



Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen

SIX en Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 1 (Foc R1).

Cornejo Rosado, Anahí Grace

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.

12 de agosto de 2022



ACornejo Biotec ESPE Tesis 2022.txt

Scanned on: 12:31 August 15, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	139
Words with Minor Changes	45
Paraphrased Words	673
Omitted Words	0



Francisco Javier Flores
FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen SIX en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1 (Foc R1)**” fue realizado por la señorita **Cornejo Rosado, Anahí Grace**, 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, 15 de agosto de 2022



Firmado digitalmente por:
FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR

Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.

C. C. 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Cornejo Rosado, Anahí Grace**, con cédula de ciudadanía n° 1727135582 declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen SIX en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1)”** 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, 16 de agosto de 2022

Cornejo Rosado, Anahí Grace

C.C.: 1727135582



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Cornejo Rosado, Anahí Grace**, con cédula ciudadanía n°1727135582, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen SIX en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 16 de agosto de 2022

Cornejo Rosado, Anahí Grace

C.C: 1727135582

Agradecimientos

A mi familia. A mi madre, por su constante apoyo y su incondicional amor que me ha acompañado durante toda mi vida. A mi padre, por siempre enseñarme a descubrir el mundo y sorprenderme hasta de los detalles más pequeños. A mi hermano, por enseñarme a ver el mundo desde otra perspectiva.

A mis amigos. A Jeff, porque nunca permitió que me rinda, me brindó su apoyo y me comprendió más que nadie hasta en los momentos más difíciles. A Mary por todos los momentos divertidos, las risas y su compañía. A José por su ayuda y por los años de amistad.

Al tutor de tesis Francisco Flores Ph. D. por su guía durante la elaboración de la presente investigación, sus ideas y recomendaciones fueron de gran ayuda para resolver los inconvenientes ocurridos en el presente trabajo. También agradecer a Silvy ya que estuvo pendiente de nuestras necesidades en todo el proceso. A los chicos de IGEM-Ecuador quienes nos brindaron de sus consejos y ayuda en momentos de dificultad.

Índice de contenido

Agradecimientos	6
Índice de contenido	7
Índice de tablas	10
Índice de figuras.....	11
Listado de abreviaturas.....	12
Resumen	13
Abstract.....	14
Capítulo I: Introducción	15
Antecedentes.....	15
Planteamiento del problema	15
Justificación del problema	16
Objetivos de la investigación	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos	17
Hipótesis	18
Capítulo II: Marco Teórico.....	19
Banana	19
<i>Fusarium oxysporum</i>	19
Ciclo de vida.....	20
Desarrollo de la enfermedad Marchitez por <i>Fusarium</i> y síntomas	22
Genes <i>SIX</i>	23
<i>SIX 1</i>	24
RNA de Interferencia	25

Biogénesis y mecanismo de acción del RNAi	25
Biología Sintética	27
Partes, dispositivos y sistemas	28
Diseño plataforma modular AgroBactory 593	29
Capítulo III: Materiales y Métodos	31
Lugar de trabajo	31
Diseño <i>in silico</i>	31
Cepas y oligonucleótidos utilizados	31
Medios de cultivo	32
Electroforesis	32
Extracción de RNA de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	32
Retrotranscripción	33
PCR overhang	33
Extracción de plásmido	34
Método de lisis alcalina	34
Extracción de plásmido con kit Invitrogen	35
Ensamblaje	35
Digestión	36
Purificación	36
Ligación	36
Preparación de células competentes	37
Transformación	37
PCR de colonias	38
Diseño experimental	38

Capítulo IV: Resultados	40
Diseño <i>in silico</i>	40
Crecimiento de Foc R1, extracción de RNA y retrotranscripción	42
PCR overhang.....	43
Extracción del plásmido	44
Digestión, purificación y ligación	45
Transformación.....	48
Preparación de células competentes	48
Extracción de plásmido	49
Crecimiento células transformadas	50
PCR de colonias.....	52
Diseño experimental	53
Capítulo V: Discusión	56
Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones	60
Conclusiones	60
Recomendaciones	61
Capítulo VII: Bibliografía	62

Índice de tablas

Tabla 1	Repertorio de genes <i>SIX</i> en <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	24
Tabla 2	Partes básicas utilizadas en el diseño de la plataforma modular AgroBactory 593.....	30
Tabla 3	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	31
Tabla 4	Programa usado en termociclador para PCR overhang.....	34
Tabla 5	Programa usado en termociclador para PCR de colonias.....	38
Tabla 6	Tamaño de las secuencias usadas para el ensamble del plásmido final.....	40
Tabla 7	Concentración y pureza de muestras de cDNA obtenido de Foc R1.....	43
Tabla 8	Concentración y pureza de las extracciones de plásmido de la colonia B y C	50
Tabla 9	Eficiencia de transformación obtenida para el diseño experimental.	54
Tabla 10	ANOVA de la eficiencia de transformación	54
Tabla 11	Test Duncan Alfa=0.05.	55

Índice de figuras

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> (Foc) en banana.	22
Figura 2	Mecanismos de acción de siRNA.	27
Figura 3	Diseño de la plataforma modular AgroBactory 593.	30
Figura 4	Ensamblaje <i>in silico</i> del plásmido para la producción de RNAi para el silenciamiento del gen <i>SIX</i> en Foc R1.	41
Figura 5	Crecimiento de Foc R1 en diferentes medios de cultivo	42
Figura 6	Amplificación gen <i>SIX</i> overhang a diferentes temperaturas de annealing.	44
Figura 7	Extracción del plásmido pSB1C3_A593+ERG11.	45
Figura 8	Electroforesis para visualizar la digestión del plásmido pSB1C3_A593+ERG11 y genes <i>SIX</i>	46
Figura 9	PCR del producto de ligación con los primers BBa_G00100 y BBa_G00101.	47
Figura 10	Cultivo de <i>Escherichia coli</i> cepa TOP10 y HT115 en caldo LB.	48
Figura 11	Extracción del plásmido ensamblado pSB1C3_A593+SIX.	49
Figura 12	Transformación en <i>E. coli</i> TOP10 con el plásmido pSB1C3_A593+SIX.	51
Figura 13	Transformación en <i>E. coli</i> HT115 con el plásmido pSB1C3_A593+SIX.	52
Figura 14	PCR de colonias de <i>E. coli</i> TOP10.	53
Figura 15	Gráfico de barras de la eficiencia de transformación obtenida en <i>E. coli</i>	55

Listado de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
Ago	Proteína Argonauta
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CDS	Secuencia codificante
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Foc	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>
Fol	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
Focg	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>
Foc R1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> Raza 1
Foc R4T	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> Raza 4 Tropical
iGEM	International Genetically Engineered Machine
LB	Medio Luria Bertani
miRNA	Micro ácido ribonucleico
nt	Nucleótido
OD	Densidad óptica
PME	Pectinas Metilesterasas
pre-miRNA	Precursor de miRNA
pri-miRNA	miRNA primarios
SD	Secuencia Shine-Dalgarno
siRNA	Pequeños RNA
SynBio	Biología Sintética
RBS	Sitio de unión al ribosoma
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RNAi	Ácido ribonucleico de interferencia.
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
TAE	Tris-Acetato-EDTA

Resumen

El banano es el fruto más consumido a nivel mundial y es considerado un cultivo estratégico para la seguridad alimentaria de varios países. Ecuador genera un tercio de la producción mundial de banano y constituye su segundo producto de exportación más importante, después del petróleo. Sin embargo, el banano es susceptible a diversas enfermedades, incluyendo Fusariosis, cuyo agente causal es *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). La raza 4 tropical de Foc ha devastado miles de hectáreas de cultivo de bananas de tipo Cavendish, las cuales actualmente son las más cultivadas alrededor del mundo. A pesar de que Foc R4 no ha ingresado a Ecuador, es importante generar estrategias de control en caso de que esta patogénica raza llegue al país. La producción de un biopesticida en base a tecnología de ARN de interferencia (iRNA) suena como una opción plausible. En el presente estudio se generó un plásmido productor dsRNA del gen de patogenicidad *SIX* de Foc mediante reacciones de restricción y ligación. Posteriormente se transformó *Escherichia coli* con el plásmido obtenido y se verificó la presencia del plásmido por PCR de colonias. Además, se realizó un diseño completamente al azar para conocer si existe diferencias significativas en la eficiencia de transformación al variar la masa del plásmido (15.31 ng, 30,62 ng y 45, 93 ng) utilizado en el momento de realizar la transformación. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

Palabras clave: AgroBactory, biopesticida, clonación de DNA, transformación bacteriana.

Abstract

Bananas are the most consumed fruit worldwide and is considered a strategic crop for food security in several countries. Ecuador generates a third of the world's banana production and is its second most important export product, after petroleum. However, bananas are susceptible to several diseases, including *Fusarium* wilt, whose causal agent is *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Currently, tropical race 4 of Foc has devastated thousands of hectares of Cavendish banana crops, which are the most widely grown around the world. Although Foc R4 has not entered Ecuador, it is important to generate control strategies in case this pathogenic race reaches the country. The production of a biopesticide based on RNA interference (iRNA) technology sounds like a plausible option. In the present study, a dsRNA-producing plasmid of the Foc pathogenicity gene *SIX* was generated by restriction and ligation reactions. *Escherichia coli* was then transformed with the obtained plasmid and the presence of the plasmid was verified by colony PCR. In addition, a completely randomized design was performed to determine whether there are significant differences in transformation efficiency when varying the mass of plasmid (15.31 ng, 30,62 ng y 45, 93 ng) used at the time of transformation. No significant differences were found between the treatments used.

Key words: AgroBactory, biopesticide, DNA cloning, bacterial transformation.

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

iGEM es una organización sin fines de lucro que se dedica al desarrollo de una comunidad colaborativa y el impulso de avances tecnológicos en el área de la Biología Sintética. iGEM realiza competiciones de grupos de estudiantes interdisciplinarios que representan a su país a nivel mundial (iGEM Foundation, 2022). El grupo de iGEM Ecuador se fundó en el año 2016, y se conforma de un grupo de estudiantes biotecnólogos, mecatrónicos y electrónicos con instructores de distintos países como Ecuador, España y México (iGEM Ecuador, 2021a).

El equipo de iGEM Ecuador vio la necesidad de producir una solución frente al marchitamiento por *Fusarium* en plantaciones de banano, un cultivo imprescindible para el país. Así nace el proyecto de AgroBactory 593, con el fin de la producción de un biopesticida económico que ayude a combatir la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raza 4 (Foc R4). El grupo de iGEM Ecuador comenzó su proyecto con una revisión de literatura para encontrar genes envueltos en patogenicidad y viabilidad del hongo, que hayan sido usado en ensayos de RNA de interferencia (RNAi) y que presenten homología entre Foc R4 y Foc R1, escogiendo de esta manera a los siguientes genes: *SIX*, *SGE1*, *Velvet* y *ERG11*(iGEM Ecuador, 2021a). De esta manera, el presente trabajo es una continuación del proyecto anteriormente mencionado para la producción de RNAi para el silenciamiento del gen *SIX* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1).

Planteamiento del problema

La banana es la fruta más consumida, y por lo tanto la más exportada a nivel mundial. Debido a su aporte vitamínico, el banano es considerado un cultivo estratégico para la seguridad alimentaria de varios países, además, representa la base económica de muchos de ellos (Martínez-Solórzano et al., 2021). Uno de los países que depende en gran medida de las exportaciones de este fruto es Ecuador, en donde el banano es el segundo producto de exportación más importante después del petróleo, a la vez

que genera un tercio de la producción global (Vásquez-Castillo et al., 2019). Según el Banco Central del Ecuador, el sector bananero aporta con un 2% al Producto Interno Bruto (PIB), lo que representa un 35% al Producto Interno Bruto agropecuario (Gonzalo et al., 2021). Las bananeras generan alrededor de 2.5 millones de empleos directos e indirectos en el país.

Actualmente, el mercado del banano se ve amenazado por diversas enfermedades, una de ellas es fusariosis o también llamada Marchitez por *Fusarium*, cuyo agente causal es el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Este hongo se transmite a través del suelo, produciendo dificultad para su biocontrol. En la planta se generan síntomas como el marchitamiento, pudrición radicular o traqueomicosis, es decir, la infección por Foc invade el sistema vascular del banano produciendo necrosis hasta llegar a su muerte. Por este motivo, el desarrollo y producción de biopesticidas que ayuden a controlar el crecimiento del hongo Foc es de vital importancia para la economía del país y estabilidad de sus ciudadanos.

Justificación del problema

A mediados del siglo XX, se dio una de las mayores epidemias en plantaciones vista hasta la fecha. En lugares como América, África y Lejano Oriente, las plantaciones de banana Gros Michel fueron rápidamente azotadas por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 debido a la susceptibilidad que presenta este tipo de cultivar al hongo (Maymon et al., 2020). De esta manera la marchitez por *Fusarium* se convirtió en una enfermedad de importancia global. La solución consistió en el reemplazo de las variedades de banano susceptibles por variedades resistentes como el cultivar Cavendish durante la década de 1960.

