extraídos (A5, B11, D3, D5, G2, H7) (Figura 16), se confirmó que la extracción corresponde a ADN plasmídico, no obstante, no es posible verificar el peso aproximado de los plásmidos extraídos, ya que estos poseen pesos mayores a los 2000 bp, mientras que se usó el marcador 100bp Opti-DNA Marker (ABM™). De esta forma, solo es posible aproximar el peso de cada muestra, estableciendo como referencia las 1500 pb del marcador molecular.

Figura 16

Electroforesis gel agarosa al 2% TAE de los plásmidos extraídos mediante un protocolo casero de lisis alcalina propuesto por iGEM™ (Sambrook et al., 1989).

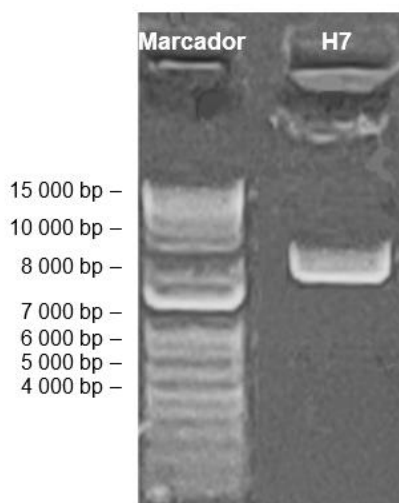


Nota. Marcador de peso molecular: 100bp Opti-DNA Marker (ABM™). (A5) plásmido pAGM4723; (B11) plásmido pFH31; (C11) plásmido pAK-EI-01; (D3) plásmido pICH47751; (D5) plásmido pICH41766; (G2) plásmido pFH23.

Los resultados de la electroforesis corrida para la identificación del plásmido E4 extraído con el kit Miniprep PureLink™ (Figura 17), indican que este presentó una buena calidad y concentración. Además, es posible comprobar el peso del plásmido al compararlo con el marcador de peso de 1kb DNA Ladder.

Figura 17

Electroforesis gel agarosa al 1,5% TAE de la extracción del plásmido H7 mediante el Kit Miniprep PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification.



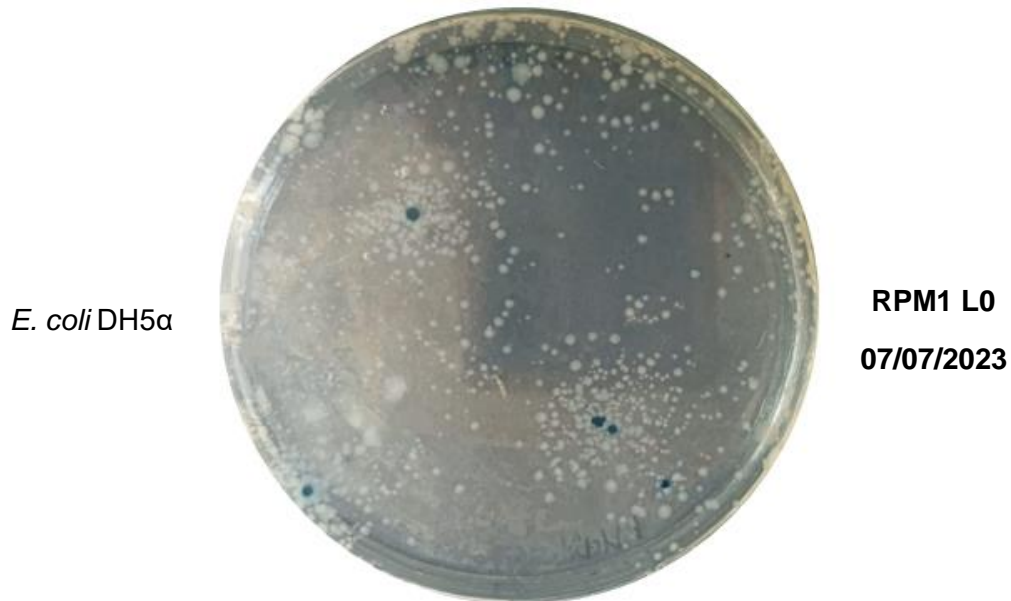
Nota. Marcador de peso molecular: 1kb DNA Ladder de Promega™. (H7) Plásmido pFH114.

Siembra de *E. coli* transformadas

Luego de sembrar las células de *E. coli* transformadas en medio LB, al que se añadió el antibiótico correspondiente a cada nivel, y tras incubarlas a 37°C durante aproximadamente 24 horas, se observaron colonias con coloración blanca, asociadas con las células que albergan el plásmido ensamblado en cada nivel, así como colonias azules, que marcan la presencia de células que contienen plásmidos no ensamblados, cuya coloración es el resultado de la actividad del gen *lacZ* dentro de las células bacterianas, ya que este gen codifica a la enzima β -galactosidasa, la cual es capaz de metabolizar el sustrato X-gal, responsable de este resultado.

Figura 18

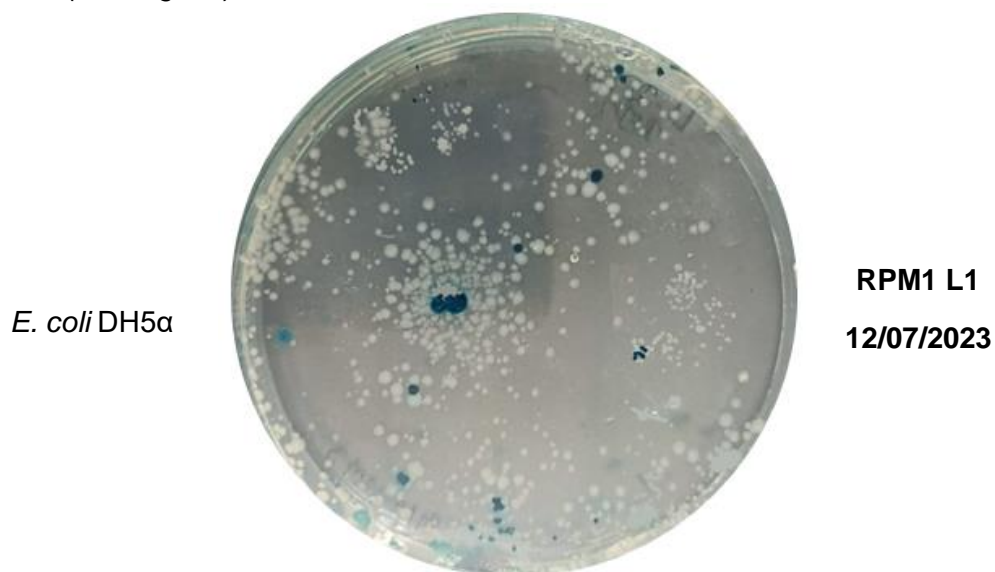
E. coli DH5 α con plásmido ensamblado L0 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Kanamicina (100 mg/mL)



Nota: Dentro de las colonias de *E. coli* DH5 α , se encuentra el plásmido ensamblado de L0, el cual contiene el sgRNA de la región promotora de RPM1 y el Backbone (pFH113).

Figura 19

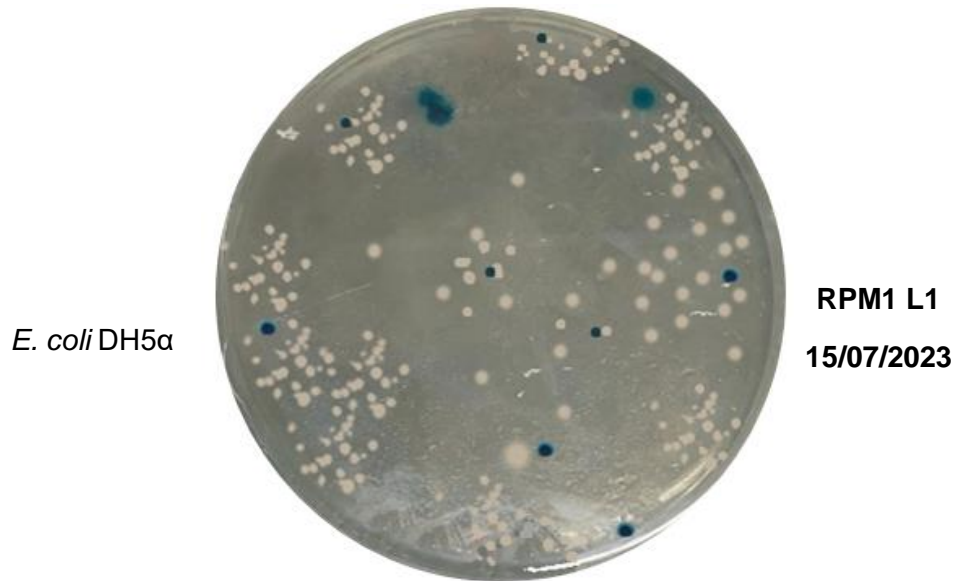
E. coli DH5 α con plásmido ensamblado L1 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Ampicilina (100 mg/mL)



Nota: Dentro de las colonias de *E. coli* DH5 α , se encuentra el plásmido ensamblado de L0, el cual contiene el sgRNA de la región promotora de RPM1 y el Backbone (pFH113).

