



Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen *SGE1* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1 (Foc R1).

Barragán Sánchez, José Leonardo

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

23 de agosto del 2022



JBarragan Tesis Biotec ESPE 2022.txt

Scanned on: 20:51 August 14, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	80
Words with Minor Changes	20
Paraphrased Words	185
Omitted Words	0



Francisco J. Barragan
**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 *SGE1* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1).”** fue realizado por el señor **Barragán Sánchez, José Leonardo**, 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 lo sustente públicamente.

Sangolquí, 15 de agosto de 2022



Flores Flor, Francisco Javier PhD.

C. C. 1713443479



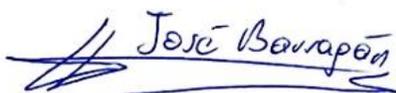
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Barragán Sánchez, José Leonardo**, con cédula de ciudadanía n° **1726689704**, 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 *SGE1* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* 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, 23 de agosto de 2022



Barragán Sánchez, José Leonardo

C. C. 1726689704



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Barragán Sánchez, José Leonardo**, con cédula de ciudadanía n° **1726689704**, 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 *SGE1* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1)"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 23 de agosto de 2022

Barragán Sánchez, José Leonardo

C. C. 1726689704

Dedicatoria

A mis padres Leonardo y Silvia por toda la confianza depositada en mí, todo este esfuerzo lo hice con mucho cariño para ustedes.

A mis hermanos, a mi familia y a mis amigos.

Agradecimientos

Agradezco primero a Dios por estar a mi lado y guiar siempre mi camino, y sobre todo por permitirme cumplir una meta más de vida.

Agradezco a mis padres por ser un pilar fundamental en mi educación, por su apoyo incondicional y por siempre confiar en mí.

A mis hermanos por su cariño y compañía. A todos mis amigos y seres queridos que han sido parte de esta etapa de mi vida. Gracias a las personas que me han apoyado siempre y me han ayudado a seguir adelante.

Al grupo de iGEM Ecuador por compartir sus conocimientos conmigo.

Agradezco a Francisco Flores PhD. por la apertura y guía brindada durante el desarrollo de este trabajo de integración curricular.

Índice de contenido

Resultados de análisis Copyleaks.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenido.....	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	12
Listado de abreviaturas	14
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Planteamiento del problema	17
Justificación del problema.....	18
Objetivos	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Hipótesis.....	20
Capítulo II: Marco teórico.....	21

Cultivo de banano	21
Enfermedades del banano	21
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	21
Tecnología de RNA de interferencia.....	24
Biología sintética	25
<i>Ensamblaje de digestión y ligación</i>	25
Capítulo III: Metodología.....	27
Extracción de RNA Total de Foc (R1)	28
<i>Evaluación de la calidad del RNA y cDNA</i>	28
Transcripción reversa.....	28
Amplificación por PCR	29
<i>Overhang PCR</i>	29
<i>PCR de colonias</i>	30
Extracción de plásmido	31
Ensamblaje de restricción y ligación.....	32
<i>Digestión de plásmido y producto de PCR mediante enzimas de restricción</i>	32
<i>Reacción de ligación</i>	33
Preparación de células competentes.....	33
Transformación bacteriana mediante shock térmico.....	34
Diseño experimental	34
Capítulo IV: Resultados	36
Extracción de RNA Total de Foc (R1)	36

	10
Transcripción reversa.....	36
Amplificación por PCR	37
<i>Overhang PCR</i>	37
Extracción de plásmido.....	38
Ensamblaje de restricción y ligación.....	38
<i>Digestión y purificación del plásmido</i>	38
<i>Digestión y purificación del producto de PCR</i>	39
<i>Reacción de ligación</i>	40
Transformación bacteriana mediante shock térmico en <i>E. coli</i> Top 10.....	42
Extracción de plásmido.....	44
Transformación bacteriana mediante shock térmico en <i>E. coli</i> HT115	45
Diseño experimental	46
<i>Análisis estadístico</i>	46
Capítulo V: Discusión	50
Capítulo VI: Conclusiones	52
Capítulo VII: Recomendaciones.....	53
Capítulo VIII: Bibliografía	54
Apéndices	60