No obstante, la industria bananera tuvo otra recaída en la década de los 90s, cuando una nueva raza de *Fusarium* emergió (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical, Foc R4T) e infectó a bananas Cavendish en Taiwán, extendiéndose hasta Malasia, Indonesia y Filipinas. Actualmente las variedades Cavendish representan el cultivar de mayor importancia, figurando el 40% del total de

bananas producidas a nivel mundial (Bubici et al., 2019). Por lo que un alto porcentaje de bananas se encuentran en un riesgo inminente.

Ecuador presenta varias estrategias para evitar que Foc R4T ingrese al país, entre ellas encontramos la limpieza y desinfección de zapatos, herramientas de trabajo, vehículos y maquinaria pesada previo al ingreso a las zonas de cultivo, además se tiene un control sobre el manejo de residuos, se evita el ingreso de animales y se mantiene al personal bajo capacitaciones sobre medidas de prevención. Sin embargo, son pocas las medidas de control en caso de que el hongo ingrese al país. Las principales medidas a tomar serían, en primer lugar, la declaración de Emergencia Fitosanitaria, seguido de la ejecución de cuarentenas en la zona afectada (Agrocalidad, 2020).

Una de las alternativas que se está desarrollando como medida de control de Foc es la tecnología de RNAi. El RNA de interferencia es un proceso propio de los eucariotas en respuesta a RNA de doble cadena. Este mecanismo biológico reduce la expresión de la transcripción de genes específicos (NIH, 2017). La tecnología basada en RNAi se puede usar para el desarrollo de bioplaguicidas que silencien de manera específica genes de virulencia o viabilidad del hongo. Este enfoque innovador también presenta la característica de ser amigable con el medio ambiente en comparación con el uso de plaguicidas químicos, que tienen consecuencias adversas sobre la salud humana y medio ambiental (Fletcher et al., 2020).

Objetivos de la investigación

Objetivo General

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

Objetivos Específicos

- Obtener un biobrick del gen *SIX* mediante ensamblaje de restricción y ligación.
- Ensamblar el plásmido para la producción de dsRNA mediante técnicas de restricción y ligación.

- Transformar *Escherichia coli* cepa HT115 con el plásmido ensamblado para producir dsRNA objetivo.

Hipótesis

La eficiencia de transformación presenta diferencias significativas al variar el volumen de plásmido pSB1C3_A593+SIX añadido a las células competentes para su posterior transformación en *Escherichia coli*.

Capítulo II: Marco Teórico

Banana

Las bananos y plátanos pertenecen a la familia de las *Museaceae* y son cultivadas en regiones tropicales y subtropicales alrededor de todo el mundo. Es uno de los cultivos de mayor consumo, tan solo después del arroz y el maíz (Dhivya et al., 2020). Los bananos son monocotiledóneas de tamaño alto, las *Musas* comestibles y sus híbridos fueron originadas a partir del cruce entre las especies de plátano silvestre *Musa acuminata* Colla (genoma A) y *Musa balbisiana* Colla (genoma B). Generalmente, los cultivares de mayor importancia económica son triploides (AAA, AAB y ABB), seguido de los diploides (AA y AB) y finalmente los tetraploides (AAAA, AAAB y AABB) (Nadal et al., 2009). Además, presentan otras características como ser cultivos altamente estériles y partenocárpicos, por lo que se propagan asexualmente.

Fusarium oxysporum

El género *Fusarium* presenta una distribución alrededor de todo el mundo y contiene varias especies filogenéticamente distintas, las cuales se conocen como “Complejo de especies de *Fusarium oxysporum*” (FOOSC por sus siglas en inglés). FOOSC son ascomicetos filamentosos que se encuentran en el suelo y se asocian con las plantas. Dentro de este complejo encontramos tanto cepas patógenas para plantas y animales, como cepas no patógenas. Cabe mencionar, que las cepas patógenas del género *Fusarium* se encuentran entre el top 10 de patógenos fúngicos de mayor importancia científica y económica (Lombard et al., 2019). Cada año existen pérdidas de billones de dólares a la industria de la agricultura debido a este género (Dongzhen et al., 2020).

El nombre de *Fusarium oxysporum* fue acuñado por primera vez por Diederich F.L. von Schlechtendal en el año 1824 en Berlín, Alemania. Después, para facilitar su clasificación, se designó las *formae speciales* (f. sp.) en función de la patogenicidad de la cepa a un huésped en particular, sin contar los *Fusarium* no patógenos y las cepas clínicas. Cabe mencionar que algunas formas especiales pueden

ser capaces de infectar más de una planta hospedera, mientras otras solo se especializan en una sola planta. Hasta el año 2018 se pudieron encontrar 144 *formae speciales* (Lombard et al., 2019).

Por ejemplo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) incluye todos los hongos FOsc que presentan patogenicidad para *Musa* spp. Sin embargo, existe una diferencia entre la patogenicidad de las cepas según los diferentes cultivares de banana, por lo que luego se lo clasificó en razas. Existen cuatro razas de Foc: la raza 1 es patogénica para Gros Michel (AAA), Pisang Awak (ABB) y algunos otros cultivares AAB; la raza 2 ataca a cultivares anteriormente mencionados y el Bluggoe; la raza 3 afectó al género *Heliconia* y no a *Musa* por ende, no se consideró dentro del grupo Foc y finalmente la raza 4 es patogénica a los cultivares atacados por la raza 1 y 2, además del grupo Cavendish (AAA). La raza 4 se subdivide a su vez en la raza tropical (RT4) y la raza subtropical (RST4), la primera puede infectar bajo condiciones tropicales, mientras que la segunda no infecta bajo condiciones tropicales (Czislowski et al., 2018).

Ciclo de vida

El ciclo de vida de Foc inicia cuando las esporas del hongo encontradas en el suelo: las microconidias, macroconidias y clamidosporas, germinan debido a un recurso externo de nutrientes, naturalmente suelen ser los exudados de las plantas, los cuales contienen compuestos orgánicos como azúcar o aminoácidos. Los tubos germinales generados durante este proceso penetran principalmente las raíces secundarias y terciarias del plátano, debido a que las raíces primarias generan menor cantidad de exudados y presentan mejores mecanismos de defensa contra las infecciones fúngicas (Gordon, 2017).

Las hifas de Foc se adhieren a la superficie de las raíces en el transcurso de dos días aproximadamente. En este punto Foc debe superar varias barreras y mecanismos de defensa de la planta. La pared celular a pesar de ser una fuente alimenticia para el hongo, también representa un problema para infectar la planta. El patógeno genera pectinas metilesterasas (PME) para degradar la

pared celular, en respuesta el hospedador realiza cambios en la conformación y abundancia de glicoproteínas encontradas en las paredes celulares, además de generar ácido salicílico y el ácido jasmónico, entre otros mecanismos que impiden la entrada de Foc (Dita et al., 2018).

Una vez superado todas las barreras y mecanismos de defensa de la planta, Foc logra invadir los tejidos vasculares a través de los espacios intercelulares de las células epidérmicas de la raíz. El momento en que la infección alcanza las raíces laterales se produce la infección por rizomas, que da lugar a una infección sistemática. Llegado a este punto se empieza una producción de conidios y clamidosporas, producidas a partir de hifas engordadas, en los haces vasculares. El hongo aprovecha el sistema de transpiración de la planta para distribirse a través de ella. A continuación, se observan los primeros síntomas hasta llegar al marchitamiento y la muerte de la planta(Dita et al., 2018).

Figura 1

Ciclo de vida de Fusarium oxysporum f. sp. cubense (Foc) en banana.



Nota: A) Micro, macroconidios y clamidosporas se encuentran en el suelo. B) Las clamidosporas germinan gracias a los exudados de la planta de banana y los tubos germinales penetran las raíces de la planta. C) Foc llega al sistema vascular donde su micelio lo invade. D) Conidios y clamidosporas se producen en el tejido vascular, los conidios se distribuyen a toda la planta debido al sistema de transpiración de la planta, se dan los primeros síntomas. E) Se produce marchitamiento en la planta. F) Planta infectada muere y cae al suelo donde inicia el ciclo nuevamente. Recuperado de Dita et al., (2018).

Desarrollo de la enfermedad Marchitez por Fusarium y síntomas

Foc RT4 es considerado un organismo hemibiótrofo, lo que quiere decir que al inicio de una infección no causan mayor daño a la planta, ya que necesitan del metabolismo del hospedero para su

sobrevivencia. Sin embargo, en estadíos tardíos de la enfermedad se comportan más bien como necrótrofos causando graves daños a la planta, hasta producir su muerte (Pegg et al., 2019).

De manera general, al empezar una infección por Foc TR4, la planta activa mecanismos de defensa. El huésped forma gels en las placas de perforación con el fin de capturar e inmovilizar al patógeno, si el gel puede resistir el tiempo suficiente el hongo se puede contener. Por otro lado, en plantas susceptibles el patógeno logra invadir el xilema, lo que provoca una escasez de agua en la planta debido a la obstrucción en los haces vasculares y esto a su vez una baja transpiración. Los síntomas iniciales comienzan con el surgimiento de una línea amarilla en la base del peciolo de la hoja más vieja (Pegg et al., 2019). Seguido se da la clorosis desde las hojas inferiores hacia las superiores, las nuevas hojas nacen de un color pálido y de formas distorsionadas, se produce el marchitamiento, la división del pseudotallo y la necrosis vascular (Magdama et al., 2020).

Genes SIX

En el año 2004, Rep y colaboradores identificaron una proteína rica en cisteína secretada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) durante la colonización del hongo en los vasos del xilema del tomate. El gen que codifica para esta proteína de 32 kDa se lo llamó Secreted in Xylem 1 (*SIX 1*) (Rep et al., 2004). Mas adelante, a través de análisis genómicos se reportaron hasta 14 genes *SIX* en Fol y muchos de sus homólogos también se encontraron en otras *formae speciales*.

Cada *forma specialis* de *Fusarium oxysporum* tiene un particular conjunto de genes *SIX*, con un número de copias concretas que proveen patogenicidad y especificidad de infección para cada tipo de plantas hospedadoras. De igual manera, diferentes aislados de Foc R1 y Foc R4 contienen diferentes combinaciones de los genes *SIX*. Es importante mencionar que los genes *SIX* se han hallado en cepas no patógenas de Fo, pero en menor número de copias (Jangir et al., 2021). La suma de estos hallazgos muestra que las proteínas *SIX* están vinculadas, y su función se establece en conjunto y no por su función individual. Es decir, la presencia de un número específico de genes *SIX* pueden desencadenar la

patogenicidad (Bonilla et al., 2018). A continuación, se muestra una tabla que indica el repertorio de genes *SIX* necesarios para la patogenicidad de FocR1, FocTR4 y FocSTR4.

Tabla 1

Repertorio de genes SIX en Fusarium oxysporum f. sp. cubense.

Nombre	FocR1	Foc TR4	Foc STR4
<i>SIX 1</i>	Un gen, dos secuencias variantes	Tres genes, cuatro secuencias variantes	Un gen
<i>SIX 2</i>		Un gen, dos secuencias variantes	Un gen, dos secuencias variantes
<i>SIX 6</i>	Un gen	Un gen	
<i>SIX 7</i>		Un gen	Un gen
<i>SIX 8</i>		Un gen, cuatro secuencias variantes	Un gen, dos secuencias variantes
<i>SIX 9</i>	Un gen, dos secuencias variantes	Un gen	Un gen
<i>SIX 13</i>	Un gen, dos secuencias variantes	Un gen, dos secuencias variantes	

Nota: Recuperado de: Bonilla et al., (2018)

SIX 1

El rol de *SIX1* en la patogenicidad en Fol y *Fusarium oxysporum f.sp. conglutinans* (Focg) ha sido demostrada reiteradas veces con ensayos de knock-down y knock-out. La eliminación del gen *SIX1* en Focg atenúa los síntomas en plantas de col infectadas. Se ha determinado que la expresión de este gen en Fol y Focg se da en las primeras etapas de infección, durante la penetración del hongo en las raíces de la planta y continúa durante la invasión de los vasos del xilema (Bonilla et al., 2018). Sin embargo, la relación exacta que tiene el gen *SIX1* en el mecanismo de patogenicidad en Foc no está del todo determinada.

RNA de Interferencia

El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo biológico, presente en todos los organismos eucariotas, cuyo fin es el silenciamiento de genes. Se presume que este mecanismo tuvo un origen evolutivo para combatir las infecciones virales que se ha conservado hasta la actualidad. Se han descrito al menos tres funciones del silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia, las cuales incluye la regulación de la expresión génica, la protección contra agentes virales y la defensa contra elementos génicos como los transposones. Aunque también se ha estudiado como un sistema de defensa frente a células cancerígenas o como proceso de regulación en el desarrollo fisiológico de las plantas (Noriega et al., 2016).