Figura 20

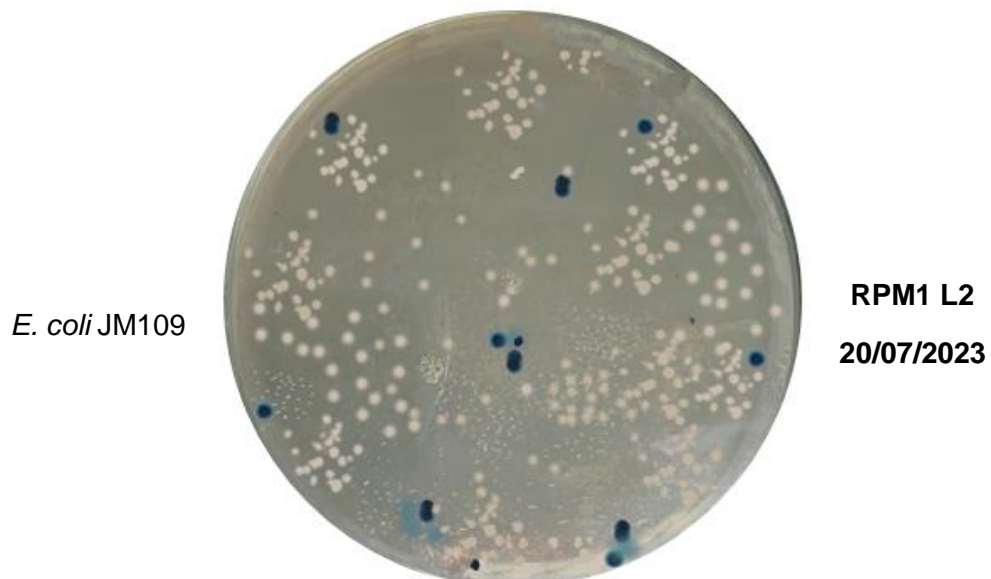
E. coli DH5 α con plásmido ensamblado L2 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Kanamicina (100 mg/mL)



Nota. Dentro de las colonias de *E. coli* DH5 α , se encuentra el plásmido ensamblado de L2, que tiene al promotor Pol III, el sgRNA, la SpCas9 y un End-linker.

Figura 21

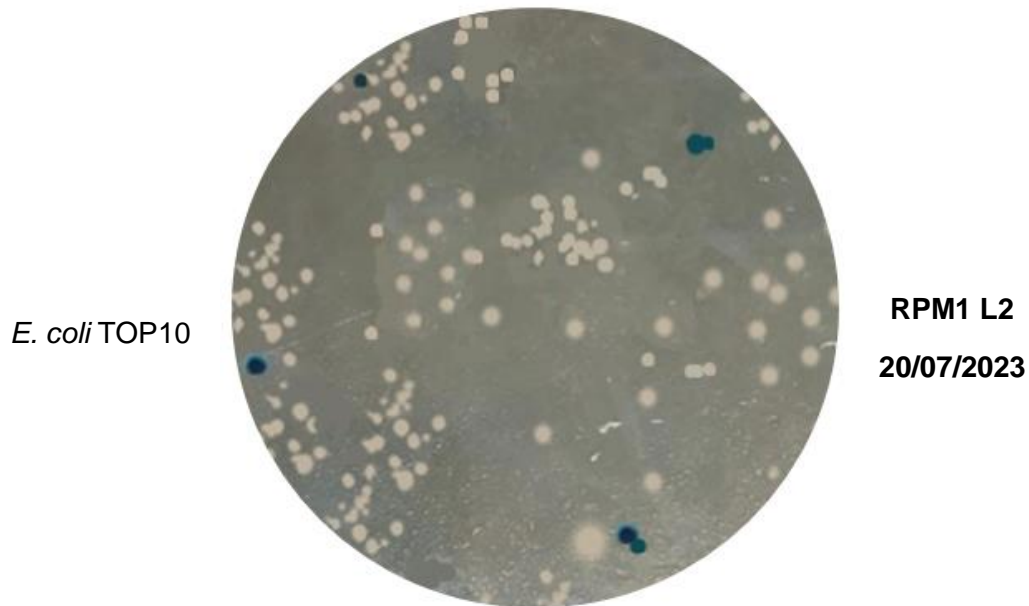
E. coli JM109 con plásmido ensamblado L2 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Kanamicina (100 mg/mL)



Nota. Dentro de las colonias de *E. coli* JM109, se encuentra el plásmido ensamblado de L2, que tiene al promotor Pol III, el sgRNA, la SpCas9 y un End-linker.

Figura 22

E. coli TOP10 con plásmido ensamblado L2 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Kanamicina (100 mg/mL)



Nota. Dentro de las colonias de *E. coli* TOP10, se encuentra el plásmido ensamblado de L2, que tiene al promotor Pol III, el sgRNA, la SpCas9 y un End-linker.

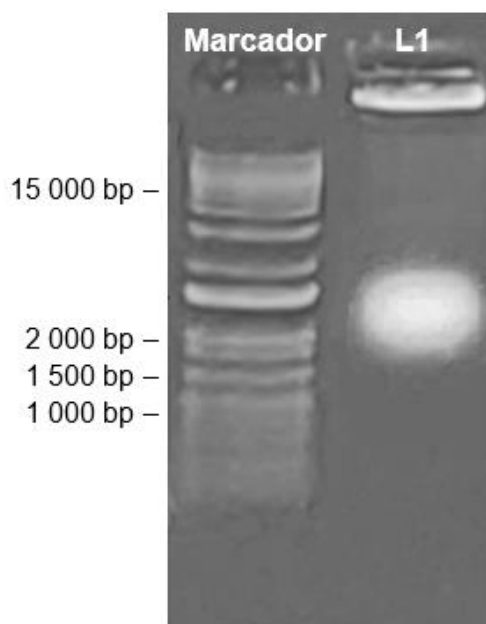
Colony PCR

Para validar la correcta inserción de los plásmidos ensamblados, se llevó a cabo una PCR de Colonias. En esta etapa, se seleccionaron de dos a tres colonias transformadas con las construcciones de niveles 1 (L1) y 2 (L2), basándose en el fenotipo observado, es decir, la característica de presentar colonias con coloración blanca.

Los resultados obtenidos para el L1 se exponen en la Figura 23, los cuales indican que el tamaño del inserto obtenido es cercano al esperado. Los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR amplificaron un producto de 1766 pb, lo cual concuerda con el tamaño esperado del inserto. Esta concordancia sugiere que las células seleccionadas fueron transformadas exitosamente con la construcción específica del nivel 1.

Figura 23

Confirmación de la transformación de E. coli DH5α con el plásmido ensamblado de L1 a través de una PCR de colonia.



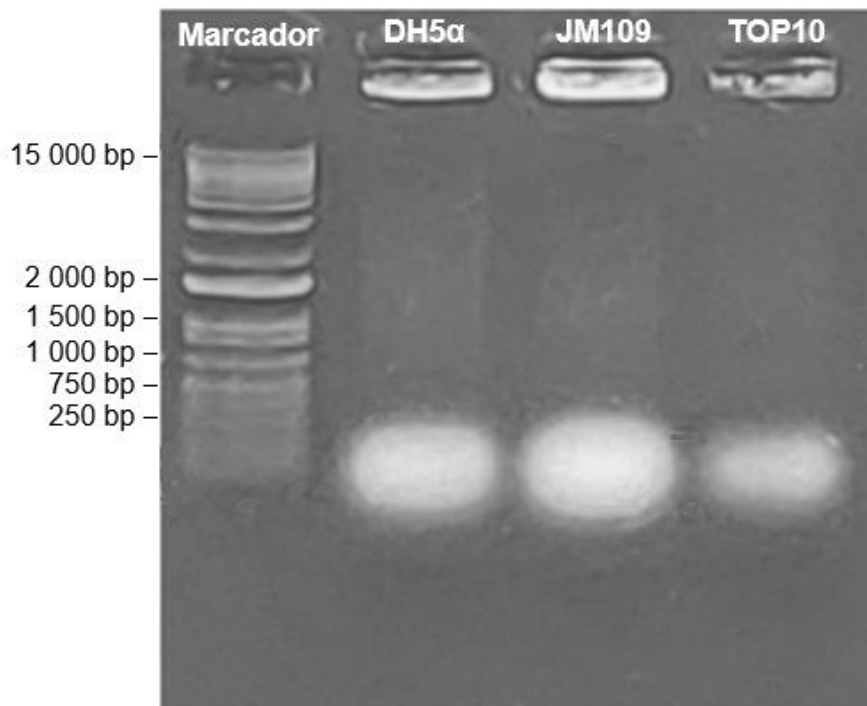
Nota. Marcador de peso molecular: 1kb DNA Ladder de Promega™. El carril (L1) corresponde al producto amplificado del constructo de nivel 1 hallado en *E. coli* DH5α de 1766 pb.

De manera similar, se procedió a la selección de dos a tres colonias blancas transformadas de cada una de las cepas de *E. coli* utilizadas (DH5α, JM109 y TOP10), con la construcción correspondiente a L2.

Sin embargo, el análisis electroforético de las amplificaciones generadas en este proceso reveló una banda de peso molecular uniforme, con un tamaño inferior a 250 pb. Este patrón indica claramente que los oligonucleótidos utilizados en esta etapa no lograron amplificar el producto esperado, que debería tener un tamaño de 1059 pb, según se muestra en la Figura 24.

Figura 24

Confirmación de la transformación de *E. coli* DH5 α , JM109 y TOP10 con el plásmido ensamblado de L2 a través de una PCR de colonia



Nota. Marcador de peso molecular: 1kb DNA Ladder de PromegaTM. Los siguientes carriles corresponden al producto amplificado del constructo de L1 hallado en *E. coli* DH5 α , JM109 y TOP10, según corresponde.

Extracción de ADN plasmídico de las células de *E. coli* transformadas

En la Figura 25 se muestran los resultados de la obtención de ADN plasmídico del nivel 0 (L0). El análisis electroforético reveló un patrón de bandeo consistente, en donde el tamaño de las bandas es aproximadamente 1900pb, en relación al marcador de peso molecular, lo cual confirma que el plásmido extraído corresponde al constructo ensamblado de L0 con un peso molecular de 1979 pb. Además, la concentración y los índices de pureza obtenidos se presentan en la Tabla 12.