Índice de tablas

Tabla 1 Primers utilizados para las diferentes amplificaciones por PCR	29
Tabla 2 Reactivos de la Overhang PCR	30
Tabla 3 Reactivos de la PCR de colonia.....	30
Tabla 4 Reactivos de la digestión enzimática	32
Tabla 5 Reactivos de la ligación o ensamblaje	41
Tabla 6 Resultados del conteo de colonias posterior a la transformación	47
Tabla 7 Eficiencia de transformación bacteriana	48
Tabla 8 ANOVA para la eficiencia de transformación.....	48

Índice de figuras

Figura 1 Ciclo de infección del patógeno del marchitamiento vascular del banano <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc). A) macroconidios. B) microconidios. C) clamidospora con GFP. D) Fijación de hifas Foc en raíces de banano. E) Colonización de hifas Foc en haces vasculares de raíces de banano. F) Una sección longitudinal de raíces de banano. G) Plantas de banano enfermas. H-I) Haces vasculares del pseudotallo y el rizoma del banano enfermo de color marrón rojizo oscuro.	22
Figura 2 Flujo de trabajo.....	27
Figura 3 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1 en medio PDA.	36
Figura 4 Producto de overhang PCR. A) Resultado in silico del amplicón realizado en Benchling. B) Electroforesis del amplicón.	37
Figura 5 Tamaño del plásmido extraído. A) Mapa de plásmido usando Benchling. B) Electroforesis del DNA plasmídico.	38
Figura 6 Digestión del plásmido con las enzimas de restricción <i>KpnI</i> y <i>BglIII</i> . A) Electroforesis virtual B) Electroforesis en gel de agarosa 1% C) Tamaño de las bandas obtenidas en Benchling en la digestión.....	39
Figura 7 Cálculo de la masa requerida del inserto en proporción (7:1)	40
Figura 8 Ensamblaje del plásmido in silico.	42
Figura 9 Cultivo puro de <i>E. coli</i> Top 10 transformado con el plásmido pSB1C3_A593 + SGE1 con resistencia a cloranfenicol.	43
Figura 10 Amplicón obtenido a partir de la PCR de colonia A) Resultado in silico del amplicón realizado en Benchling. B) Electroforesis.....	44
Figura 11 Electroforesis del plásmido extraído	45

Figura 12 Cultivo puro de E. coli HT115 transformado con el plásmido ensamblado	46
Figura 13 Temperatura de choque térmico vs Eficiencia de transformación	49