La pérdida o reducción de expresión de un gen mediante RNA de interferencia se da después de la introducción de un RNA de doble cadena pequeño, el cual es reconocido por la maquinaria celular para usar este RNA de guía además de un complejo proteico con el propósito de degradar el RNAm objetivo, de tal modo que se disminuye o anula el mensaje de traducción (Correa et al., 2008). Sin embargo, el mecanismo de acción del RNAi varía ligeramente según la clase de RNA que está envuelto en el proceso. Se conoce tres clases de RNA implicados en la interferencia: los micro RNA (miRNA), los RNAs interferentes pequeños (siRNA) y los PIWI-RNAs (piRNA) (Olina et al., 2018).

Biogénesis y mecanismo de acción del RNAi

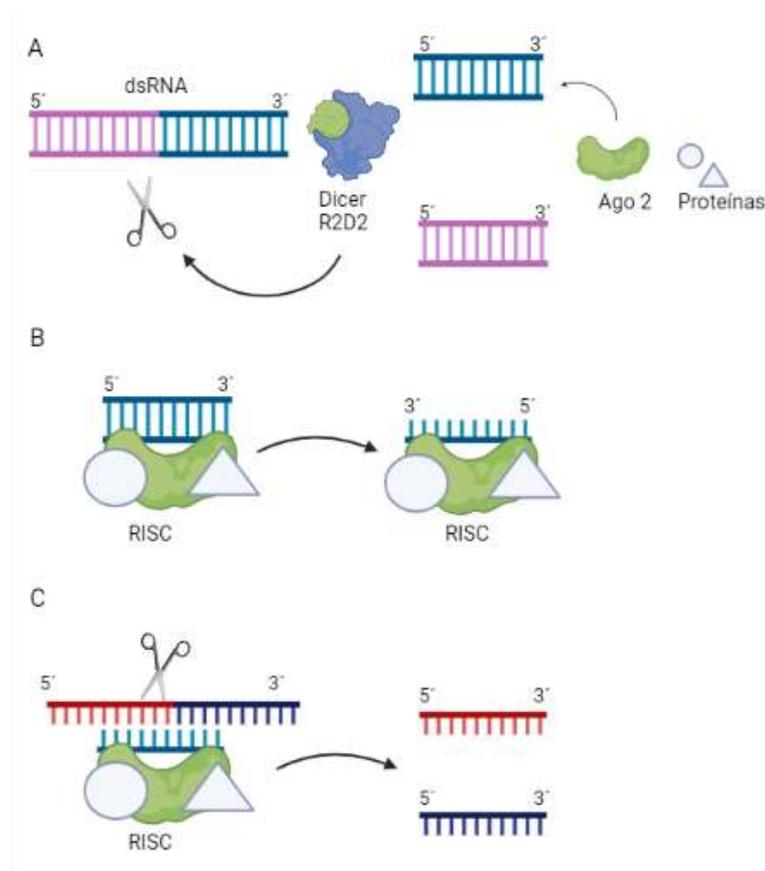
Los siRNA suelen tener un origen exógeno en la mayoría de los casos, aunque también se pueden producir a partir de transposones o hairpins endógenos. El proceso comienza una vez que un RNA de doble cadena (dsRNA) ingresa al citoplasma, aquí se encuentra con la endonucleasa Dicer, la cual corta al dsRNA en pedazos más pequeños de entre 21 y 25 nt de largo. Luego estos pequeños ARN de doble cadena ingresan a la proteína Argonaute (Ago), con ayuda de la endonucleasa Dicer y otras proteínas colaboradoras. En seguida surge la separación de una de las cadenas, la cadena que se disocia es llamada cadena pasajera, mientras que la que permanece en Ago es llamada cadena guía. El conjunto

de estas proteínas, Ago, Dicer y otras forman el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Este complejo detecta el mRNA objetivo y realiza una escisión en el mRNA acompañado de una degradación del mismo por proteínas citoplasmáticas (Olina et al., 2018).

La biogénesis de los miRNA inicia en el núcleo celular, donde la RNA polimerasa II sintetiza los miRNA primarios (pri-miRNA) de unos miles de nucleótidos de largo. A continuación, los pri-miRNA son procesados por una proteína llamada microprocesador, formada de dos proteínas más: Drosha y DGCR8. Drosha es una Ribonucleasa de la familia III, mientras de DGCR8 es una proteína que contiene un dominio de unión a un RNA de doble cadena. De esta manera los pri-miRNA son convertidos en precursores de miRNA (pre-miRNA) de aproximadamente 70 nt de largo (Zhu & Palli, 2020). Posteriormente, los pre-miRNA son exportados al citoplasma con ayuda de las proteínas exportin-5 y Ran-GTP. Una vez en el citoplasma el mecanismo de acción es similar al siRNA.

Figura 2

Mecanismos de acción de siRNA.



Nota: A) RNA de doble cadena largo es escindido por Dicer en asociación con R2D2, el producto obtenido, siRNA, se encuentra con la proteína Ago y otras proteínas colaboradoras formando el complejo RISC. B) Una vez formado RISC se degrada la cadena pasajera. C) La cadena antisentido guía el corte a un RNA objetivo que presente la secuencia complementaria. Autoría propia, basado en: Zhu, K. Y., & Palli, S. R. (2020).

Biología Sintética

El término biología sintética (SynBio) fue mencionado por primera vez por Barbara Hobom en 1980 para referirse a una bacteria modificada con tecnología de ADN recombinante, el nombre surgió debido a la idea de una intervención humana en un organismo vivo. Luego, en el año 2000 en una

reunión de la Sociedad de Química Americana, este término fue usado para describir la síntesis artificial de moléculas orgánicas, además fue entendido como un “rediseño de la vida” (Benner & Sismour, 2005). Mas adelante, el concepto fue tomando forma hasta que, en la actualidad la SynBio es el área de la ciencia que se encarga del diseño o rediseño y construcción de partes, circuitos o sistemas biológicos para la obtención de productos de interés para la sociedad (Muñoz-Miranda et al., 2019). Esta ciencia se nutre de avances interdisciplinarios en campos como la Bioinformática, Biología Molecular, Matemática, Química, entre otros para lograr sus cometidos a partir de partes estandarizadas a modo de bloques de construcción o biobricks.

Partes, dispositivos y sistemas

La Biología Sintética tiene una lógica jerárquica, en la cual los sistemas se estructuran de dispositivos, y los dispositivos se forman de partes. Una parte es una pieza de DNA que codifica para única función biológica, por ejemplo, la secuencia de DNA que codifica para una enzima. Cada una de las partes se pueden representar con símbolos según el Lenguaje Abierto de Biología Sintética (SBOL por sus siglas en inglés). La unión de varias partes forma un dispositivo. Los dispositivos cumplen funciones más complejas como la producción de una proteína (Kightlinger et al., 2020). Finalmente, al unir varios dispositivos se obtiene un sistema que trabaja para cumplir una función biológica específica (Muñoz-Miranda et al., 2019).

Para generar una unidad transcripcional se necesitan al menos cuatro unidades básicas o partes, el promotor, el sitio de unión al ribosoma (RBS), la secuencia de codificación (CDS) y el terminador. El promotor se encarga del reclutamiento de la ARN polimerasa para transcribir el DNA a mRNA. El RBS es un segmento aguas arriba del mRNA donde se une el ribosoma para dar inicio a la traducción. En este punto es importante mencionar que en procariotas existe la secuencia Shine-Dalgarno (SD) en el mRNA que ayuda a dirigir los ribosomas a los codones de comienzo (AUG), gracias a la hibridación con la cola anti-Shine-Dalgarno de la subunidad 16S del ribosoma (Armas, 2021). Por otro lado, el CDS es la

secuencia que va a ser transcrita y traducida en la proteína o producto deseado. Finalmente, el terminador es una parte que detiene la transcripción (Boada Acosta, 2018).

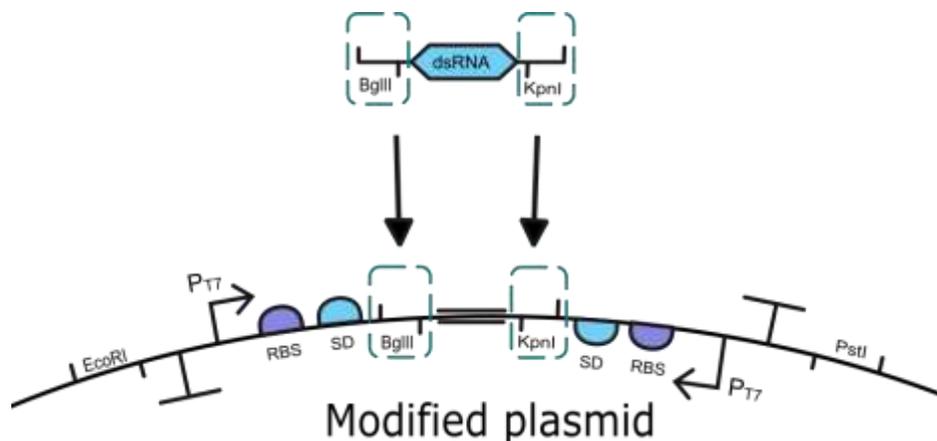
Diseño plataforma modular AgroBactory 593

AgroBactory 593 es una plataforma modular que permite ser usada con diferentes genes target del patógeno de interés, para producir RNA de doble cadena (dsRNA), el cual silencia genes específicos del hongo (iGEM Ecuador, 2021b). El diseño de la plataforma modular de AgroBactory 593 por parte del grupo de iGEM Ecuador fue realizado tomando en cuenta ciertos aspectos importantes. En primer lugar, se usó el backbone basado en el plásmido pSB1C3, que posteriormente fue modificado. Se eliminó las secuencias promotoras del plásmido original y se insertó las secciones de up y down propio del grupo de iGEM-Ecuador. La parte up y down constan de terminadores transcripcionales, promotores T7, RBS, secuencia SD y los sitios de restricción BgIII y KpnI para ambos lados del circuito tal como se muestra en la Figura 3. El plásmido con las partes up y down incorporadas se lo nombró como pSB1C3_A593.

Se utilizó el promotor T7 el cual solo puede ser reconocido por una polimerasa T7, esta elección trae algunas ventajas al diseño como la alta procesividad, independencia de factores de transcripción auxiliares, la capacidad de producir transcritos largos, entre otros (Wang et al., 2018). Además, se añadieron terminadores transcripcionales para evitar que la T7 produzca fragmentos de RNA inespecíficos. Los RBS y secuencias SD se añadieron para mejorar la estabilidad del dsRNA generado (iGEM Ecuador, 2021a).

Figura 3

Diseño de la plataforma modular AgroBactory 593.



Nota: Recuperado de iGEM Ecuador, 2021.

Tabla 2

Partes básicas utilizadas en el diseño de la plataforma modular AgroBactory 593.

Nombre	Descripción	Repositorio iGEM
Backbone	pSB1C3	
Shine-Dalgarno -SD	Ayuda al ribosoma a encontrar su posición de inicio antes del codón de inicio	BBa_K3893000 BBa_K3893021 (reverso)
Sitio de unión al ribosoma -RBS	Lugar de unión del ribosoma al ARNm	BBa_B0034 BBa_K3893019 (reverso)
Promotor T7	Promotor específico que transcribe solo por la ARN polimerasa T7	BBa_I712074 BBa_K3893020 (reverso)
Secuencia de codificación -CDS	Secuencia que va a ser usada para la producción de dsRNA que silencie al gen <i>SIX</i>	BBa_K3893004
Terminador	Punto de finalización de la transcripción	BBa_K3893006
Sitios de restricción	Puntos de corte usados para ingresar el CDS (BglII y KpnI)	

Nota: Basado en iGEM Ecuador, (2021).

Capítulo III: Materiales y Métodos

Lugar de trabajo

El presente proyecto se realizó en los laboratorios de Microbiología de Investigación de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador. Parte de la investigación también tomó lugar en el laboratorio de diagnóstico molecular IDgen, ubicado en la Av. De los Granados, Quito-Ecuador.

Diseño *in silico*

La información del proyecto AgroBactory 593 del proyecto fue suministrada por el equipo de iGEM Ecuador. Se utilizó la plataforma en línea Benchling (<https://www.benchling.com/>) para realizar los análisis *in silico* de digestión y ligación del plásmido.

Cepas y oligonucleótidos utilizados

Se utilizó un hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* raza 1. También se obtuvieron diferentes cepas de *Escherichia coli*: TOP10 y HT115. Todas las muestras fueron obtenidas del laboratorio de diagnóstico molecular IDgen, pertenecientes al grupo de iGEM Ecuador.

