

Resumen

El banano (*Musa spp.*) se posiciona como el cuarto alimento más consumido a nivel mundial, con Ecuador liderando la producción y exportación global de la variedad Cavendish, abarcando el 29% del mercado internacional. El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (Foc R4T) representa una seria amenaza para la producción bananera en regiones tropicales y subtropicales, persistiendo en el suelo durante décadas y propagándose fácilmente, lo que provoca síntomas devastadores en las plantas.

El objetivo de esta tesis es transferir un vector binario Ti que contiene el gen RPM1, asociado a la resistencia a la fusariosis, desde *E. coli* JM109 a *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. El plásmido pAGM4351, que contiene el sistema CRISPR-Cas9, se utilizará para editar el promotor del gen RPM1 en el genoma del banano. Se compararon dos métodos de transformación bacteriana, Electroporación y Choque térmico, para determinar su eficiencia en la introducción del vector pAGM4351 en *A. tumefaciens*. Además, se desarrolló un protocolo de crioconservación de cepas transformadas, utilizando glicerol y DMSO a diferentes concentraciones, para evaluar su eficacia en la conservación a largo plazo a -80°C.

Posteriormente, se llevó a cabo la extracción genómica del banano Cavendish y se realizó la PCR para amplificar el fragmento diseñado del gen RPM1.

Los resultados mostraron que la electroporación fue el método más eficiente para transformar *Agrobacterium*, mientras que la crioconservación con glicerol demostró ser efectiva para mantener la viabilidad celular a bajas temperaturas. Este proceso sienta las bases para futuras investigaciones que permitan infectar suspensiones celulares de banano y editar la región promotora del gen RPM1 en el genoma, con el fin de obtener variedades resistentes.

Palabras Clave: RPM1, CRISPR-Cas9, Electroporación, quimiocompetentes

Abstract

Banana (*Musa* spp.) is positioned as the fourth most consumed food worldwide, with Ecuador leading the global production and export of the Cavendish variety, covering 29% of the international market. The fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4 Tropical (Foc R4T) represents a serious threat to banana production in tropical and subtropical regions, persisting in the soil for decades and spreading easily, causing devastating plant symptoms.

Translated with DeepL.com (free version)The aim of this thesis is to transfer a binary Ti vector containing the RPM1 gene, associated with fusarium resistance, from *E. coli* JM109 to *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. The plasmid pAGM4351, containing the CRISPR-Cas9 system, will be used to edit the promoter of the RPM1 gene in the banana genome. Two bacterial transformation methods, Electroporation and Heat shock, were compared to determine their efficiency in introducing the pAGM4351 vector into *A. tumefaciens*. In addition, a cryopreservation protocol of transformed strains was developed, using glycerol and DMSO at different concentrations, to evaluate their efficiency in long-term preservation at -80°C. Subsequently, genomic extraction of Cavendish banana was carried out and PCR was performed to amplify the designed fragment of the RPM1 gene.

The results showed that electroporation was the most efficient method to transform *Agrobacterium*, while cryopreservation with glycerol proved to be effective in maintaining cell viability at low temperatures. This process lays the foundation for future research to infect banana cell suspensions and edit the promoter region of the RPM1 gene in the genome to obtain resistant strains.

Key words: RPM1, CRISPR-Cas9, Electroporation, chemo-competents