

Resumen

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo principal adaptar el sistema CRISPR/Cas9 para edición genética en el organismo no modelo *Burkholderia sacchari*. Esta bacteria Gram-negativa tiene el potencial de producir moléculas de alto valor a escala industrial a partir de fuentes de carbono renovables como: glucosa, sacarosa, xilosa y arabinosa. Adyacente a las secuencias de ADN denominadas CRISPR, se encuentran diferentes tipos de nucleasas. Las endonucleasas Cas9 se pueden programar con moléculas de ARN individuales para escindir zonas de ADN específicas. Se realizó un estudio cinético de la curva de crecimiento de este organismo y se logró determinar su tiempo de adaptación (3h-3.5h) y fase exponencial (3.5h hasta 8.5 h). Se utilizó el método de ensamblaje de Gibson para construir el plásmido de expresión de la endonucleasa Cas9, se realizó un diseño in silico de dicho plásmido y posteriormente se desarrollaron tres ensayos in vivo, obteniéndose resultados desfavorables, en consecuencia, no se logró adaptar el sistema CRISPR/Cas9 en *B. sacchari* por posibles problemas de hibridación entre los oligonucleótidos a causa de la formación de estructuras secundarias. Se recomienda realizar un análisis previo de las estructuras secundarias de los primers utilizados en un ensamble Gibson.

Palabras clave:

- **BURKHOLDERIA SACCHARI**
- **ENSAMBLE DE GIBSON**
- **CURVA DE CRECIMIENTO**
- **CRISPR-CAS9**
- **EDICIÓN GENÉTICA**

Abstract

The main objective of this research project is to adapt the CRISPR / Cas9 system for gene editing in the non-model organism *Burkholderia sacchari*. This Gram-negative bacterium has the potential to produce high-value molecules on an industrial scale from renewable carbon sources such as: glucose, sucrose, xylose and arabinose. Adjacent to the DNA sequences called CRISPR are different types of nucleases. Cas9 endonucleases can be programmed with individual RNA molecules to cleave specific areas of DNA. A kinetic study of the growth curve of this organism was carried out and its adaptation time (3h-3.5h) and exponential phase (3.5h to 8.5h) was determined. The Gibson assembly method was used to construct the Cas9 endonuclease expression plasmid, an in silico design of said plasmid was carried out and subsequently three in vivo tests were developed, obtaining unfavorable results, consequently, it was not possible to adapt the system CRISPR / Cas9 in *B. sacchari* due to possible hybridization problems between the oligonucleotides due to the formation of secondary structures. A preliminary analysis of the secondary structures of the primers used in a Gibson assembly is recommended.

Keywords:

- **BURKHOLDERIA SACCHARI**
- **GIBSON ASSEMBLY**
- **GROWTH CURVE**
- **CRISPR-CAS9**
- **GENETIC EDITION**