Tabla 3

Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia de oligonucleótido	Sitio de Restricción
dsRNA_SIX1_F_2	5'AAA <u>AGATCT</u> AGACACACATCTAGGCGA3'	BglII
dsRNA_SIX1_R_2	5'AAAGGT <u>ACCACCT</u> GAGCAATTCGACC3'	KpnI
BBa_G00100	5'TGCCACCTGACGTCTAAGAA3'	
BBa_G00101	5'ATTACCGCCTTTGAGTGAGC3'	

Nota: La sección en negrilla de los primers representa la secuencia extra agregada al gen *SIX*, la parte subrayada indica la secuencia para incorporar los sitios de restricción de las enzimas KpnI y BglII.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para elaborar este trabajo se pueden dividir en dos tipos, los medios para crecimiento de hongo y los usados en crecimiento de bacteria. Para el crecimiento del hongo se utilizó los medios PDA (Potato Dextrose Agar) y PDB (Potato Dextrose Broth), mientras que para el crecimiento bacteriano se usó los medios agar Luria Bertani (LB) y caldo LB. De estos, PDA y agar LB se dispensaron en cajas Petri, mientras que PDB y caldo LB se dispensaron en tubos de ensayo o matraces con tapa de algodón. Los medios fueron suplementados con antibióticos (cloranfenicol o ampicilina) en caso de que se haya necesitado seleccionar para el crecimiento de una bacteria resistente.

Electroforesis

Se preparó el gel de agarosa con Buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA). La cantidad de agarosa fue calculada a una concentración de 1,5% w/v. Posteriormente se agregó el agente intercalante para mejorar la visualización del DNA en el gel. La mezcla se colocó en el molde con el peine y se esperó hasta que se gelifique en un ambiente oscuro y cerrado. Una vez solidificado el gel se colocó en la cámara electroforesis y se cargaron los pocillos con cada una de las muestras. Además, se agregó 2 μ L del marcador 1 Kb Plus DNA Ladder o GeneRuler 100pb DNA Ladder. Cuando el tiempo de la electroforesis había finalizado se retiró el gel de la cámara y se lo llevó al transiluminador para observar los resultados obtenidos.

Extracción de RNA de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

Previo a la extracción de RNA se realizó una limpieza exhaustiva de la cámara de seguridad y los utensilios necesarios durante el proceso, tanto con alcohol como con la solución de descontaminación de RNAasa RNaseZap™ de Invitrogen.

Para la extracción RNA, se utilizó muestras de Foc R1 cultivadas durante cinco días en tubos con PDB a 30°C. La extracción de RNA del hongo se realizó según el protocolo estándar del kit

E.Z.N.A.® Fungal RNA Mini Kit de Omega, BIO-TEK. Cabe mencionar que la muestra de hongo no fue tratada con nitrógeno líquido para su congelamiento, en su lugar se usó material fresco y se agitó en vórtex. Una vez culminado el proceso de extracción de RNA se almacenó el producto a -80°C .

Retrotranscripción

Para el proceso de transcripción inversa se utilizó el Kit GoScript™ Reverse Transcriptase System A500 de Promega. Se mezclaron los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga de 0,2mL: RNA total de Foc R1 (2 μL), random primers (1 μL), agua libre de nucleasas (2 μL). El tubo obtenido se colocó en un bloque precalentado a 70°C durante 5 minutos, e inmediatamente después se colocó en hielo por 5 minutos. Se centrifugó el tubo y se lo mantuvo en hielo hasta que la mezcla de reacción de transcripción se añada.

Para preparar la mezcla de reacción de transcripción, se añadieron los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga de 0.2mL: Agua libre de nucleasas (7 μL), GoScript™ 5X Reaction Buffer (4 μL), MgCl_2 (2 μL), PCR Nucleotide Mix (1 μL), GoScript™ Reverse Transcriptase (1 μL).

Se añadió la mezcla de reacción de transcripción en el tubo de la primera mezcla. Finalmente, se incubó el tubo durante 5 minutos a 25°C , para luego pasar a una etapa de 42°C por 1 hora y otra de 70°C durante 15 minutos. El DNA complementario (cDNA) obtenido se almacenó a -20°C para su posterior uso.

PCR overhang

El Master Mix realizado para cada reacción de la PCR overhang se compuso de la siguiente manera: DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) de Thermo Scientific (25 μL), primer forward (1 μL , 1000 nM), primer reverse (1 μL , 1000nM), cDNA (1 μL , 298 ng/ul), agua libre de nucleasas (22 μL). Los primers utilizados para la PCR overhang fueron los siguientes: Primer forward dsRNA_SIX1_F_2 (primer forward), dsRNA_SIX1_R_2 (primer reverse). El programa utilizado para el termociclador fue el siguiente:

Tabla 4

Programa usado en termociclador para PCR overhang

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	30 s	35
Annealing	54	30 s	35
Extensión	72	1 min	35
Extensión final	72	10 min	1

Extracción de plásmido

La extracción de plásmido pSB1C3_A593 a partir de *E. coli* cepa DH5 α se realizó mediante dos protocolos, uno mediante el método de lisis alcalina y otro con el uso de kits especializados para este propósito. De la misma manera se extrajo el plásmido pSB1C3_A593+SIX de *E. coli* cepa TOP10. A continuación, se describe el proceso de cada uno de ellos.

Método de lisis alcalina

Para esta extracción se necesita de la preparación previa de tres soluciones. La Solución I (Glucosa 50 mM, Tris-Cl (pH 8.0) 25 mM, EDTA (pH 8.0) 10 mM) se encarga de la suspensión de la bacteria, permitiendo una osmolaridad estable y protegiendo el ADN al evitar el funcionamiento de las nucleasas. La solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1% (w/v)) permite la interacción con la membrana celular bacteriana para desencadenar la lisis. La concentración usada de NaOH logra la extracción de ADN plasmídico. La solución III (Acetato de potasio 5 M, Ácido acético glacial, Agua) es encargada del paso de neutralización del ADN plasmídico obtenido.

En primer lugar, en un tubo Eppendorf se añadió 1,5 mL de cultivo bacteriano (*E. coli* cepa DH5 α) incubado en medio LB durante al menos una noche a 37 °C. Se procedió a centrifugar los tubos a 2600 xg durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. Se repitió este paso de dos a cinco veces,

dependiendo de la cantidad de pellet obtenido, hasta que sea claramente visible. Luego, se resuspendió el pellet en 250 μL de la solución I. A continuación, se homogenizó con vórtex hasta que las células se encontraron totalmente resuspendidas y se incubó a temperatura ambiente por dos minutos.

Transcurrido este tiempo se añadió 250 μL de la solución II, seguido de una homogenización por inversión. Se incubó 3 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e inmediatamente se agregó 300 μL de la solución III, seguido de su respectiva homogenización por inversión. Nuevamente, se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Los tubos luego se centrifugaron a 12500 xg por 15 minutos. Se transfirió 800 μL del sobrenadante en dos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (400 μL en cada tubo). A cada tubo obtenido se agregó 800 μL de alcohol absoluto y se homogenizó por inversión.

Se incubaron los tubos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos, se centrifugaron a 12500 xg por 10 minutos y se descartó el sobrenadante de cada tubo. Consecutivamente, se agregó 1 mL de etanol al 70% a cada tubo, se centrifugaron a 12500 xg durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el alcohol sobrante en una cámara de bioseguridad que había sido previamente limpiada. Finalmente, se resuspendió el pellet en 20 μL de agua libre de nucleasas, se agregó 1 μL de RNAsa y se dejó incubar por 15 minutos. El producto obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Extracción de plásmido con kit Invitrogen

Los plásmidos requeridos también fueron extraídos según el protocolo de purificación mediante centrifugación de PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit de Invitrogen. De igual manera que en el método manual por lisis alcalina se utilizó cultivo bacteriano fresco incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio LB durante al menos una noche.

Ensamblaje

El objetivo del ensamblaje consistió en producir un plásmido para la producción de dsRNA, para esto se acopló el plásmido pSB1C3_A593 con el producto de la PCR overhang mediante un proceso de digestión, purificación y ligación que se detalla a continuación.

Digestión

Para realizar la digestión se utilizó el kit de Thermo Scientific FastDigest Value Pack. Se digirió con las enzimas de restricción KpnI y BglII, para formar extremos cohesivos tanto en el plásmido extraído de *E. coli* cepa DH5 α como el producto de las PCR overhang.

El Master Mix utilizado para la digestión del plásmido o del producto de la PCR overhang consistió de la mezcla de los siguientes componentes: 10X FastDigest™ Buffer (2 μ L), DNA plasmídico mayor a 1 μ g (2 μ L) o DNA de la PCR overhang 0,2 μ g (10 μ L), FastDigest KpnI (1 μ L), FastDigest BglII (1 μ L), agua libre de nucleasas (se completa un volumen de 20 μ L en el caso del plásmido o 30 μ L en el caso del producto de PCR overhang). Una vez obtenidos los Master Mix, se mezcló por inversión suavemente y se incubó a 22°C durante diferentes tiempos (3h, 1h y 0,5h). El producto obtenido se lo almacenó a -20°C para su posterior uso.

Purificación

Para la purificación se usó el kit de Promega llamado Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. El kit permite la purificación de fragmentos de ADN entre 100 pb hasta 10 kb a partir del gel de agarosa o a partir de una amplificación de PCR. Después de haber digerido el plásmido, se corre el producto de la reacción en la cámara de electroforesis. Se selecciona y corta la banda más deseada formada en gel. Este pedazo de gel se purifica mediante el kit.

Ligación

Previo a la ligación se deben medir las concentraciones del inserto y del vector conseguidos después de la purificación mediante NanoDrop. Una vez obtenidos estos datos se procede a realizar los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de vector e inserto necesario para realizar la reacción según el protocolo de T4 DNA Ligase, 1 U/ μ L de Thermo Scientific.

La reacción se compuso de la siguiente manera: Plásmido linealizado (1 μL , 11.7 ng/ μL), Inserto de DNA (7 μL , 11-13 ng/ μL), T4 DNA Ligase, 1 U/ μL de Thermo Scientific (1 μL), 10X T4 DNA Ligase Buffer (4 μL) y Agua libre de nucleasas (13 μL). Se dejó incubando a -20°C durante 20 horas.

Preparación de células competentes

Previo a la preparación de células competentes se debe tener una gradilla fría para realizar todos los pasos y tener preparado buffer CCMB80 (KOAc 10 ml 1M/L ph:7; CaCl₂ .2H₂O 80 mM (11,8 g/L); MnCl₂ .4H₂O 20 mM (4,0 g/L); 10 mM MgCl₂ .6H₂O (2.0 g/L); 10% glicerol (100ml/L)). Además, previo a la realización de este protocolo, se debe ajustar el OD del cultivo bacteriano de *Escherichia coli* TOP10 y HT115 en 0.3 medido en un espectrofotómetro a 600nm.

Se colocó 1,5 mL del cultivo bacteriano en tubos de microcentrifuga previamente enfriados. Se centrifugó 30 segundos a 13000 xg. Se removió el sobrenadante con cuidado y se resuspendió el pellet con 1 mL del Buffer CCMB80. Posteriormente se incubaron los tubos a -20°C por 10 minutos. Pasado este tiempo se centrifugó durante 30 segundos a 13 000 xg. Se removió el sobrenadante sin perturbar al pellet y se resuspendió el pellet en 200 μL de CCMB80. Las células se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

Transformación

Previo a la transformación se debe tener listo el medio SOC (Tryptona, Extracto de levadura, NaCl, KCl (250 mM), MgCl₂ (2M MgCl₂), Glucosa (20 mM)).

Se utilizaron tubos de microcentrifuga previamente enfriados para colocar 50 μL de células competentes y 2 μL de ADN plasmídico ligado con el gen de interés *SIX1*. Para la obtención de un control negativo, en uno de los tubos no se añadió el ADN plasmídico, en su lugar se colocaron 2 μL de agua libre de nucleasas. A continuación, se incubaron los tubos a -20°C durante 30 minutos. Inmediatamente después de transcurrida la media hora, se colocaron los tubos en baño maría a 42°C durante exactamente 30 segundos. Luego, se incubaron los tubos nuevamente a -20°C por 5 minutos. Se

añadieron 950 μL de medio SOC a temperatura ambiente a cada uno de los tubos. Se incubaron los tubos a 37°C por 90 minutos. Para finalizar, se centrifugaron a 6800 xg durante 3 minutos y se descartaron los 900 μL de sobrenadante sin perturbar el pellet. El pellet obtenido se resuspendió en los 100 μL restantes. La mezcla obtenida fue inoculada en cajas Petri con medio LB más cloranfenicol. Se dejó incubando por 48 horas a 37°C.