Listado de abreviaturas

°C: Grados Celsius

cDNA: Complementary DNA

DNA: Deoxyribonucleic Acid

dsRNA: double stranded-RNA

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

Foc R1: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

Foc TR4: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4

Foc: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

iGEM: International Genetically Engineered Machine

LB: Luria Bertani

miRNA: micro interfering RNA

PCR: Polymerase chain reaction

PDA: Agar papa dextrosa

RCF: Relative Centrifugal Force

RISC: RNA-induced silencing complex

RNA: Ribonucleic acid

RNAi: RNA interference

SGE1: *SIX* Gene Expression 1

siRNA: small interfering RNA

SIX: secreted in xylem

UFC: Unidad formadora de colonia

µL: Microlitro

Resumen

El banano se ha convertido en un alimento básico para millones de personas y sobre todo un cultivo de importancia económica para varios países en vías de desarrollo. En Ecuador, el banano representa uno de los principales productos de exportación pero su producción se encuentra seriamente amenazado debido al marchitamiento por *Fusarium* causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. El control del patógeno presenta dificultad debido a que logra sobrevivir durante muchos años en el suelo inclusive en ausencia de hospedador. Actualmente, no existe un control químico efectivo contra Foc TR4, además de que no se ha visto un resultado positivo en la contención del patógeno por lo que su dispersión ha puesto en alerta fitosanitaria a muchos países productores de banano. Una posible solución a este problema es la producción de biopesticidas mediante biología sintética, en este caso se planea utilizar la tecnología de silenciamiento de genes basado en la interferencia de RNA para la producción de moléculas de RNA de doble cadena, lo que permite silenciar la expresión de genes diana específicos del patógeno. Esto se logró mediante la clonación de cDNA a partir del gen *SIX Gene Expression 1 (SGE1)* en el plásmido PSB1C3_A593, esto se realizó mediante ensamblaje de restricción y ligación. El cassette de expresión obtenido PSB1C3_A593 + *SGE1* es capaz de producir RNA de doble cadena para el silenciamiento del gen *SGE1*, este gen demostró ser esencial para la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. El plásmido PSB1C3_A593 + *SGE1* se utilizó para la transformación bacteriana de *E. coli* y se comprobó mediante PCR de colonia. Adicionalmente, se realizó 3 tratamientos de transformación bacteriana a diferentes temperaturas de shock térmico ($T_1=40^{\circ}\text{C}$, $T_2=42^{\circ}\text{C}$ y $T_3=44^{\circ}\text{C}$) por un tiempo de 30 segundos.

Palabras clave: ensamblaje de restricción y ligación, RNA de interferencia, transformación bacteriana.

Abstract

Banana has become a staple food for millions of people and above all a crop of economic importance for several developing countries. In Ecuador, banana represents one of the main export products, but its production is severely threatened due to Fusarium Wilt of Banana caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Control of the pathogen is difficult because it manages to survive for many years in the soil, even in the absence of a host. Currently, there is no effective chemical control against Foc TR4, in addition to the fact that no positive result has been seen in the containment of the pathogen, which is why its dispersion has put many banana-producing countries on phytosanitary alert. A possible solution to this problem is the production of biopesticides through synthetic biology, in this case it is planned to use gene silencing technology based on RNA interference to produce double-stranded RNA molecules, which allows silencing the expression pathogen-specific target genes. This was done by cloning cDNA from the *SIX* Gene Expression 1 (*SGE1*) gene into plasmid PSB1C3_A593, this was done by restriction and ligation assembly. The expression cassette obtained PSB1C3_A593 + *SGE1* can produce double-stranded RNA for the silencing of the *SGE1* gene, this gene stands out to be essential for the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Plasmid PSB1C3_A593 + *SGE1* was used for *E. coli* transformation and checked it by colony PCR. Additionally, 3 bacterial transformation treatments were carried out at different heat shock temperatures (T1=40°C, T2=42°C and T3=44°C) for a period of 30 seconds.

Keywords: digest and ligate assembly, RNA interference, bacterial transformation.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

La inseguridad alimentaria a escala mundial ha crecido del 22,6% en 2014 al 26,6% en el 2019, afectando actualmente a más del 30% de la población mundial debido al alto costo de dietas saludables (FAO et al., 2021). Los sistemas de producción alimentario y agrícola contribuyen a los pilares de la seguridad alimentaria, en la actualidad la agricultura presenta desafíos como: aumento de la demanda de alimentos, efectos adversos debido al cambio climático, pérdida de cultivos, sobreexplotación de recursos naturales, entre otros (FAO, 2021)

El banano (*Musa spp.*) es una planta perteneciente a la familia musáceas, se cultiva en regiones tropicales y subtropicales, se ha convertido en un alimento básico para millones de personas y sobre todo un cultivo de importancia económica para varios países en vías de desarrollo de Sudamérica, África y Sudeste Asiático (Teycheney et al., 2007).

En Ecuador, el banano y sus productos derivados representan uno de los principales productos de exportación y por ende representa un pilar importante en la economía del país, siendo el sector bananero una de las principales fuentes de ingresos a lo largo del tiempo (Aguilar, 2015). Ecuador se ha convertido en el mayor proveedor de banano a nivel mundial, en 2018 los datos preliminares indican que Ecuador cubre el 34% de las exportaciones de banano en el mercado mundial, alcanzando los 6,6 millones de toneladas exportadas (FAO, 2020).

Las enfermedades de plantas son un problema que pone en riesgo a la agricultura, siendo estas las limitantes en su producción. El cultivo y producción de banano se encuentra seriamente amenazado debido al marchitamiento por *Fusarium*, el agente causal de esta enfermedad es el hongo del suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) (Dita et al., 2018).