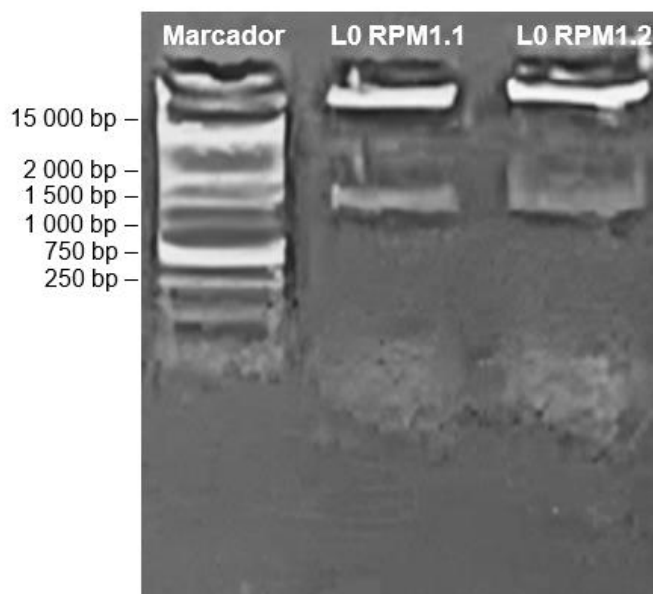
Tabla 12

Cuantificación del ADN plasmídico del constructo L0 extraído mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM™, basado en Sambrook, et al., (1989).

Fecha	Plásmido	Muestra	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/230)
05/07/2023	L0_RPM1	L0_RPM1.1	2532	1,961	2,032
	L0_RPM1	L0_RPM1.2	2562	1,828	2,216
08/07/2023	L0_RPM1	L0_RPM1.3	1952	1,843	2,041
	L0_RPM1	L0_RPM1.4	1745	1,911	2,007

Figura 25

Electroforesis gel agarosa al 1.5% de Buffer TAE del plásmido L0 extraído mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM™, basado en Sambrook, et al., (1989).



Nota. Marcador de peso molecular: 1kb DNA Ladder de Promega™. Los carriles L0 RPM1.1 y L0 RPM1.2 corresponden al ADN plasmídico extraído del constructo de nivel 0.

En la Figura 26 se muestran los resultados de la obtención de ADN plasmídico del nivel 1 (L1). El análisis electroforético reveló un patrón de bandeo consistente, en donde el tamaño de las bandas es de aproximadamente 5900 pb, en relación al marcador de peso

molecular, lo cual confirma que el plásmido extraído corresponde al constructo ensamblado de L1 con un peso molecular de 5095 pb. Además, la concentración y los índices de pureza obtenidos se presentan en la Tabla 13.

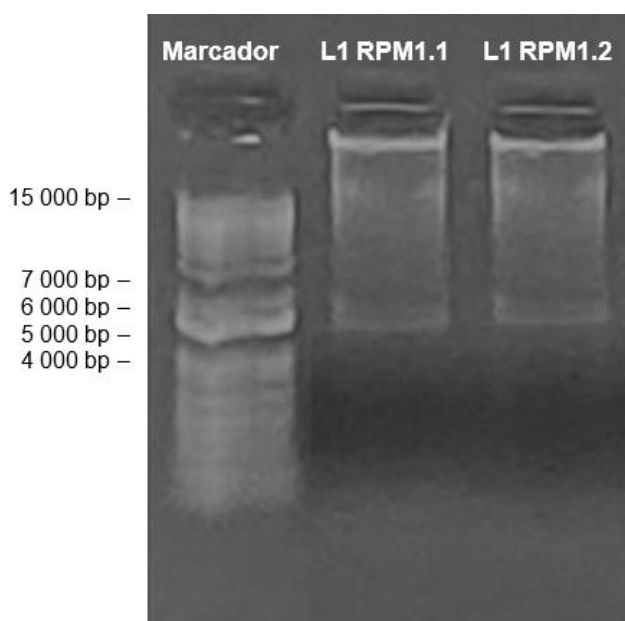
Tabla 13

Cuantificación del ADN plasmídico del constructo L1 extraído mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM™, basado en Sambrook, et al., (1989).

Fecha	Plásmido	Muestra	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/230)
11/07/2023	L1_RPM1	L1_RPM1.1	2215	1,857	2,053
	L1_RPM1	L1_RPM1.2	1989	1,967	2,027
26/07/2023	L1_RPM1	L1_RPM1.3	1542	1,942	2,031
	L1_RPM1	L1_RPM1.4	1678	1,842	2,141

Figura 26

Electroforesis gel agarosa al 1% de Buffer TAE del plásmido L1 extraído mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM™, basado en Sambrook, et al., (1989).



Nota: Marcador de peso molecular: 1kb DNA Ladder de Promega™. Los carriles L1 RPM1.1 y L1 RPM1.2 corresponden al ADN plasmídico extraído del constructo de nivel 1.

Adicionalmente, en la Figura 27 se muestran los resultados de la obtención de ADN plasmídico del nivel 2 (L2). El análisis electroforético reveló un patrón de bandeo consistente, en donde el tamaño de las bandas es de aproximadamente 14000 pb, en relación al marcador de peso molecular, lo cual confirma que el plásmido extraído corresponde al constructo ensamblado de L2 con un peso molecular de 14 923 pb. Además, la concentración y los índices de pureza obtenidos se presentan en la Tabla 14.

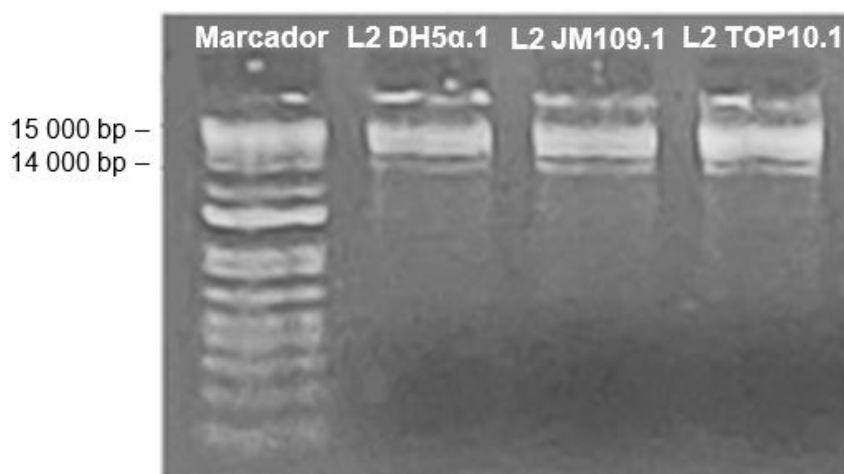
Tabla 14

Cuantificación del ADN plasmídico del constructo L2 extraído mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM™, basado en Sambrook, et al., (1989).

Fecha	Plásmido	Muestra	Concentración (µg/mL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/230)
	L2_RPM1	L2_DH5α.1	1530	2,042	1,845
05/8/2023	L2_RPM1	L2_JM109.1	1476	2,136	1,767
	L2_RPM1	L2_TOP10.1	1698	2,023	1,898
	L2_RPM1	L2_DH5α.2	1215	2,015	1,953
08/08/2023	L2_RPM1	L2_JM109.2	1322	2,135	1,857
	L2_RPM1	L2_TOP10.2	1545	2,032	1,967

Figura 27

Electroforesis gel agarosa al 1% de Buffer TAE del plásmido L2 extraído de E. coli DH5α, JM109 y TOP10 mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por iGEM™, basado en Sambrook, et al., (1989).



Nota. Marcador de peso molecular: 1kb DNA Ladder de Promega™. Los carriles L2_DH5α, L2_JM109 y L2_TOP10, corresponden al ADN plasmídico extraído del constructo de nivel 2, de las tres cepas de *E. coli*.

Eficiencia de transformación (ET)

Para el cálculo de la eficiencia de transformación en cada nivel y cepa de *E. coli* utilizada se utilizaron los siguientes parámetros:

- **Tasa de Dilución** = 5×10^6
- **Volumen de Siembra** = 100 μ L
- **Volumen de Transformación** = 52 μ L
- **ADN Sembrado L0** = 8,33 μ g
- **ADN Sembrado L1** = 7,15 μ g
- **ADN Sembrado L2** = 5,63 μ g

En las tablas 15, 16 y 17 se observan los resultados obtenidos para cada nivel, donde estos datos proporcionan una visión detallada de cómo la ET varía en función de los diferentes niveles y condiciones experimentales.

Tabla 15

Eficiencia de transformación de E. coli DH5α en relación a la inserción del constructo ensamblado de nivel 0 (L0).

Cepa	Repetición	Número de Colonias	UFC	TE (UFC/ μ g)	Media \bar{x} TE
DH5α	1	135	$3,51 \times 10^8$	$4,21 \times 10^7$	
DH5α	2	122	$3,17 \times 10^8$	$3,80 \times 10^7$	$4,30 \times 10^7$
DH5α	3	157	$4,08 \times 10^8$	$4,90 \times 10^7$	

Tabla 16

Eficiencia de transformación de E. coli DH5α en relación a la inserción del constructo ensamblado de nivel 1 (L1).

Cepa	Repetición	Número de Colonias	UFC	TE (UFC/ μ g)	Media \bar{x} TE
DH5 α	1	223	5,79 x 10 ⁸	8,11 x 10 ⁷	
DH5 α	2	215	5,58 x 10 ⁸	7,81 x 10 ⁷	7,87 x 10 ⁷
DH5 α	3	212	5,50 x 10 ⁸	7,70 x 10 ⁷	

Tabla 17

Eficiencia de transformación de E. coli DH5 α , JM109 y TOP10 en relación a la inserción del constructo ensamblado de L2.