PCR de colonias

Se usó un tubo Eppendorf de 0,2 mL para generar un Master Mix, con la siguiente composición para cada reacción: GoTaq Hot Start Colorless Master Mix (6.25 μL), primer forward (0.5 μL), primer reverse (0.5 μL), gua libre de nucleasas (5.25 μL). Los primers forward y reverse utilizados para el PCR de colonias se nombraron como BBa_G00100 y BBa_G00101 respectivamente. Para cada PCR de colonias realizada se calculó el número de reacciones necesarias, más una como control negativo. Con la punta de una micropipeta se picó una colonia seleccionada y se introdujo en los tubos con el Master Mix. Se aplicó un spin por 10 segundos y se llevaron los tubos al termociclador, con la siguiente configuración:

Tabla 5

Programa usado en termociclador para PCR de colonias

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 s	35
Annealing	55	30 s	35
Extensión	72	1 min	35
Extensión final	72	5 min	1

Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental para determinar si existe diferencias significativas en la eficiencia de transformación de *E. coli* cepa TOP10 mediante la variación del volumen plasmídico

utilizado para transformar las células competentes. Se utilizó un diseño completamente al azar, donde se compararon tres tratamientos (inserción de 1 μL , 2 μL y 3 μL de plásmido) con 6 repeticiones de cada uno (n=6). La eficiencia de transformación se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\#CFU}{\text{DNA sembrado en la caja } (\mu\text{g})}$$

$$\text{DNA sembrado en la caja } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Volumen sembrado } (\mu\text{L}) * \text{DNA plasmidico } (\mu\text{g})}{\text{Volumen de transformación } (\mu\text{L})}$$

$$\text{DNA plasmídico } (\mu\text{g}) = \text{Concentración de plásmido } \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right) * \text{Volumen de plásmido } (\mu\text{L})$$

Capítulo IV: Resultados

Diseño *in silico*

Mediante la herramienta informática Benchling se realizó una digestión y ligación *in silico* para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos al realizar cada uno de los procesos, de esta manera se pudo comprobar el correcto ensamblaje mediante electroforesis. En la Tabla 6 podemos observar el tamaño de las secuencias implicadas en el proceso de digestión y ligación, además, del tamaño del plásmido ensamblado obtenido: pSB1C3_A593+SIX.

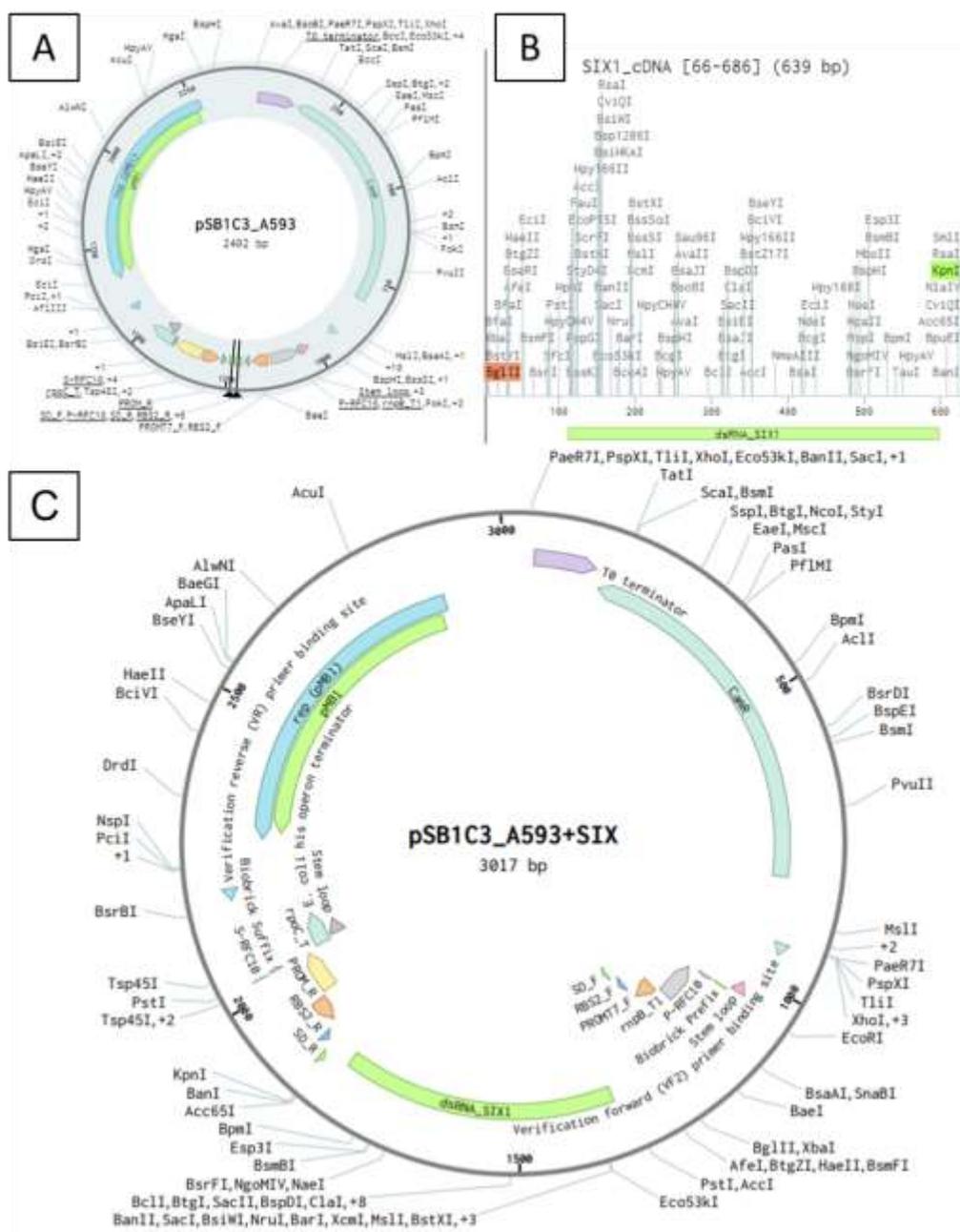
Tabla 6

Tamaño de las secuencias usadas para el ensamble del plásmido final.

Secuencia	Tamaño (pb)
pSB1C3(Backbone)	2070
pSB1C3_A593 (up+down)	2402
pSB1C3_A593+ERG11	
pSB1C3_A593 digestado	2386
SIX Total	720
SIX overhang	639
SIX digestado	631
pSB1C3_A593+SIX	3017

Figura 4

Ensamblaje in silico del plásmido para la producción de RNAi para el silenciamiento del gen *SIX* en *Foc R1*.



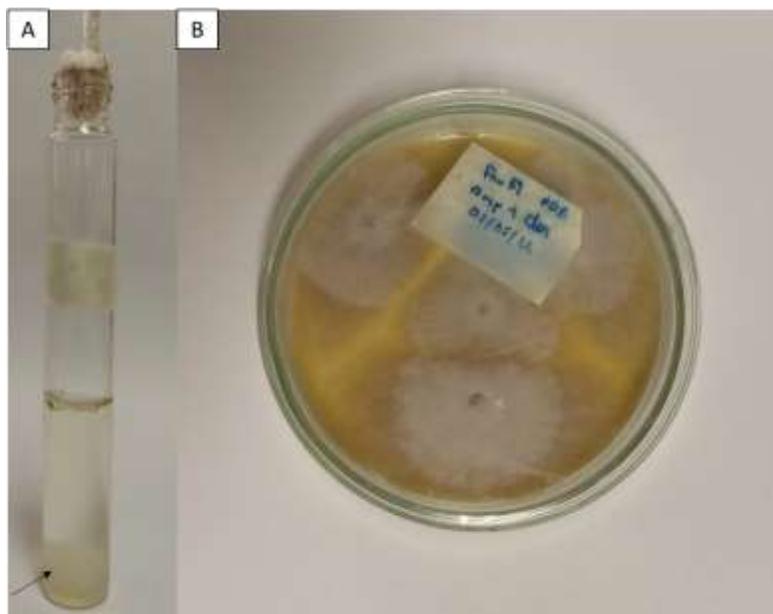
Nota: A) Sitios de corte (BglII y KpnI) en el plásmido pSB1C3. B) Producto de la PCR overhang del gen *SIX* con los sitios de corte agregados. C) Plásmido ensamblado, contiene la secuencia del promotor T7, RBS, secuencia SD, gen *SIX* para la producción de dsRNA, resistencia a cloranfenicol y terminadores transcripcionales.

Crecimiento de Foc R1, extracción de RNA y retrotranscripción

Foc fue cultivado tanto en medio PDA como PDB a 30°C. En PDA el crecimiento fue más retardado que en PDB. Se extrajo RNA de los hongos observados en la Figura 5.

Figura 5

Crecimiento de Foc R1 en diferentes medios de cultivo



Nota: A) Foc R1 después de cinco días de crecimiento en medio PDB, la flecha apunta el crecimiento del hongo. B) Foc R1 después de 2 meses de crecimiento en medio PDA.

Se realizaron dos procesos de extracción de RNA y retrotranscripción. En el primero se extrajo RNA de Foc R1 cultivado en medio PDA durante alrededor de un mes, sin embargo, de este cDNA obtenido no se logró amplificar el gen *SIX*, por lo que se realizó una segunda extracción de RNA y retrotranscripción de Foc R1 cultivado en tubos con PDB durante 5 días a 30°C. De este segundo cDNA obtenido se logró amplificar el gen requerido y proseguir con la experimentación. El cDNA se diluyó (1:10) en tres alícuotas diferentes, para posteriores análisis se utilizó solamente la dilución 1. Las concentraciones y purzas de los cDNA obtenidos se pueden observar en la siguiente tabla:

Tabla 7*Concentración y pureza de muestras de cDNA obtenido de Foc R1*

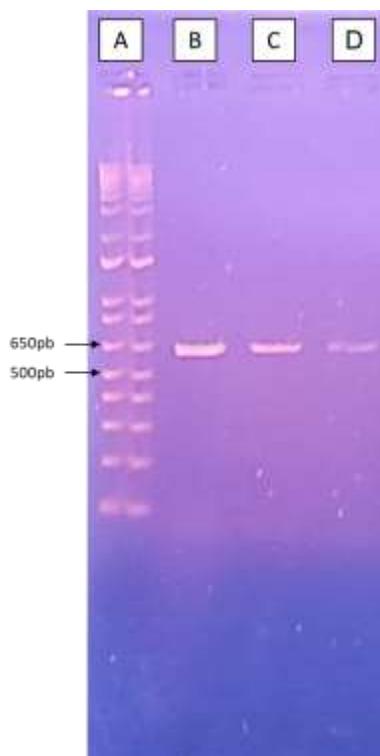
Muestra cDNA	Concentración (ng/ul)	A260	A280	260/280	260/230
cDNA Foc R1	873.3	17.467	10.788	1.62	1.96
cDNA Foc R1 dilución 1	298	5.959	3.642	1.64	1.90

PCR overhang

La PCR overhang se utilizó para añadir sitios de restricción para las enzimas BglII y KpnI a cada extremo del gen *SIX*. La PCR overhang se realizó a tres temperaturas de annealing distintas (54°C, 56°C y 57°C) para encontrar la temperatura óptima de amplificación. Se visualizó el producto de PCR mediante una electroforesis y se obtuvieron tres bandas cercanas a la banda de 650 pb del marcador, por lo que se comprobó la amplificación correcta del fragmento requerido, cuyo tamaño es de 639pb. La banda obtenida con una temperatura de annealing de 54°C resultó más intensa, por este motivo se escogió esta temperatura para la amplificación del gen *SIX* durante todo el proyecto.

Figura 6

Amplificación gen SIX overhang a diferentes temperaturas de annealing.



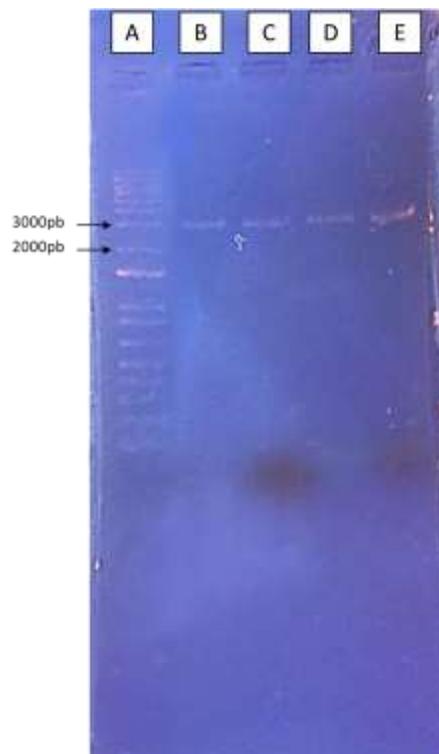
Nota: A) Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen™. B) *SIX* overhang, temperatura de annealing 54°C. C) *SIX* overhang, temperatura de annealing 56°C. D) *SIX* overhang, temperatura de annealing 57°C.

Extracción del plásmido

Se realizaron dos extracciones de plásmido, la primera, se utilizó para extraer el plásmido pSB1C3_A593+ERG11 donado por del grupo de iGem Ecuador a partir de una cepa DH5 α de *E. coli*, cuyo tamaño es de 2857pb. En la Figura 7 se observa los resultados de esta extracción, en los pocillos B-E se encontraron cuatro bandas cuyo tamaño ronda los 3000pb. La segunda se usó para extraer el plásmido pSB1C3_A593+*SIX* que posteriormente será explicado.

Figura 7

Extracción del plásmido pSB1C3_A593+ERG11



Nota: A) Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen™. B-C) Extracción de plásmido mediante el PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit. D-E) Extracción del plásmido mediante el método de lisis alcalina.