Ede CEPA	Repetición	Número de Colonias	UFC	TE (UFC/ μ g)	Media \bar{x} TE
DH5 α	1	75	1,95 x 10 ⁸	3,46 x 10 ⁷	
DH5 α	2	83	2,15 x 10 ⁸	3,83 x 10 ⁷	3,55 x 10 ⁷
DH5 α	3	72	1,90 x 10 ⁸	3,37 x 10 ⁷	
JM109	1	110	2,86 x 10 ⁸	5,07 x 10 ⁷	
JM109	2	136	3,53 x 10 ⁸	6,27 x 10 ⁷	5,64 x 10 ⁷
JM109	3	121	3,15 x 10 ⁸	5,58 x 10 ⁷	
TOP 10	1	88	2,28 x 10 ⁸	4,06 x 10 ⁷	
TOP 10	2	71	1,85 x 10 ⁸	3,28 x 10 ⁷	3,63 x 10 ⁷
TOP 10	3	77	2,00 x 10 ⁸	3,55 x 10 ⁷	

Diseño experimental

A través de un análisis de varianza (ANOVA), se ha constatado una diferencia significativa en cuanto a la eficiencia de transformación entre las cepas de *E. coli* JM109, con respecto a las cepas TOP10 y DH5 α , con un nivel de significancia establecido en 0,05. Reforzando este hallazgo, una prueba de Tukey evidencia diferencias entre los distintos tratamientos, como se muestra en la Figura 28.

Al examinar las medias de las eficiencias de transformación, se verifica que la cepa JM109 fue la más eficiente en términos de transformación (Figura 29). Por lo tanto, este resultado sugiere que las condiciones experimentales o las características propias de la cepa JM109 pudieron haber influido en su mayor capacidad de aceptar y expresar el material genético transformado, en comparación con las otras cepas evaluadas (Top10 y DH5 α).

Figura 28

Análisis de varianza (ANOVA), respecto a la eficiencia de transformación en las cepas Top10, DH5 α y JM109 de E. coli.

Medidas resumen

Variable	n	Media	D.E.	CV	Min	Máx
DH5 α	3	3.55	0.24	6.86	3.37	3.83
JM109	3	5.64	0.60	10.68	5.07	6.27
TOP10	3	3.63	0.40	10.91	3.28	4.06

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
TE UFC/ μ g	9	0.90	0.87	13.25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	475.00	2	237.00	26.91	0.0010
CEPA	475.00	2	237.00	26.91	0.0010
Error	52.00	6	8.00		
Total	528.00	8			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=23542106,34714

Error: 883.06 gl: 6

CEPA	Media	n	E.E.	
DH5 α	3.55	3	542.54	A
JM109	5.64	3	542.54	B
TOP10	3.63	3	542.54	A

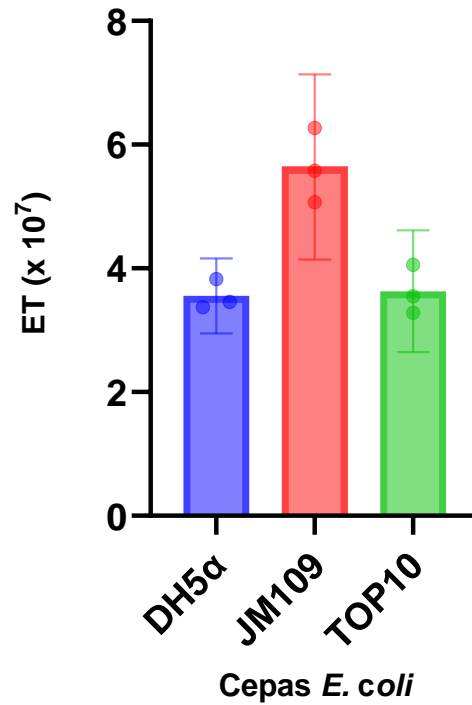
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Nota. Elaborado con InfoStat.

Figura 29

Gráfico de barras de la media y desviación estándar (SD) de la eficiencia de transformación de las tres repeticiones en las cepas TOP10, DH5 α y JM109 de *Escherichia coli*.

Eficiencia de Transformación (ET) en *E. coli*



Nota. Elaborado con Prism GraphPad 10.

De esta forma, se cumple con la hipótesis alternativa: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$ ya que existen diferencias significativas en la eficiencia de transformación (ET) de *E. coli* JM109, con respecto a las cepas DH5 α y TOP10.

Capítulo V: Discusión

El objetivo de este proyecto radicó en la construcción del vector plasmídico para la edición genética del promotor RPM1 asociado con la resistencia al marchitamiento por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* en banano. Se consideraron varios factores durante la selección de los sgRNA, incluida la especificidad y la eficiencia. Las herramientas bioinformáticas predijeron que el sgRNA RPM1 elegido tendría más del 90% de especificidad, lo que significa que se minimiza la escisión fuera del objetivo en otras partes del genoma. De acuerdo a Doench et al., (2016), la especificidad de la secuencia objetivo indica que esta debe ser única en el genoma para prevenir efectos fuera del objetivo.

El segundo sgRNA tuvo estimaciones más altas de eficiencia de corte en el objetivo (> 90%), pero una mayor propensión a la escisión fuera del objetivo en sitios genómicos no deseados. Según Park et al., (2021), este parámetro refleja la capacidad de un complejo CRISPR-Cas9 para inducir cortes en la secuencia de ADN deseada. Además, mediante la eficiencia de escisión es posible medir el porcentaje de moléculas de ADN objetivo que Cas9 separa con éxito después de la introducción del sgRNA. De acuerdo a (Liu et al., 2022), los sgRNA con una eficiencia de escisión, mayor al 50%, presentan una alta probabilidad de generar la modificación genética deseada en el sitio objetivo, ya que la mayoría de las moléculas de ADN son cortadas eficientemente por Cas9, así como una menor necesidad de seleccionar y analizar grandes cantidades de clones celulares, puesto que una alta proporción tendrá la edición esperada. Además, el contenido de GC se encuentra en un 46%, lo cual está dentro del rango óptimo, el cual oscila entre un 40 a un 80 % (Liu et al., 2022), ya que un contenido de GC excesivamente alto o bajo puede influir en la estabilidad del sgRNA y en la eficiencia de corte, y en adición, los sgRNA con un porcentaje de GC de aproximadamente el 50 % se ven favorecidos por una escisión eficiente en el objetivo (Labuhn et al., 2018).

Si bien es deseable maximizar la eficiencia de la escisión en el objetivo, los efectos fuera del objetivo pueden ser extremadamente perjudiciales al causar mutaciones no

deseadas, especialmente en el genoma de un cultivo. De acuerdo a Haeussler et al., 2016), los efectos fuera del objetivo presentan el mayor desafío que enfrenta CRISPR-Cas9. Por esta razón, se dio prioridad el sgRNA con una mayor eficiencia y especificidad prevista en el objetivo. El análisis fuera del objetivo mostró que el primer sgRNA tenía una baja probabilidad (<15 %) de cortar en posibles loci fuera del objetivo. De esta forma, aunque la eficiencia del sgRNA elegido era inferior a la ideal, su perfil de especificidad mejorado justificó la selección cuando se comparó con la actividad en el objetivo y la necesidad de minimizar los posibles efectos fuera del objetivo Naeem et al., (2020). Se puede buscar una mayor optimización de los sgRNA de baja eficiencia para mejorar el corte y mantener una alta especificidad.

La selección de plásmidos para la construcción del vector plasmídico fue guiada conforme a los criterios de diseño específicos para la eficacia de expresión y edición en monocotiledóneas, como es el caso de *Musa acuminata*. El plásmido pFH31 se eligió por su promotor TaU3, el cual permite impulsar la expresión de sgRNA. De acuerdo a Yue et al., (2020), los promotores U6 y U3 pueden aumentar los niveles de sgRNA para mejorar la mutagénesis. Adicionalmente, demostraron que el promotor TaU3 proporcionó una expresión óptima de sgRNA y una eficiencia de edición en monocotiledóneas mediante la administración mediada por *Agrobacterium spp.* (Yue et al., 2020).

Además, se optó por el plásmido pFH114 ya que dentro de este se encuentra el casete ZmUBIp:BAR::NOST, el cual se asocia a la identificación de células o plantas modificadas genéticamente que ostentan el gen de resistencia "BAR". Este gen está regulado por el promotor de maíz "ZmUBIp" y el terminador "NOST", lo cual asegura la supervivencia de las plantas modificadas genéticamente incluso en presencia del herbicida glufosinato de amonio. Por lo tanto, la transcripción BAR por medio de la secuencia NOST asegura la expresión génica correcta (Liou et al., 2014).

La nucleasa SpCas9 en pFH23 media en la escisión del ADN guiada por el sgRNA. Shojaei Baghini et al., (2021), describen que la unión de Cas9 a la secuencia objetivo de sgRNA permite que los dominios HNH y RuvC corten cada uno una cadena de ADN,

creando una ruptura de doble cadena en el sitio objetivo, y esto a su vez permite la edición de genes como knockouts, es decir, introducir mutaciones en el gen de interés, dando lugar en la interrupción de su función normal.

Los plásmidos fueron obtenidos de los kits *MoClo CRISPR/Cas Toolkit for Plants* - #1000000159 y *MoClo Tool Kit* - #1000000044 de AddGene™), los cuales permiten el ensamblaje modular del promotor, el sgRNA, la Cas9 y marcadores de selección de plantas en un vector unificado. Las principales ventajas son la construcción simplificada, la ligadura de alta eficiencia y la flexibilidad para personalizar los elementos (Bird et al., 2022). Para el aislamiento del ADN plasmídico, se utilizó el protocolo de extracción de plásmido casero basado en lisis alcalina propuesto por iGEM™, basado en (Sambrook et al., 1989), mediante el cual es posible desnaturalizar selectivamente el ADN cromosómico mientras se deja los plásmidos intactos, ya que segrega el plásmido y el ADN, al someterlos a una desnaturalización inducida por álcali, lo que elimina la necesidad de las tensiones mecánicas inherentes a otros métodos de disrupción celular.