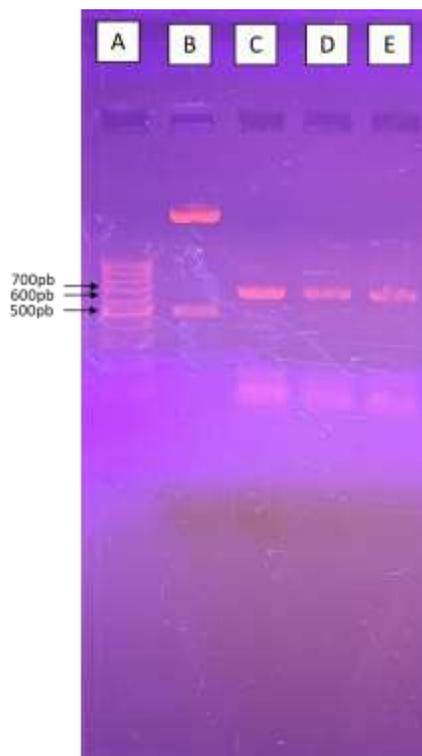
Digestión, purificación y ligación

Se digirió tanto el plásmido como el gen *SIX* con las enzimas de restricción KpnI y BglII para su posterior ensamblaje. Ambos digestados fueron corridos en un gel de electroforesis para corroborar el tamaño de los productos de la digestión. En la Figura 8, el carril B muestra el plásmido pSB1C3_A593+ERG11 extraído de *E. coli* cepa DH5 α digerido durante 3 horas. Se obtuvieron dos bandas de diferentes tamaños, una cercana a los 500 pb y otra muy por encima de los 1000 pb que llega a mostrar el marcador usado. De manera *in silico* se puede constatar que la banda pequeña es de 471 pb mientras que la grande es de 2386 pb, lo que coincide con los resultados conseguidos. Por otra parte, los carriles C-E muestran el gen *SIX* digerido durante distintos periodos de tiempo: 3 horas, 1 hora y 30

minutos. Todas las bandas se encuentran entre los 600 pb y 700 pb, el tamaño *in silico* es de 631 pb, lo que se encuentra entre el rango mencionado.

Figura 8

Electroforesis para visualizar la digestión del plásmido pSB1C3_A593+ERG11 y genes SIX.



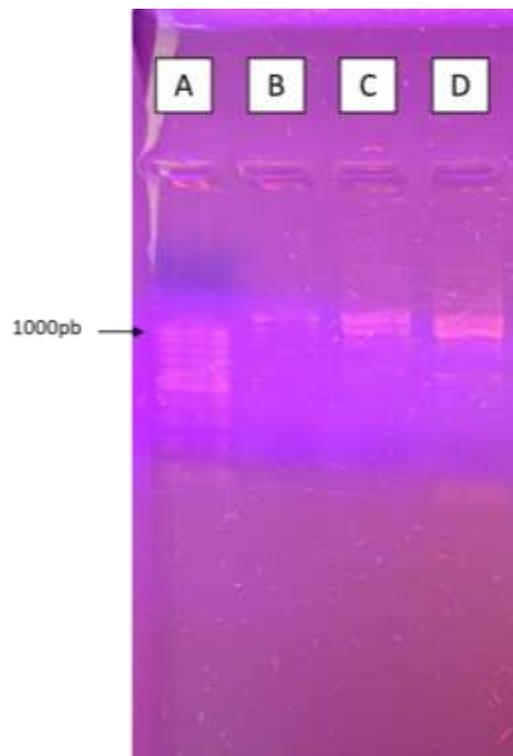
Nota: A) Marcador GeneRuler 100pb DNA Ladder de Thermo Scientific. B) Plásmido digerido durante 3 horas. C) *SIX* digerido durante 3 horas. D) *SIX* digerido durante 0.5 horas. E) *SIX* digerido durante 1 hora.

La electroforesis mostrada en la Figura 8 se usó para cortar las bandas obtenidas, en el caso del plásmido se cortó la banda grande 2386 pb, mientras que se cortó el resto de bandas claramente visibles del gen *SIX*. Se midieron las concentraciones de cada una de las bandas purificadas a partir del gel mediante un NanoDrop, y se obtuvieron los siguientes datos: plásmido pSB1C3 linealizado (11.7 ng/ μ L), *SIX* digerido durante 3 horas (13.7 ng/ μ L), *SIX* digerido durante 0.5 horas (10.9 ng/ μ L), *SIX* digerido durante 1 hora (12.0 ng/ μ L). Con estos datos se calculó los volúmenes para cada

componente de la reacción utilizando el programa NEBioCalculator y utilizando una relación inserto vector de 25:1. Para comprobar la ligación se realizó un PCR con los primers BBa_G00100 y BBa_G00101, se obtuvieron los resultados de la Figura 9. El amplicón obtenido tiene que ser de un tamaño de 1261pb, como se observa en la figura previamente mencionada, se obtuvieron bandas ligeramente mayores de 1000 pb lo que comprueba la ligación. En los pocillos C-D se observan bandas dobles, lo que podría sugerir generación de plásmidos no deseados.

Figura 9

PCR del producto de ligación con los primers BBa_G00100 y BBa_G00101.



Nota: A) Marcador GeneRuler 100pb DNA Ladder de Thermo Scientific. B) PCR de ligado del plásmido con el gen *SIX* durante 0.5 horas. C) PCR de ligado del plásmido con el gen *SIX* durante 1 hora. D) PCR de ligado del plásmido con el gen *SIX* durante 3 horas.

Transformación

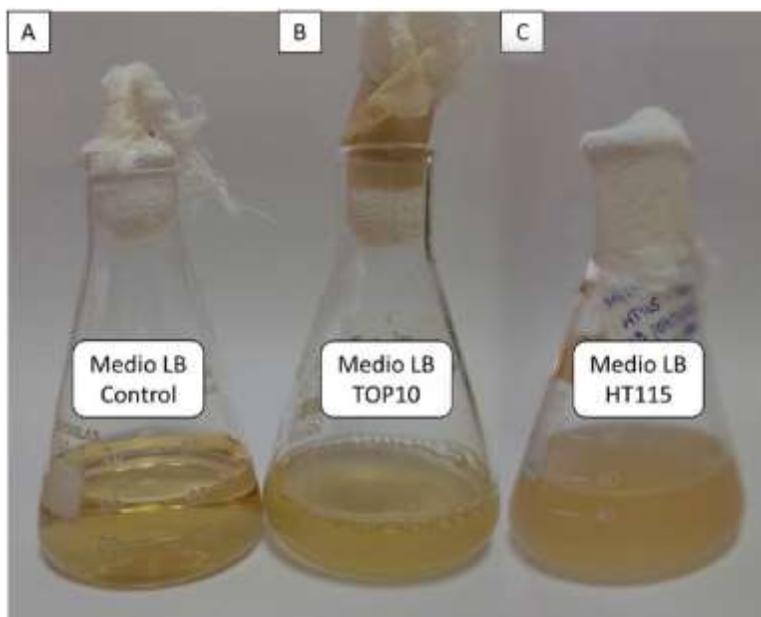
Se realizaron dos transformaciones, en la primera se utilizó el plásmido pSB1C3_A593+SIX recién ligado para transformar bacterias *E. coli* TOP10. Mientras que, en la segunda, se utilizó el plásmido extraído las bacterias *E. coli* TOP10 transformadas, para transformar en otra cepa de *E. coli*: HT115.

Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes se realizó una inoculación de al menos 100 μ L de la cepa que iba a ser utilizada en un matraz con 50 mL de caldo LB y se la dejó en agitación hasta que su OD medido a 600nm marque 0.3. En la Figura 10 se observan los cultivos utilizados para la preparación de células competentes.

Figura 10

Cultivo de Escherichia coli cepa TOP10 y HT115 en caldo LB.



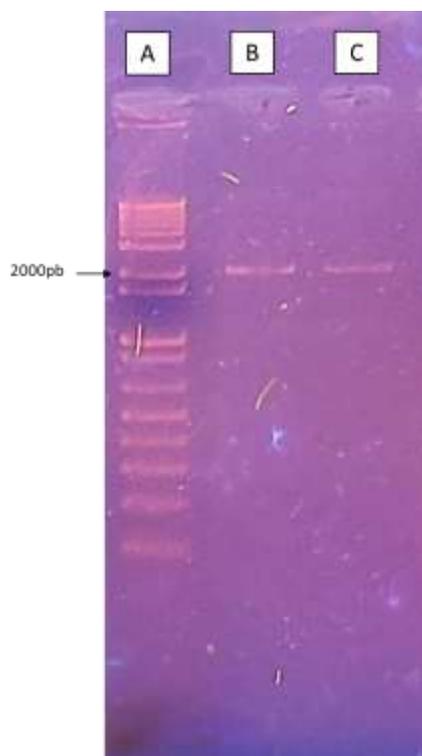
Nota: A) Caldo LB control, sin crecimiento bacteriano. B) Crecimiento de *E. coli* TOP10 a 25°C. C) Crecimiento de *E. coli* HT115 a 25°C.

Extracción de plásmido

Una segunda extracción de plásmido se realizó para obtener el plásmido ensamblado pSB1C3_A593+SIX de 3017 pb a partir *E. coli* cepa TOP10 después de la transformación y comprobación de la presencia del plásmido mediante PCR de colonias. En la Figura 11 se observan los resultados de la segunda extracción, los pocillos B-C muestran dos bandas que rondan los 2000 pb. Además, se midió la concentración y pureza de las extracciones de plásmido ensamblado con el gen *SIX*, se obtuvieron los resultados de la Tabla 8.

Figura 11

Extracción del plásmido ensamblado pSB1C3_A593+SIX.



Nota: A) Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen™. B-C) Extracción de plásmido mediante el PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit de dos colonias distintas (B y C respectivamente) transformadas con el plásmido ensamblado.

Tabla 8

Concentración y pureza de las extracciones de plásmido de la colonia B y C

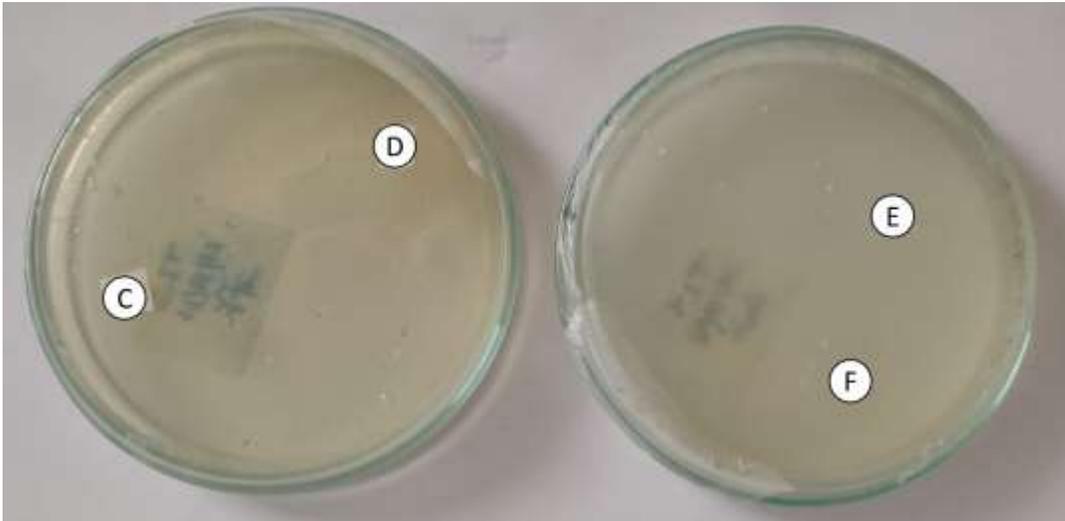
Muestra plásmido ensamblado	Concentración (ng/ul)	260/280	260/230
Extracción colonia B	7.31	2.2	1.63
Extracción colonia C	11.53	1.823	0.579

Crecimiento células transformadas

Al realizar el proceso de transformación en *E. coli* TOP10 se obtuvieron 4 cajas Petri con medio agar LB más cloranfenicol. Una de las cajas sirvió de control y en las otras tres se utilizó los tres diferentes ligados realizados (pSB1C3_A593+SIX digerido durante 0.5 horas, pSB1C3_A593+SIX digerido durante 1 hora, pSB1C3_A593+SIX digerido durante 3 horas). En el control negativo y plásmido+SIX digerido durante 3 horas no se observó ningún crecimiento, mientras que se observaron pocas colonias en las dos cajas restantes. En la Figura 12 a la izquierda se observa la caja Petri de la transformación realizada a partir del ligado obtenido del plásmido+SIX digerido durante 0.5 horas y a la derecha el ligado del plásmido+SIX digerido durante 1 hora.

Figura 12

Transformación en E. coli TOP10 con el plásmido pSB1C3_A593+SIX.



Nota: C-F) Colonias escogidas para la verificación por PCR de colonias.

Por otro lado, la transformación en HT115 produjo varias colonias claramente visibles. También se utilizó cuatro cajas Petri: una como control negativo y tres a partir transformaciones a partir del plásmido extraído de Top 10. En las tres cajas crecieron mientras que en el control negativo no se reportó crecimiento.

Figura 13

Transformación en E. coli HT115 con el plásmido pSB1C3_A593+SIX.



Nota: Repeticiones de la transformación en *E. coli* HT115 con el plásmido pSB1C3_A593+SIX

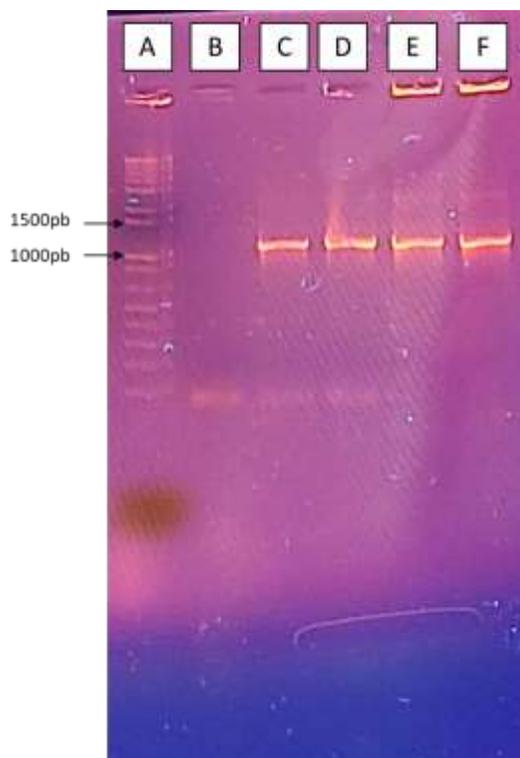
PCR de colonias

Se realizó PCR de colonias para verificar la presencia del plásmido ligado en cada una de las cepas utilizadas. Los primers usados en la PCR de colonias (BBa_G00100 y BBa_G00101) producen un amplicón de 1261 pb. Este tamaño se verificó mediante electroforesis. En la Figura 14 se puede observar cuatro bandas (C-F) obtenidas de diferentes colonias que se encuentran entre 1000 pb y 1500 pb, verificándose la transformación en TOP10.

Para la transformación en HT115 se escogieron 8 colonias distintas al azar entre las tres cajas obtenidas para realizar PCR de colonias. No se obtuvieron resultados positivos de estas PCR de colonias.

Figura 14

PCR de colonias de *E. coli* TOP10.



Nota: Confirmación de la presencia del plásmido mediante PCR de colonias de *E. coli* TOP10. A) Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen™. B) Control negativo. C-F) Diferentes colonias obtenidas de la transformación.

Diseño experimental

Para el diseño experimental se varió el volumen de plásmido añadido a las células competentes para posteriormente realizar la transformación. Se insertó 1 μL (tratamiento 1), 2 μL (tratamiento 2) y 3 μL (tratamiento 3) del plásmido pSB1C3_A593+SIX de concentración 15.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El tratamiento 1 obtuvo un número promedio de UFC de 7.17 colonias por caja, y una eficiencia de transformación promedio de 4.68×10^3 , el tratamiento 2 obtuvo promedio de UFC de 50.67 y una eficiencia de transformación promedio de 1.65×10^4 , el tratamiento 3 obtuvo promedio de UFC de 54.83 y una eficiencia de transformación promedio de 1.19×10^4 . En la Tabla 9 se observan los resultados de

eficiencia obtenidos para cada tratamiento y su repetición. Mediante un ANOVA se obtuvo un valor F de 0.64299, mientras que el valor F tabulado es de 3.68232. Mediante la regla de decisión se estableció que al ser F tabulada mayor que F obtenido se acepta la hipótesis nula. Por lo que se determinó que todos los tratamientos producen el mismo efecto en la eficiencia de transformación bacteriana.

Tabla 9

Eficiencia de transformación obtenida para el diseño experimental.

EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN			
Repetición #	1 ul	2ul	3ul
1	1,31E+03	5,55E+03	1,74E+03
2	0,00E+00	0,00E+00	1,31E+03
3	3,27E+03	2,55E+04	4,35E+04
4	0,00E+00	0,00E+00	1,07E+04
5	0,00E+00	2,94E+03	6,75E+03
6	2,35E+04	6,53E+04	7,62E+03
Control negativo	0	0	0
PROMEDIO	4,68E+03	1,65E+04	1,19E+04

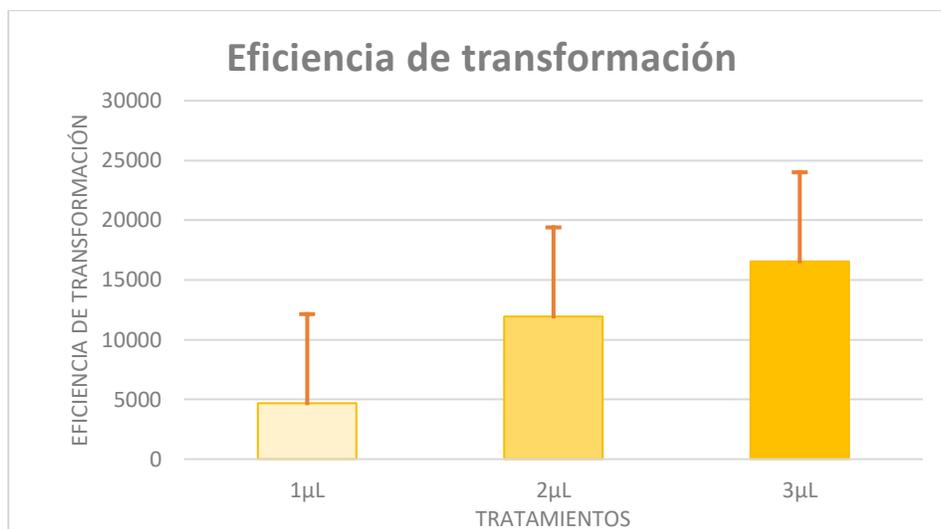
Tabla 10

ANOVA de la eficiencia de transformación

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	F TAB	p value
TRATAMIENTO	2	429414510	214707255	0,64299	3,68232	0,53961
ERROR	15	5008797470	333919831			
TOTAL	17	5438211980				

Figura 15

Gráfico de barras de la eficiencia de transformación obtenida en *E. coli*.



Para corroborar los resultados se realizó el test de Duncan, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 11

Test Duncan Alfa=0.05.

Tratamientos	Medias	n	E.E.
1 μL	4680	6	7456,65 A
2 μL	11936,67	6	7456,65 A
3 μL	16548,33	6	7456,65 A

Capítulo V: Discusión

En la presente investigación se llevó a cabo el ensamblaje del plásmido pSB1C3_A593+SIX mediante enzimas de restricción-ligación y posterior transformación en *Escherichia coli* TOP10.

Se realizaron dos procesos de extracción de RNA y retrotranscripción. En el primero se extrajo RNA de Foc R1 cultivado en medio PDA durante alrededor de un mes, sin embargo, de este cDNA obtenido no se logró amplificar el gen SIX, por lo que se realizó una segunda extracción de un cultivo fresco del cual si se pudo amplificar el gen SIX. Esto pudo deberse a que Foc tiene la capacidad de sobrevivir en ausencia de raíces de planta mientras el hongo se mantiene latente, sin embargo, el momento en que se generan raíces del huésped cercanas a Foc, este reprograma su expresión génica para superar las respuestas de defensas de la planta y logra infectarla (Michielse et al., 2009). Uno de los genes que se generan durante el proceso de infección es SIX1. Probablemente, al extraer RNA de un hongo de más de un mes de crecimiento en medio PDA, se encontraba con un bajo nivel de transcripción del gen SIX1, por lo que no se pudo amplificar el gen deseado (van der Does et al., 2016). Se logró la amplificación del gen SIX1 al extraer RNA de un cultivo fresco de hongo, sin embargo, otras opciones para elevar el nivel de transcripción de los genes de patogenicidad pudieron haber sido el uso de metabolitos secundarios a modo de exudados de raíz en el medio de cultivo o la extracción directa de hongo a partir de plantas infectadas (Buxton, 1962).

Para conseguir el ensamblaje entre el plásmido pSB1C3_A593 y el gen SIX, se cortaron ambos fragmentos con las enzimas de digestión KpnI y BglII. En un inicio se realizó un proceso de digestión durante 15 minutos tal como menciona el protocolo, sin embargo, no se logró una digestión completa, por lo que se probó digestando durante un mayor tiempo. Tal como indica Matsumura, las incubaciones largas son recomendables debido a que la velocidad de reacción disminuye conforme el sustrato se agota y para que la reacción se complete correctamente es mejor brindar a la reacción del tiempo suficiente (Matsumura, 2015). Por el otro lado, es importante no sobredigitar los fragmentos de DNA

ya que podrían producir actividad star, reconocimiento de secuencia relajado, por tal motivo se realizaron tres nuevas digestiones con un tiempo de incubación de 30 minutos, 1 hora y 3 horas. Aparentemente se obtuvieron bandas más claras y definidas al realizar incubaciones de mayor duración tal como se aprecia en la Figura 8.

A continuación, el proceso de ligación produjo varios inconvenientes al producirse una recircularización del plásmido en la mayoría de las ocasiones. La reacción de ligación pudo fallar por diversas razones, entre las principales encontramos: la producción de extremos no uniformes producidos por extensiones incompletas de la DNA polimerasa, la presencia de inhibidores de ligasa como agarosa o sales provenientes del previo proceso de purificación a partir de gel o el relleno de los extremos pegajosos por las DNA polimerasas que se purifican con el producto de PCR (Matsumura, 2015). Para controlar la presencia de sales, se midió la concentración y pureza del vector y el inserto previo a la ligación. Solo se utilizaron las muestras con una relación A260/230 mayor a 1.8, lo que se considera aceptable, bajo a este valor se indica la presencia de contaminantes como EDTA, proteínas, sales, lípidos, fenoles y/o carbohidratos (Lucena-Aguilar et al., 2016).

Para comprobar la ligación se realizó una PCR (Figura 9), donde se observan múltiples bandas, lo que podría indicar múltiples reacciones de ligación con distintos fragmentos producto de reacciones inespecíficas de digestión, mientras más tiempo se dejó incubando la reacción de digestión más bandas se generaron en la ligación. A pesar de esto, se utilizaron todos los fragmentos para proceder a la transformación.

Se escogió la cepa en TOP10 para la primera transformación debido a que es una cepa ideal para la clonación y la propagación de plásmidos de alta eficiencia. Esta cepa permite una replicación estable y un gran número de copias de plásmidos. Sin embargo, se obtuvo una baja eficiencia de transformación debida a distintos problemas, por ejemplo, células poco competentes o la inserción de ligados incorrectos.

Por otro lado, se utilizó HT115 como cepa receptora por dos principales razones. En primer lugar, esta cepa tiene los genes que codifican para la polimerasa T7, lo que ayuda a generar el dsRNA mediado por los promotores T7 del diseño del plásmido pSB1C3_A593+SIX (Papić et al., 2018). En segundo lugar, tiene una mutación en la secuencia que codifica para la enzima RNasa III, lo que permite la bioacumulación de dsRNA (Romo, 2014). Para la verificación de la transformación se escogieron 8 colonias al azar entre las tres cajas Petri utilizadas, pero en ninguna se confirmó la presencia del gen de interés mediante PCR de colonias. Esto podría deberse a diversas razones por ejemplo el uso de la cantidad incorrecta de antibiótico en el medio o la ineficiencia del mismo, la baja concentración de DNA plasmídico insertado, insuficiente tiempo de shock térmico, o el uso de células no competentes (iGem, 2022). Además, se pudo dar el caso de haber escogido colonias no transformadas para realizar la PCR de colonias, por ejemplo, colonias satélites. En el estudio de Nicoloff et al. colonias satélites aparecieron después de dos días de incubación en medio suplementado con cloranfenicol, momento en que se realizó la PCR de colonias, por lo que las colonias no transformadas pudieron haberse confundido con las transformadas (Nicoloff H. & Andersson, 2016).

También se buscó evaluar la eficiencia de transformación al variar la cantidad en masa de plásmido pSB1C3_A593+SIX añadido a las células competentes de *Escherichia coli* para su posterior transformación. Se realizaron 3 tratamientos en los cuales se añadió 1, 2 y 3 μL del plásmido de 15.31 ng/ μL de concentración, lo que genera una masa de 15.31 ng, 30,62 ng y 45,93 ng respectivamente. Según el análisis de varianza, ANOVA, las eficiencias de transformación obtenidas no mostraron diferencia significativa entre los 3 tratamientos, basándonos en el valor p de 0,5396. Para verificar lo mencionado también se realizó una prueba Duncan (alfa: 0.05) la cual mostró a los tres tratamientos (1 μL , 2 μL y 3 μL) dentro del mismo grupo. Esto pudo deberse a la baja concentración de plásmido obtenido. Normalmente se recomienda transformar con un volumen de 2 μL , pero de alta concentración. Se necesita de un super exceso de DNA, aproximadamente 200ng de DNA para realizar una

transformación eficiente. Por lo que los 3 tratamientos pudieron haber representado muy poca cantidad de DNA para la transformación (Galván Cejudo et al., 2015).