Tanto el protocolo de lisis alcalina, como el kit Miniprep PureLink™ emplean NaOH para lisar las células y precipitar los desechos. Sin embargo, el kit PureLink arrojó una concentración insuficiente de ADN plasmídico, lo que puede deberse a las limitaciones de la columna de resina (Bird et al., 2022). Los sistemas basados en resinas presentan ciertas limitaciones, particularmente en términos de velocidad de flujo, que pueden verse influenciadas por el tamaño del plásmido, donde en los plásmidos de mayor tamaño disminuyen los sitios de unión disponibles dentro de los grupos de intercambio iónico de la membrana de la resina, lo que impide la difusión eficiente de biomoléculas a través de los poros de la resina. Como el tamaño del plásmido final era mayor a 10 kb, la velocidad de flujo a través de los poros de la columna se reduce, disminuyendo los sitios de unión y ralentizando la difusión (Zhang et al., 2015).

No obstante, cabe señalar que para el caso del kit Miniprep PureLink™, la capacidad de unión de 30 µg y el volumen de almacenamiento de 2,5 mL, junto con el alto número de copias del plásmido (>1000 copias) y la concentración (100 ng/µL), significaron que la

muestra de 3 mL probablemente superó la capacidad de la columna. Además, Zhang et al., (2015), destacan la importancia de evitar la contaminación por ARN en la muestra antes de colocar la columna. La elución del plásmido va acompañada de ARN de alto peso molecular, lo que introduce impurezas durante la purificación, lo que finalmente se refleja en proporciones de $A_{260}/A_{280} < 1,6$ y $A_{260}/A_{230} < 1,5$ durante la cuantificación del ADN del plásmido. Mediante el Kit de PureLink los valores obtenidos fueron de 1,3 y 1,1, lo que indica contaminación por ARN. No obstante, un pretratamiento con RNAsa podría mejorar la pureza (Sasagawa, 2018).

Por el contrario, mediante el protocolo de lisis alcalina se produjo 1250 ng/ μ L de plásmido con $A_{260}/A_{280} = 1,9$ y $A_{260}/A_{230} = 2,1$ en promedio, cumpliendo los criterios de pureza. De esta forma, la lisis alcalina brinda altos rendimientos y pureza. Además, ajustar el buffer de unión podría mejorar el rendimiento del kit (Sasagawa, 2018). Por otro lado, mediante la reacción de corte y ligación fue posible unir fragmentos de ADN entre sí de una manera específica y controlada. En el ensamblaje Golden Gate, la ligasa T7 une los extremos cohesivos generados por BbsI y BsaI, fusionando de manera precisa el promotor, sgRNA, Cas9 y marcadores de plantas en un solo vector. Las enzimas de restricción BbsI y BsaI hacen posible generar los extremos cohesivos complementarios reconocidos por la ligasa. Cada enzima corta en sus sitios específicos flanqueando los fragmentos, creando salientes que se aparean. Esto permite el ensamblaje direccional de las piezas en el orden y orientación deseados (Pryor et al., 2020).

La ventaja clave de realizar la digestión, es que genera extremos cohesivos únicos y complementarios en los fragmentos de ADN que serán ensamblados. Al cortar los sitios BbsI y BsaI flanqueando cada parte, se generan salientes compatibles que pueden unirse específicamente (Marillonnet & Grütznér, 2020). Esto permite ensamblar las piezas en la orientación y orden deseados. Realizar el corte y la ligación en un solo paso simplifica el proceso, pero posiblemente, de acuerdo a (Weber et al., 2011), se generarían extremos cohesivos únicos, resultando en uniones inespecíficas, no se podría controlar la orientación de las piezas ensambladas, y existe una alta probabilidad de que se formen productos no

deseados como dímeros de fragmentos idénticos.

Idealmente, mediante la ligación no se debería perder ningún fragmento, ya que los cortes de BbsI y BsaI ocurren en las regiones intermedias entre partes adyacentes. Sin embargo, una ligación ineficiente podría causar la pérdida de fragmentos terminales si permanecen sin unir. La eficiencia de ligación depende de factores como la longitud de extremos cohesivos y concentración de ADN. La formación de autodímeros entre fragmentos idénticos disminuye el rendimiento, por lo que en el diseño se deben evitar repeticiones, para minimizar este riesgo (Pryor et al., 2020).

El corte con BbsI y BsaI creó salientes complementarios entre el promotor, el sgRNA, Cas9 y las partes del marcador de plantas del kit MoClo. Luego, la ligadura ensambló con precisión estos elementos. La metodología Golden Gate evita reordenamientos indeseables y proporciona fusiones perfectas. Solo se combinan las piezas previstas. El cribado de colonias y la confirmación mediante PCR confirmaron el vector correctamente ensamblado que contenía el promotor RPM1, sgRNA, Cas9 y segmentos marcadores de plantas (Bird et al., 2022).

Por otro lado, la PCR de colonia (Colony PCR) permite comprobar la presencia del plásmido ensamblado con los fragmentos de interés en las colonias bacterianas transformadas. De acuerdo a Rodd et al., (2023), este método permite una detección rápida y directa de los clones positivos que contienen el plásmido ensamblado, sin necesidad de aislar ADN plasmídico, al utilizar cebadores específicos, confirma que la colonia contiene el plásmido con la construcción genética correcta y permite analizar un gran número de colonias en paralelo de manera eficiente.

No obstante, existen alternativas a la PCR de colonia, como la hibridación de colonias mediante sondas marcadas complementarias a la secuencia de interés, ensayos enzimáticos sobre lisados de colonias buscando actividad del gen clonado y secuenciación directa de ADN plasmídico aislado de cultivos de colonias individuales (Micard et al., 1985). Sin embargo, estas alternativas requieren más pasos de manipulación y no ofrecen la

velocidad y simplicidad de la PCR de colonia para identificar clones positivos portando la construcción del plásmido de interés (Rodd et al., 2023).

Mediante, la transformación bacteriana fue posible introducir el ADN plasmídico el cual contenía la sgRNA dirigido a la región promotora de RPM1. Previo a la transformación, se debe considerar realizar células químicamente competentes, con lo cual hace posible la inserción del vector plasmídico de interés en la bacteria. Para las transformaciones en L0, L1 y L2, se usó *E. coli* DH5 α debido a su competencia superior para plásmidos más grandes (Micard et al., 1985). En este procedimiento, el cribado azul-blanco permitió la identificación visual de colonias con inserciones. Las colonias azules y blancas se pueden observar gracias a la inclusión del gen lacZ en el vector plasmídico. Las bacterias con plásmidos sin inserto expresan la enzima β -galactosidasa, que produce el color azul en presencia del sustrato X-gal (Green & Sambrook, 2019).

De acuerdo con (Asif et al., 2017), el tiempo de tratamiento con calcio para generar células competentes es crítico. Tiempos cortos (menos de 10 min) disminuyen la competencia, así como tiempos prolongados (más de 30 min) también la reducen. El rango óptimo es de 10-20 minutos. Además, la concentración de calcio, temperatura y aireación durante la competencia influyen, donde se recomienda concentraciones de 50-100 mM CaCl₂, temperaturas de 0-4°C y agitación. Por otro lado, el tiempo de choque térmico debe optimizarse según cepa y plásmido, donde lo aconsejable es de 30 a 120 segundos, ya que choques muy cortos o muy largos reducen transformantes. Adicionalmente, medios ricos en nutrientes como SOB con glucosa o LB aumentan la recuperación tras el choque térmico.

Con respecto a la eficiencia de transformación, la cepa *E. coli* JM109 alcanzó la mayor eficiencia de transformación (ET) en comparación con TOP10 y DH5 α , lo cual se atribuye tanto al procedimiento de competencia como a características genotípicas. La captación y establecimiento del ADN foráneo durante la transformación dependen críticamente de los buffers utilizados (Liu et al., 2018). El catión Mg²⁺ aumenta la ET al mejorar la captación de DNA (Asif et al., 2017). Aunque ambos buffers contenían Mg²⁺, CCMB80 tiene más cationes divalentes, lo que debería favorecer la ET en JM109 y DH5 α .

Sin embargo, estudios indican que el buffer TSS, con DMSO, PEG y cationes, maximiza la ET al facilitar la absorción de DNA. Además, el DMSO posibilita la desestabilización de las membranas, mientras que el PEG promueve la unión entre el ADN exógeno y la célula (Sherba et al., 2020).

Además, diferencias genotípicas en el gen *recA* influyen. JM109 es *recA+*, mientras TOP10 y DH5 α son *recA-* (Yang et al., 2022). *RecA* permite una recombinación y reparación de DNA más eficiente, manteniendo los plásmidos estables. La mutación *recA-* dificulta estas funciones, impactando negativamente la ET (Yang et al., 2022). Finalmente, el mayor tiempo de almacenamiento de las células TOP10 y DH5 α (72 horas) en comparación a JM109 (48 horas), puede haber reducido su competencia y ET, como sugiere (Gao et al., 2011). De esta forma, la optimización de buffers, genotipo bacteriano y condiciones de almacenamiento son esenciales para maximizar la eficiencia de transformación.