Es importante mencionar que luego de la producción del plásmido hace falta más estudios para comprobar el correcto funcionamiento del plásmido y si este cumple su objetivo de producir dsRNA para el silenciamiento del gen *SIX* en *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, también se debería evaluar si este biopesticida se vuelve una opción eficiente y rentable a la hora de controlar Foc, tanto a la raza 1 como raza 4.

Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

En el presente proyecto de investigación, se ensambló un plásmido capaz de producir el silenciamiento del gen de virulencia *SIX* de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raza 1. El plásmido fue construido a partir de un fragmento del gen *SIX1* y el plásmido pSB1C3_A593 mediante un ensamblaje con la técnica de restricción y ligación. El plásmido generado se lo nombró como pSB1C3_A593+*SIX*.

Se extrajo RNA total a partir del hongo Foc R1 para posteriormente retrotranscribirlo en cDNA mediante primers de oligo dT. Se utilizó el cDNA para conseguir un amplicón del gen *SIX* mediante la técnica de PCR overhang, la cual añadió los sitios de restricción para KpnI y BglII a cada extremo del fragmento del gen de interés. De esta manera, el amplicón se volvió compatible con la plataforma modular de AgroBactory 593.

Se transformó por choque térmico la cepa *TOP10* de *Escherichia coli* con el plásmido pSB1C3_A593+*SIX*. El plásmido se replicó en la bacteria y se extrajo para realizar la segunda transformación. La transformación de *E. coli* cepa HT115 produjo crecimiento de colonias bacterianas en el medio agar LB suplementado con cloranfenicol, sin embargo, la PCR de colonias no generó resultados positivos. Esto pudo ser producto de varios factores como la elección de colonias satélites para realizar la PCR de colonias, la ineficacia del antibiótico usado o la contaminación de los reactivos utilizados.

De acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) no existe diferencia estadística significativa (valor p: 0,53961) en la eficiencia de transformación de *Escherichia coli* al variar el volumen del plásmido pSB1C3_A593+*SIX* ($1\mu\text{L}$, $2\mu\text{L}$ y $3\mu\text{L}$) añadido a las células competentes para su posterior transformación. Esto fue corroborado por la prueba Duncan (alfa: 0.05) que mostró los tres tratamientos ($1\mu\text{L}$, $2\mu\text{L}$ y $3\mu\text{L}$) en un solo grupo.

Recomendaciones

Se recomienda, utilizar el método de secuenciación de DNA Sanger para secuenciar el plásmido pSB1C3_A593+SIX con el fin de verificar el correcto ensamblaje del plásmido.

Se recomienda utilizar el método de electroporación para la transformación de *Escherichia coli*, para maximizar la eficiencia de transformación.

Se recomienda realizar los procesos de digestión, ligación y transformación de manera consecutiva y de recorrido, para evitar procesos de degradación durante el almacenamiento entre proceso y proceso.

Se recomienda verificar cada paso durante todo el proceso de clonación de DNA, para evitar la pérdida innecesaria de reactivos y tiempo.

Capítulo VII: Bibliografía

Agrocalidad. (2020). *PLAN NACIONAL DE CONTINGENCIA PARA LA PREVENCIÓN, DETECCIÓN Y CONTROL*

DE Fusarium oxysporum f.sp. cubense Raza 4 Tropical (Foc R4T).

[https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-](https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2021/01/Acuerdo_Ministerial_142_Plan_fusarium_OK.pdf)

[content/uploads/2021/01/Acuerdo_Ministerial_142_Plan_fusarium_OK.pdf](https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2021/01/Acuerdo_Ministerial_142_Plan_fusarium_OK.pdf)

Armas, A. (2021, October 20). *Registry of Standard Biological Parts: BBa K3893000.*

http://parts.igem.org/Part:BBa_K3893000

Benner, S. A., & Sismour, A. M. (2005). Synthetic biology. *Nature Reviews Genetics* 2005 6:7, 6(7), 533–

543. <https://doi.org/10.1038/nrg1637>

Boada Acosta, Y. F. (2018). *A systems engineering approach to model, tune and test synthetic gene*

circuits. <https://doi.org/10.4995/THESIS/10251/112725>

Bonilla, M., Ordaz, V., Oropeza, C., Ac, S.-E., & David, M.-B. L. (2018). Secreted in Xylem (Six) Genes in

Fusarium oxysporum f. sp. cubense and Their Potential Acquisition by Horizontal Transfer. Adv

Biotech & Micro, 10(1). <https://doi.org/10.19080/AIBM.2018.10.555779>

Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Cabanás, C. G. L., & Mercado-Blanco, J. (2019). Biological control

agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR).

<https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00616/FULL>

Buxton, E. W. (1962). Root exudates from banana and their relationship to strains of the *Fusarium*

causing Panama wilt. *Annals of Applied Biology*, 50(2), 269–282. [https://doi.org/10.1111/J.1744-](https://doi.org/10.1111/J.1744-7348.1962.TB06009.X)

[7348.1962.TB06009.X](https://doi.org/10.1111/J.1744-7348.1962.TB06009.X)

Correa, M. F., Adjounian, H., & Adjounian, S. (2008, June). Silenciamiento de genes mediante RNA

interferencia: Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *Archivos*

Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642008000100006

Czislowski, E., Fraser-Smith, S., Zander, M., O'Neill, W. T., Meldrum, R. A., Tran-Nguyen, L. T. T., Batley, J., & Aitken, E. A. B. (2018). Investigation of the diversity of effector genes in the banana pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, reveals evidence of horizontal gene transfer. *Molecular Plant Pathology*, 19(5), 1155. <https://doi.org/10.1111/MPP.12594>

Dhivya, S., Ashutosh, S., Gowtham, I., Baskar, V., Harini, A. B., Mukunthakumar, S., & Sathishkumar, R. (2020). Molecular identification and evolutionary relationships between the subspecies of *Musa* by DNA barcodes. *BMC Genomics*, 21(1), 659. <https://doi.org/10.1186/S12864-020-07036-5>

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*, 871, 1468. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01468/BIBTEX>

Dongzhen, F., Xilin, L., Xiaorong, C., Wenwu, Y., Yunlu, H., Yi, C., Jia, C., Zhimin, L., Litao, G., Tuhong, W., Xu, J., & Chunsheng, G. (2020). *Fusarium* Species and *Fusarium oxysporum* Species Complex Genotypes Associated With Yam Wilt in South-Central China. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01964/FULL>

Fletcher, S. J., Reeves, P. T., Hoang, B. T., & Mitter, N. (2020). A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. *Frontiers in Plant Science*, 11, 51. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00051/BIBTEX>

Galván Cejudo, A., Tejada, M., Camargo, A., Javier Higuera, J., & Fernández Reyes, E. (2015). 48. *Transformación de Escherichia coli con un plásmido recombinante.*

- Gonzalo, A., Murillo, Á., del Rocío, M., Bermeo, R., José, R., & Bolaño, T. (2021). Estudio socioeconómico de los productores de banano orgánico, Cantón Milagro, Ecuador. *Revista Tecnológica - ESPOL*, 33(3), 168–180. <https://doi.org/10.37815/RTE.V33N3.869>
- Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium Wilt Syndrome. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 23–39. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-080615-095919>
- iGem. (2022). *Troubleshooting Transformations*. <https://2020.igem.org/Resources/Troubleshooting/Transformations>
- iGEM Ecuador. (2021a). *Agrobactory 593*. <https://2021.igem.org/Team:Ecuador>
- iGEM Ecuador. (2021b). *Team:Ecuador/Description*. <https://2021.igem.org/Team:Ecuador/Description#ref3>
- iGEM Foundation. (2022). *iGEM*. <https://igem.org/>
- Jangir, P., Mehra, N., Sharma, K., Singh, N., Rani, M., & Kapoor, R. (2021). Secreted in Xylem Genes: Drivers of Host Adaptation in *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 628611. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.628611/FULL>
- Kightlinger, W., Warfel, K. F., Delisa, M. P., & Jewett, M. C. (2020). Synthetic Glycobiology: Parts, Systems, and Applications. *ACS Synthetic Biology*, 9(7), 1534–1562. https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.0C00210/ASSET/IMAGES/LARGE/SB0C00210_0005.JPEG
- Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Lamprecht, S. C., & Crous, P. W. (2019). Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43, 1. <https://doi.org/10.3767/PERSONIA.2019.43.01>

- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, *14*(4), 264. <https://doi.org/10.1089/BIO.2015.0064>
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., Onofre, J. G., & Jiménez-Gasco, M. D. M. (2020). Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, the Fusarium Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants*, *9*(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9091133>
- Martínez-Solórzano, G. E., Rey-Brina, J. C., Martínez-Solórzano, G. E., & Rey-Brina, J. C. (2021). Bananos (Musa AAA): Importancia, producción y comercio en tiempos de Covid-19. *Agronomía Mesoamericana*, *32*(3), 1034–1046. <https://doi.org/10.15517/AM.V32I3.43610>
- Matsumura, I. (2015). Why Johnny can't clone: Common pitfalls and not so common solutions. *BioTechniques*, *59*(3), 4–13. <https://doi.org/10.2144/000114324/ASSET/IMAGES/LARGE/TABLE1.JPEG>
- Maymon, M., Sela, N., Shpatz, U., Galpaz, N., & Freeman, S. (2020). The origin and current situation of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 in Israel and the Middle East. *Scientific Reports* *2020 10:1*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58378-9>
- Michielse, C. B., van Wijk, R., Reijnen, L., Manders, E. M. M., Boas, S., Olivain, C., Alabouvette, C., & Rep, M. (2009). The Nuclear Protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* Is Required for Parasitic Growth. *PLOS Pathogens*, *5*(10), e1000637. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000637>
- Muñoz-Miranda, L. A., Higuera-Ciapara, I., Gschaedler-Mathis, A. C., Rodríguez-Zapata, L. C., Pereira-Santana, A., Figueroa-Yáñez, L. J., Muñoz-Miranda, L. A., Higuera-Ciapara, I., Gschaedler-Mathis, A. C., Rodríguez-Zapata, L. C., Pereira-Santana, A., & Figueroa-Yáñez, L. J. (2019). Breve Descripción de

- la Biología Sintética y la Importancia de su Relación con otras Disciplinas. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 40(1), 1–7. <https://doi.org/10.17488/RMIB.40.1.9>
- Nadal, R., Manzo, G., Orozco, José, Orozco, M., & Guzmán, S. (2009). Diversidad genética de bananos y plátanos (*Musa spp.*) determinada mediante marcadores RAPD. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802009000100001
- Nicoloff H., H., & Andersson, D. I. (2016). Indirect resistance to several classes of antibiotics in cocultures with resistant bacteria expressing antibiotic-modifying or -degrading enzymes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1), 100–110. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKV312>
- NIH. (2017). *Interferencia de ARN (ARNi)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/technai/>
- Noriega, D., Valencia, A., & Villegas, B. (2016). ARN de interferencia (ARNi): una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos plaga. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 19(1), 25–35. <https://doi.org/10.31910/RUDCA.V19.N1.2016.107>
- Olina, A. v., Kulbachinskiy, A. v., Aravin, A. A., & Eshyunina, D. M. (2018). Argonaute Proteins and Mechanisms of RNA Interference in Eukaryotes and Prokaryotes. *Biochemistry (Moscow) 2018* 83:5, 83(5), 483–497. <https://doi.org/10.1134/S0006297918050024>
- Papić, L., Rivas, J., Toledo, S., & Romero, J. (2018). Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture. *Biotechnology Reports*, 20, e00292. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2018.E00292>
- 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, 1395. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01395>
- Rep, M., van der Does, H. C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., de Koster, C. G., & Cornelissen, B. J. C. (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during

colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology*, 53(5), 1373–1383. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2004.04177.X>

Romo, C. (2014). *DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR DE dsRNA ESPECÍFICO TIPO HAIRPIN EXPRESADO EN LA CEPA DE Escherichia coli HT115 (DE3) CONTRA WSSV EN CAMARÓN Litopenaeus vannamei*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste.

van der Does, H. C., Fokkens, L., Yang, A., Schmidt, S. M., Langereis, L., Lukasiewicz, J. M., Hughes, T. R., & Rep, M. (2016). Transcription Factors Encoded on Core and Accessory Chromosomes of *Fusarium oxysporum* Induce Expression of Effector Genes. *PLoS Genetics*, 12(11), 1006401. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006401>

Wang, W., Li, Y., Wang, Y., Shi, C., Li, C., Li, Q., & Linhardt, R. J. (2018). Bacteriophage T7 transcription system: an enabling tool in synthetic biology. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2129–2137. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2018.10.001>

Zhu, K. Y., & Palli, S. R. (2020). Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Ento-011019-025224>, 65, 293–311. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-011019-025224>