Dentro de las cepas seleccionadas, JM109 presenta una alta eficiencia de transformación, siendo la única que contiene al gen *recA+*, el cual permite recombinación homóloga eficiente, no obstante, abarca endonucleasas de restricción y puede degradar ADN foráneo (Liu et al., 2014). Por el lado de la cepa *E. coli* DH5 α , ostenta alta estabilidad de ADN clonado, y genotipo *recA-* con lo cual evita reordenamientos, sin embargo, no es capaz de recombinar ADN foráneo. En el caso de TOP10, presenta alta transformación de cadenas de ADN de gran tamaño y de igual manera contiene al gen *recA-*, y adicionalmente su estabilidad de clonación es menor. Por lo tanto, para el ensamblaje de plásmidos, JM109 podría ser mejor por su alta eficiencia de transformación y habilidad de recombinación homóloga, útil para unir fragmentos con regiones solapantes (Liu et al., 2018).

Además, dentro de los factores que mejoran la eficiencia de transformación, se puede considerar la existencia de cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} , los cuales estabilizan y desestabilizan la pared celular para permitir la entrada de DNA foráneo al hacerla más permeable de forma transitoria. Por otro lado, agentes permeabilizantes como DMSO, son capaces de interactuar con las membranas celulares, alterando interacciones iónicas y desestabilizando transitoriamente la bicapa lipídica para facilitar el paso de DNA, y

la presencia de polímeros como PEG, incrementarán la capacidad de inducción de la formación de espacios entre las moléculas de agua, promoviendo la interacción entre el DNA y la superficie celular para mejorar la captación (Sherba et al., 2020). Adicionalmente, de acuerdo a Asif et al., (2017), la refrigeración o congelación, va a ayudar a disminuir el metabolismo celular, preservando la competencia para captar DNA foráneo por más tiempo.

En conjunto, estos factores crean las condiciones fisicoquímicas propicias en la preparación celular, choque térmico y recuperación que maximizan la probabilidad de entrada y establecimiento estable del DNA foráneo transformante en la bacteria, por lo que deben optimizarse en conjunto para lograr la máxima eficiencia de transformación.

Conclusiones

La construcción de un vector de edición CRISPR-Cas9 dirigido al promotor RPM1 para la resistencia a *Fusarium* en plátanos (*Musa acuminata*) implicó un enfoque *in silico*, así como un enfoque *in vitro*. El análisis bioinformático de la secuencia del promotor RPM1 identificó elementos reguladores clave, utilizando herramientas en línea como ORF Finder y BLAST, lo Así, por medio de herramientas computacionales como CRISPOR y Benchling, se establecieron sgRNA con más del 90 % de actividad en el objetivo y un potencial mínimo fuera del objetivo, cumpliendo con los criterios de edición de precisión, y permitiendo así el diseño estratégico de sgRNAs para la escisión del promotor RPM1. De esta forma, el uso combinado de herramientas bioinformáticas permitió el diseño exitoso de sgRNAs con alta eficiencia y especificidad, fundamentales para la edición génica precisa.

Se implementó el ensamblaje Golden Gate a través de MoClo para construir un vector de expresión que albergaba un sgRNA, un promotor TaU3 para monocotiledóneas, endonucleasa SpCas9 y el marcador seleccionable de plantas ZmUBI_p::BAR. Así, La metodología de clonación Golden Gate resultó efectiva para ensamblar los elementos genéticos necesarios para la edición génica en un solo vector plasmídico. Adicionalmente, mediante la PCR de colonia y la electroforesis en gel de agarosa, fue posible la verificación el ensamblaje completo.

Con base en los resultados experimentales obtenidos, existen diferencias significativas en la eficiencia de transformación de las cepas de *E. coli* evaluadas. El análisis ANOVA mostró un valor $p < 0.05$, indicando que al menos una cepa tiene una eficiencia de transformación significativamente diferente. La prueba de Tukey realizada posteriormente reveló que la cepa JM109 presenta una eficiencia de transformación mayor en comparación con las cepas DH5 α y TOP10. Específicamente, la eficiencia de transformación de JM109 fue de $5,64 \times 10^7$ UFC/ μ g DNA, mientras que para DH5 α fue de $3,55 \times 10^7$ UFC/ μ g DNA y para TOP10 de $3,63 \times 10^7$ UFC/ μ g DNA. Por lo tanto, se concluye que la cepa JM109 de *E. coli* fue la más eficiente para la transformación del plásmido evaluado en comparación con DH5 α y TOP10 en las condiciones experimentales de este estudio.

La transformación de las cepas de E. coli JM109, DH5 α y Top10 permitió la replicación y el aislamiento del vector. La eficiencia de transformación superior en JM109 se atribuyó al genotipo recA+ y a las condiciones del buffer, lo que facilita la recombinación y la captación de ADN exógeno. No obstante, todas las cepas replicaron con éxito el plásmido deseado, demostrando versatilidad entre huéspedes bacterianos.

El vector plasmídico construido contiene los componentes fundamentales para realizar la edición dirigida del promotor RPM1 en banano una vez introducido en células de planta. Los resultados sientan las bases para realizar modificaciones genéticas precisas asociadas a resistencia a enfermedades en cultivos de importancia económica. De esta forma, el enfoque utilizado puede extenderse para realizar edición génica dirigida en diversos genes de interés agronómico. Sin embargo, se requieren aún estudios en la planta para evaluar la funcionalidad del vector editando el promotor RPM1 y confirmando la introducción de resistencia.

Recomendaciones

El manejo de plásmidos provenientes de los Kits comerciales (*MoClo CRISPR/Cas Toolkit for Plants* - #1000000159 y *MoClo Tool Kit* - #1000000044 de AddGene™) es fundamental para una investigación de biología molecular confiable. Los plásmidos comerciales deben almacenarse según las recomendaciones y deben etiquetarse claramente para evitar la contaminación cruzada. La prueba de identidad y pureza del plásmido mediante la caracterización, el análisis de restricción, la secuenciación o la PCR cuantitativa proporciona un control de calidad antes de su uso. Aquí se debe considerar el uso de múltiples herramientas bioinformáticas para el diseño de sgRNAs, como CRISPOR, CCTop, CHOPCHOP, entre otras. Esto permite comparar predicciones de eficiencia y especificidad. Además, los métodos analíticos como la electroforesis capilar, la HPLC y la densitometría se pueden implementar para cuantificar la homogeneidad y la estabilidad de las preparaciones de plásmidos (Urthaler et al. 2005).

Además, se debe validar experimentalmente varios sgRNAs candidatos mediante ensayos in vitro e in vivo antes de la clonación final. Esto asegura la selección del sgRNA óptimo. Se debe considerar diversas pautas para el diseño de primers para PCR específicos para la secuencia objetivo. Las herramientas bioinformáticas permiten el diseño de cebadores para regiones únicas, normalmente de 18 a 25 nt con temperaturas de fusión equivalentes de alrededor de 60 °C y un contenido de GC del 40 al 60 % para garantizar una hibridación específica. Por otro lado, deben evitarse los dímeros y las estructuras secundarias y optimizarse la distancia al sitio de amplificación. La validación experimental en plantillas ayuda a confirmar la eficacia.

Para el ensamblaje Golden Gate, las enzimas de restricción de tipo IIS como BsaI y SpeI generan voladizos únicos para la clonación unidireccional. Adicionalmente, se recomienda incluir controles positivos y negativos en los experimentos de edición génica para confirmar que los efectos observados se deben a la actividad de Cas9, lo cual puede ir acompañado de la secuenciación de sitios potenciales fuera de blanco predichos in silico para detectar no intencionadas inducidas por el sgRNA.

Por otro lado, se puede considerar optimizar protocolos de transformación bacteriana probando diferentes cepas, tiempos de choque térmico y concentraciones de ADN. Además, se podría experimentar inducir múltiples editados genómicos simultáneamente y lograr efectos combinatorios. Finalmente, es necesario evaluar la herencia estable de las modificaciones genéticas en generaciones posteriores de plantas editadas.

De esta forma, se debe aplicar un enfoque integral combinando bioinformática avanzada, diseño experimental optimizado y análisis riguroso de resultados puede potenciar al máximo el éxito en proyectos de edición génica en cultivos de interés agronómico.

Bibliografía

- Aguayo, J., Cerf-Wendling, I., Folscher, A. B., Fourrier-Jeandel, C., loos, R., Mathews, M. C., Mostert, D., Renault, C., Wilson, V., & Viljoen, A. (2021). First Report of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense Tropical Race 4 (TR4) Causing Banana Wilt in the Island of Mayotte. *Plant Disease*, 105(1), 219. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1196-PDN>
- Ahmad, F., Martawi, N. M., Poerba, Y. S., de Jong, H., Schouten, H., & Kema, G. H. J. (2020). Genetic mapping of *Fusarium* wilt resistance in a wild banana *Musa acuminata* ssp. *Malaccensis* accession. *Theoretical and Applied Genetics*, 133(12), 3409-3418. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03677-y>
- Alzate Acevedo, S., Díaz Carrillo, Á. J., Flórez-López, E., & Grande-Tovar, C. D. (2021). Recovery of Banana Waste-Loss from Production and Processing: A Contribution to a Circular Economy. *Molecules*, 26(17), 5282. <https://doi.org/10.3390/molecules26175282>
- Anchundia, D. M., Cunuhay, J. P. S., & Morán, R. P. (2021). *Análisis económico del banano orgánico y convencional en la provincia Los Ríos, Ecuador*. 23.
- Arie, T. (2019). *Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *Journal of Pesticide Science*, 44(4), 275-281. <https://doi.org/10.1584/jpestics.J19-03>
- Asif, A., Mohsin, H., Tanvir, R., & Rehman, Y. (2017). Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2169. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02169>
- Asmamaw, M., & Zawdie, B. (2021). Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics : Targets & Therapy*, 15, 353-361. <https://doi.org/10.2147/BTT.S326422>
- Bermúdez-Caraballosa, I., Cruz-Martín, M., & Concepción-Hernández, M. (2020). Biotechnological Tools for the Development of Foc TR4-Resistant or -Tolerant *Musa* spp. Cultivars. En P. A. Chong, D. J. Newman, & D. A. Steinmacher (Eds.),

- Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery* (pp. 403-431). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51358-0_20
- Bird, J. E., Marles-Wright, J., & Giachino, A. (2022). A User's Guide to Golden Gate Cloning Methods and Standards. *ACS Synthetic Biology*, *11*(11), 3551-3563. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00355>
- Birt, H. W. G., Pattison, A. B., Skarshewski, A., Daniells, J., Raghavendra, A., & Dennis, P. G. (2022). The core bacterial microbiome of banana (*Musa* spp.). *Environmental Microbiome*, *17*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s40793-022-00442-0>
- Blomme, G., Dita, M., Jacobsen, K. S., Pérez Vicente, L., Molina, A., Ocimati, W., Poussier, S., & Prior, P. (2017). Bacterial Diseases of Bananas and Enset: Current State of Knowledge and Integrated Approaches Toward Sustainable Management. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1290. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01290>
- Bonavita, G. (EST). (s. f.). *Banana Market Review*.
- Borrelli, V. M. G., Brambilla, V., Rogowsky, P., Marocco, A., & Lanubile, A. (2018). The Enhancement of Plant Disease Resistance Using CRISPR/Cas9 Technology. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01245>
- 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. *Cubense* Tropical Race 4. *EFSA Journal*, *20*(1), e07092. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7092>
- Castro, L., Calvas, B., & Knoke, T. (2015). Ecuadorian Banana Farms Should Consider Organic Banana with Low Price Risks in Their Land-Use Portfolios. *PLoS ONE*, *10*, e0120384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120384>

- Chang, A., Chau, V., & Landas, F. (2017). *Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation*. Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia. JEMI Methods.
- Dale, J., James, A., Paul, J.-Y., Khanna, H., Smith, M., Peraza-Echeverria, S., Garcia-Bastidas, F., Kema, G., Waterhouse, P., Mengersen, K., & Harding, R. (2017). Transgenic Cavendish bananas with resistance to Fusarium wilt tropical race 4. *Nature Communications*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01670-6>
- Damodaran, T., Rajan, S., Muthukumar, M., Ram Gopal, Yadav, K., Kumar, S., Ahmad, I., Kumari, N., Mishra, V. K., & Jha, S. K. (2020). Biological Management of Banana Fusarium Wilt Caused by Fusarium oxysporum f. Sp. Cubense Tropical Race 4 Using Antagonistic Fungal Isolate CSR-T-3 (Trichoderma reesei). *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.595845>
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G., & Staver, C. P. (2018). Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01468>
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology*, 34(2), 184-191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>
- Dong, O. X., & Ronald, P. C. (2019). Genetic Engineering for Disease Resistance in Plants: Recent Progress and Future Perspectives1[OPEN]. *Plant Physiology*, 180(1), 26-38. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01224>
- Engler, C., & Marillonnet, S. (2014). Golden Gate cloning. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1116, 119-131. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_9
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., S. Kaushik, K., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S.,

- Alexandrino de Souza, V. C., Sharifi-Rad, J., Melo Coutinho, H. D., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms*, 7(5), 130.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Gao, Z., Chung, E.-H., Eitas, T. K., & Dangl, J. L. (2011). Plant intracellular innate immune receptor Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* 1 (RPM1) is activated at, and functions on, the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18), 7619-7624. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104410108>
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: The Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>
- Gilbert, L. A., Horlbeck, M. A., Adamson, B., Villalta, J. E., Chen, Y., Whitehead, E. H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H. L., Bassik, M. C., Qi, L. S., Kampmann, M., & Weissman, J. S. (2014). Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*, 159(3), 647-661.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.029>
- Gleditsch, D., Pausch, P., Müller-Esparza, H., Özcan, A., Guo, X., Bange, G., & Randau, L. (2018). PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: Diversified mechanisms and structures. *RNA Biology*, 16(4), 504-517.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1504546>
- Gonzales, M. F., Brooks, T., Pukatzki, S. U., & Provenzano, D. (2013). Rapid Protocol for Preparation of Electrocompetent *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 80, 50684. <https://doi.org/10.3791/50684>
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., & Mansfield, J. (2000). The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 23(4), 441-450.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00804.x>

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Screening Bacterial Colonies Using X-Gal and IPTG: α -Complementation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(12).
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot101329>
- Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J.-B., Schneider-Maunoury, S., Shkumatava, A., Teboul, L., Kent, J., Joly, J.-S., & Concordet, J.-P. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology*, 17(1), 148.
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>
- Hahn, F., Korolev, A., Sanjurjo Loures, L., & Nekrasov, V. (2020). A modular cloning toolkit for genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 20(1), 179.
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02388-2>
- Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, 204, 63-113.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-a](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-a)
- Juven-Gershon, T., & Kadonaga, J. T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology*, 339(2), 225-229. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.009>
- Kaiser, N., Douches, D., Dhingra, A., Glenn, K. C., Herzig, P. R., Stowe, E. C., & Swarup, S. (2020). The role of conventional plant breeding in ensuring safe levels of naturally occurring toxins in food crops. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 51-66.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.042>
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. (2002). The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* Interaction. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 1, e0039. <https://doi.org/10.1199/tab.0039>
- Kim, S. H., Kwon, S. I., Saha, D., Anyanwu, N. C., & Gassmann, W. (2009). Resistance to the *Pseudomonas syringae* Effector HopA1 Is Governed by the TIR-NBS-LRR Protein RPS6 and Is Enhanced by Mutations in SRFR1. *Plant Physiology*, 150(4), 1723-1732. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139238>

- Kumar, L., SELVARAJAN, R., Iskra-Caruana, M.-L., Chabannes, M., & Hanna, R. (2015). Biology, Etiology, and Control of Virus Diseases of Banana and Plantain. *Advances in Virus Research*, *91*, 229-269. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.10.006>
- Labuhn, M., Adams, F. F., Ng, M., Knoess, S., Schambach, A., Charpentier, E. M., Schwarzer, A., Mateo, J. L., Klusmann, J.-H., & Heckl, D. (2018). Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR–Cas9 applications. *Nucleic Acids Research*, *46*(3), 1375-1385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1268>
- Larralde, M. (2022). *MoClo Documentation. Volume 1*(Chapter 1: Concepts&Definition), 3-14.
- Li, C., Deng, G., Yang, J., Viljoen, A., Jin, Y., Kuang, R., Zuo, C., Lv, Z., Yang, Q., Sheng, O., Wei, Y., Hu, C., Dong, T., & Yi, G. (2012). Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense tropical race 4. *BMC Genomics*, *13*(1), 374. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-374>
- Li, W.-M., Dita, M., Rouard, M., Wu, W., Roux, N., Xie, J.-H., & Ge, X.-J. (2020). Deep RNA-seq analysis reveals key responding aspects of wild banana relative resistance to *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense tropical race 4. *Functional & Integrative Genomics*, *20*(4), 551-562. <https://doi.org/10.1007/s10142-020-00734-z>
- Lieber, M. R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. *Annual review of biochemistry*, *79*, 181-211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: A review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, *25*(1), 1234-1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Liou, M.-R., Huang, Y.-W., Hu, C.-C., Lin, N.-S., & Hsu, Y.-H. (2014). A dual gene-silencing vector system for monocot and dicot plants. *Plant Biotechnology Journal*, *12*(3), 330-343. <https://doi.org/10.1111/pbi.12140>

- Liu, C., Zhang, L., Liu, H., & Cheng, K. (2017). Delivery Strategies of the CRISPR-Cas9 Gene-Editing System for Therapeutic Applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 266, 17-26.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012>
- Liu, J., Chang, W., Pan, L., Liu, X., Su, L., Zhang, W., Li, Q., & Zheng, Y. (2018). An Improved Method of Preparing High Efficiency Transformation Escherichia coli with Both Plasmids and Larger DNA Fragments. *Indian Journal of Microbiology*, 58(4), 448-456. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0743-z>
- Liu, X., Liu, L., Wang, Y., Wang, X., Ma, Y., & Li, Y. (2014). The Study on the factors affecting transformation efficiency of E. coli competent cells. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(3 Suppl), 679-684.
- Liu, X., Yang, J., Song, Y., Zhang, X., Wang, X., & Wang, Z. (2022). Effects of sgRNA length and number on gene editing efficiency and predicted mutations generated in rice. *The Crop Journal*, 10(2), 577-581. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.05.015>
- Macarof, A., Herrera, S., & Chuquimarca, S. (2022). *Estado del banano en Ecuador: Acumulación, desigualdad y derechos laborales*. Friedrich-Ebert-Stiftung (FES).
- Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A., & Dangl, J. L. (2002). RIN4 Interacts with Pseudomonas syringae Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in Arabidopsis. *Cell*, 108(6), 743-754. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00661-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00661-X)
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., García Onofre, J., & Jiménez-Gasco, M. del M. (2020). Genetic Diversity of Fusarium oxysporum f. Sp. Cubense, the Fusarium Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants*, 9(9), 1133.
<https://doi.org/10.3390/plants9091133>
- Manna, S., Harman, A., Accari, J., & Barth, C. (2013). Altering the selection capabilities of common cloning vectors via restriction enzyme mediated gene disruption. *BMC Research Notes*, 6, 85. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-85>

- Marillonnet, S., & Grütznert, R. (2020). Synthetic DNA Assembly Using Golden Gate Cloning and the Hierarchical Modular Cloning Pipeline. *Current Protocols in Molecular Biology*, 130(1), e115. <https://doi.org/10.1002/cpmb.115>
- Martin, G., Baurens, F.-C., Droc, G., Rouard, M., Cenci, A., Kilian, A., Hastie, A., Doležel, J., Aury, J.-M., Alberti, A., Carreel, F., & D'Hont, A. (2016). Improvement of the banana "Musa acuminata" reference sequence using NGS data and semi-automated bioinformatics methods. *BMC Genomics*, 17(1), 243. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2579-4>
- Micard, D., Sobrier, M. L., Couderc, J. L., & Dastugue, B. (1985). Purification of RNA-free plasmid DNA using alkaline extraction followed by Ultrogel A2 column chromatography. *Analytical Biochemistry*, 148(1), 121-126. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90636-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90636-0)
- Mohr, S. E., Hu, Y., Ewen-Campen, B., Housden, B. E., Viswanatha, R., & Perrimon, N. (2016). CRISPR guide RNA design for research applications. *The Febs Journal*, 283(17), 3232-3238. <https://doi.org/10.1111/febs.13777>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Naeem, M., Majeed, S., Hoque, M. Z., & Ahmad, I. (2020). Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. *Cells*, 9(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/cells9071608>
- Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., Alves, L. de F., Monteiro, L. M. O., Guazzaroni, M., & Silva-Rocha, R. (2018). The art of vector engineering: Towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial Biotechnology*, 12(1), 125-147. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13318>
- Ntui, V. O., Tripathi, J. N., & Tripathi, L. (2020). Robust CRISPR/Cas9 mediated genome editing tool for banana and plantain (Musa spp.). *Current Plant Biology*, 21, 100128. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.100128>

- Nucci, M., & Anaissie, E. (2007). Fusarium Infections in Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 695-704. <https://doi.org/10.1128/CMR.00014-07>
- Padam, B. S., Tin, H. S., Chye, F. Y., & Abdullah, M. I. (2014). Banana by-products: An under-utilized renewable food biomass with great potential. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 3527-3545. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0861-2>
- Park, J., Yoon, J., Kwon, D., Han, M.-J., Choi, S., Park, S., Lee, J., Lee, K., Lee, J., Lee, S., Kang, K.-S., & Choe, S. (2021). Enhanced genome editing efficiency of CRISPR PLUS: Cas9 chimeric fusion proteins. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95406-8>
- Pegg, K. G., Coates, L. M., O'Neill, W. T., & Turner, D. W. (2019). The Epidemiology of Fusarium Wilt of Banana. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01395>
- Perrier, X., De Langhe, E., Donohue, M., Lentfer, C., Vrydaghs, L., Bakry, F., Carreel, F., Hippolyte, I., Horry, J.-P., Jenny, C., Lebot, V., Risterucci, A.-M., Tomekpe, K., Doutrelepon, H., Ball, T., Manwaring, J., de Maret, P., & Denham, T. (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11311-11318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102001108>
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02928>
- Pryor, J. M., Potapov, V., Kucera, R. B., Bilotti, K., Cantor, E. J., & Lohman, G. J. S. (2020). Enabling one-pot Golden Gate assemblies of unprecedented complexity using data-optimized assembly design. *PLOS ONE*, 15(9), e0238592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238592>

- Raman, T., Edwin Raj, E., Muthukathan, G., Loganathan, M., Periyasamy, P., Natesh, M., Manivasakan, P., Kotteeswaran, S., Rajendran, S., & Subbaraya, U. (2021). Comparative Whole-Genome Sequence Analyses of Fusarium Wilt Pathogen (Foc R1, STR4 and TR4) Infecting Cavendish (AAA) Bananas in India, with a Special Emphasis on Pathogenicity Mechanisms. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(9), 717. <https://doi.org/10.3390/jof7090717>
- Redman, M., King, A., Watson, C., & King, D. (2016). What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 101(4), 213-215. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310459>
- Ren, J., Karna, S., Lee, H.-M., Yoo, S. M., & Na, D. (2019). Artificial transformation methodologies for improving the efficiency of plasmid DNA transformation and simplifying its use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(23-24), 9205-9215. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10173-x>
- Rodd, A. M., Jawad, A., & Nano, F. E. (2023). Bacillus subtilis small replicative plasmid collection incorporating five distinct origins of replication and compatible with Golden Gate DNA assembly. *FEMS Microbiology Letters*, 370, fnad039. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnad039>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Sambrook, J., Fritsch, E., & dan Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (Second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sardos, J., Perrier, X., Doležel, J., Hřibová, E., Christelová, P., Van den Houwe, I., Kilian, A., & Roux, N. (2016). DArT whole genome profiling provides insights on the evolution and taxonomy of edible Banana (*Musa* spp.). *Annals of Botany*, 118(7), 1269-1278. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw170>
- Sasagawa, N. (2018). Plasmid Purification. En *Plasmid*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76226>

- Sherba, J. J., Hogquist, S., Lin, H., Shan, J. W., Shreiber, D. I., & Zahn, J. D. (2020). The effects of electroporation buffer composition on cell viability and electro-transfection efficiency. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59790-x>
- Shetty, R. P., Endy, D., & Knight, T. F. (2008). Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of Biological Engineering*, *2*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-2-5>
- Shojaei Baghini, S., Gardanova, Z. R., Zekiy, A. O., Shomali, N., Tosan, F., & Jarahian, M. (2021). Optimizing sgRNA to Improve CRISPR/Cas9 Knockout Efficiency: Special Focus on Human and Animal Cell. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 775309. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.775309>
- Staver, C., Pemsl, D. E., Scheerer, L., Perez Vicente, L., & Dita, M. (2020). Ex Ante Assessment of Returns on Research Investments to Address the Impact of Fusarium Wilt Tropical Race 4 on Global Banana Production. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00844>
- Sun, J., Zhang, J., Fang, H., Peng, L., Wei, S., Li, C., Zheng, S., & Lu, J. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals resistance-related genes and pathways in *Musa acuminata* banana «Guijiao 9» in response to Fusarium wilt. *Plant Physiology and Biochemistry*, *141*, 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.022>
- Torres Bedoya, E., Bebbber, D. P., & Studholme, D. J. (2021). Taxonomic Revision of the Banana Fusarium Wilt TR4 Pathogen Is Premature. *Phytopathology*, *111*(12), 2141-2145. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-21-0089-LE>
- Tripathi, L., Ntui, V. O., Tripathi, J. N., & Kumar, P. L. (2021). Application of CRISPR/Cas for Diagnosis and Management of Viral Diseases of Banana. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 609784. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.609784>

- Vuong, U. T., Iswanto, A. B. B., Nguyen, Q., Kang, H., Lee, J., Moon, J., & Kim, S. H. (2023). Engineering plant immune circuit: Walking to the bright future with a novel toolbox. *Plant Biotechnology Journal*, 21(1), 17-45. <https://doi.org/10.1111/pbi.13916>
- Wang, D., Zhang, C., Wang, B., Li, B., Wang, Q., Liu, D., Wang, H., Zhou, Y., Shi, L., Lan, F., & Wang, Y. (2019). Optimized CRISPR guide RNA design for two high-fidelity Cas9 variants by deep learning. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12281-8>
- Wang, X., Yu, R., & Li, J. (2021). Using Genetic Engineering Techniques to Develop Banana Cultivars With Fusarium Wilt Resistance and Ideal Plant Architecture. *Frontiers in Plant Science*, 11, 617528. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617528>
- Warman, N. M., & Aitken, E. A. B. (2018). The Movement of *Fusarium oxysporum* f.sp. Cubense (Sub-Tropical Race 4) in Susceptible Cultivars of Banana. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01748>
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., & Marillonnet, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PloS One*, 6(2), e16765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>
- Wu, X., Kriz, A. J., & Sharp, P. A. (2014). Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quantitative biology*, 2(2), 59-70. <https://doi.org/10.1007/s40484-014-0030-x>
- Yang, Y., Liu, M., Wang, T., Wang, Q., Liu, H., Xun, L., & Xia, Y. (2022). An Optimized Transformation Protocol for *Escherichia coli* BW3KD with Supreme DNA Assembly Efficiency. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e02497-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02497-22>
- Yin, K., Han, T., Liu, G., Chen, T., Wang, Y., Yu, A. Y. L., & Liu, Y. (2015). A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Scientific Reports*, 5, 14926. <https://doi.org/10.1038/srep14926>
- Yoon, M., Middleditch, M. J., & Rikkerink, E. H. A. (2022). A conserved glutamate residue in RPM1-INTERACTING PROTEIN4 is ADP-ribosylated by the *Pseudomonas* effector

- AvrRpm2 to activate RPM1-mediated plant resistance. *The Plant Cell*, 34(12), 4950-4972. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac286>
- Yue, J.-J., Hong, C.-Y., Wei, P., Tsai, Y.-C., & Lin, C.-S. (2020). How to start your monocot CRISPR/Cas project: Plasmid design, efficiency detection, and offspring analysis. *Rice*, 13(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0354-2>
- Zaidi, S. S.-A., Mahas, A., Vanderschuren, H., & Mahfouz, M. M. (2020). Engineering crops of the future: CRISPR approaches to develop climate-resilient and disease-resistant plants. *Genome Biology*, 21(1), 289. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02204-y>
- Zhang, S., Wu, S., Hu, C., Yang, Q., Dong, T., Sheng, O., Deng, G., He, W., Dou, T., Li, C., Sun, C., Yi, G., & Bi, F. (2022). Increased mutation efficiency of CRISPR/Cas9 genome editing in banana by optimized construct. *PeerJ*, 10, e12664. <https://doi.org/10.7717/peerj.12664>
- Zhang, X.-H., Tee, L. Y., Wang, X.-G., Huang, Q.-S., & Yang, S.-H. (2015). Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4, e264. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.37>
- Zhao, G., Guo, D., Wang, L., Li, H., Wang, C., & Guo, X. (2021). Functions of RPM1-interacting protein 4 in plant immunity. *Planta*, 253(1), 11. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03527-7>

Apéndices