El control del patógeno presenta dificultad debido a que logra sobrevivir durante muchos años en el suelo inclusive en ausencia de hospedador, es un patógeno vascular por lo que escapa del contacto de medios de control cuando ya infecta a la planta, es de fácil propagación y se propaga rápidamente debido al monocultivo de banano (Li et al., 2022). En la actualidad

no existe un control químico efectivo contra FocTR4, además de que no se ha visto un resultado positivo en la contención del patógeno ya que se observa propagación entre países, incluso entre continentes (Dale et al., 2017).

Debido a esto, la dispersión de *Fusarium oxysporum* ha puesto en alerta fitosanitaria a muchos países productores de banano, donde se busca desarrollar estrategias de control (Magdama et al., 2020).

Justificación del problema

Fusarium oxysporum es un hongo patógeno responsable del marchitamiento y muerte de plantas, principalmente del banano (Cheng et al., 2019), este hongo es el agente causal de la enfermedad de marchitamiento por *Fusarium* o también llamada enfermedad de Panamá (FWB, por sus siglas en inglés *Fusarium Wilt of Banana*), esta enfermedad es una de las más destructivas del banano y fue controlada mediante el cultivo de variedades de banano Cavendish resistentes a marchitamiento por *Fusarium*, pero en la actualidad la raza tropical 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FocTR4) está atacando a las variedades Cavendish (Dita et al., 2018). La propagación de la nueva raza es de gran preocupación ya que amenaza la economía de países donde sus ingresos dependen en mayor parte de la exportación de banano.

Se requiere de mayor investigación acerca del ciclo y la interacción entre la planta y FocTR4 ya que se requieren métodos más eficientes para detectar de forma temprana al patógeno y de igual forma contener su propagación (Pegg et al., 2019). Una posible solución a este problema es la producción de biopesticidas mediante biología sintética, en este caso se utilizará la tecnología de silenciamiento de genes basado en la interferencia de RNA (RNAi) para la producción de moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA), lo que permite silenciar la expresión de genes diana específicos del patógeno. Esto se logrará mediante el ensamblaje de un plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen *SIX* Gene Expression 1 (*SGE1*) en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1). En

Ecuador, no se ha identificado la presencia de Foc TR4, por tal motivo, en el estudio se utilizará Foc R1. De acuerdo a estudios previo, esto no sería un problema ya que existen genes putativos de virulencia presentes en las diferentes razas de Foc (Guo et al., 2014; Raman et al., 2021). El presente estudio tiene impacto no solo a nivel de país ni de Latinoamérica, si no a nivel mundial, en regiones donde se cultive banano como en países de África y del Sudeste Asiático.

Este estudio es la continuación del trabajo del grupo iGEM Ecuador 2021 y su proyecto AgroBactory 593 el cual busca utilizar un chasis bacteriano para la producción de biopesticidas para combatir la enfermedad de FWB mediante la tecnología de iRNA, para mayor información revisar su página Web <https://2021.igem.org/Team:Ecuador>.

Objetivos

Objetivo general

Ensamblar un plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen *SGE1* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1).

Objetivos específicos

- Obtener un biobrick del gen *SGE1* 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

- Existe diferencia estadística significativa en la eficiencia de transformación de *Escherichia coli* con el plásmido PSB1C3_A593 + *SGE1* cuando se varía la temperatura de choque térmico.

Capítulo II: Marco teórico

Cultivo de banano

El banano es una planta herbácea monocotiledónea ya que no tiene componentes leñosos, además de que sus partes aéreas mueren después de la recolección, es una planta perenne ya que los nuevos retoños emergen a partir de la planta madre con la finalidad de reemplazar las partes aéreas muertas (Robinson & Galán, 2010).

Enfermedades del banano

El banano es una planta que logra alcanzar altos rendimientos debido a su excelente adaptación, el problema está en las enfermedades que disminuyen su rendimiento o incluso matan a la planta, algunas de las enfermedades que afectan al banano son: la raya negra de la hoja causada por *Mycosphaerella fijiensis*, la enfermedad del marchitamiento de Panamá causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, la enfermedad del Moko causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, entre otras (Markham, 2009).

Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense

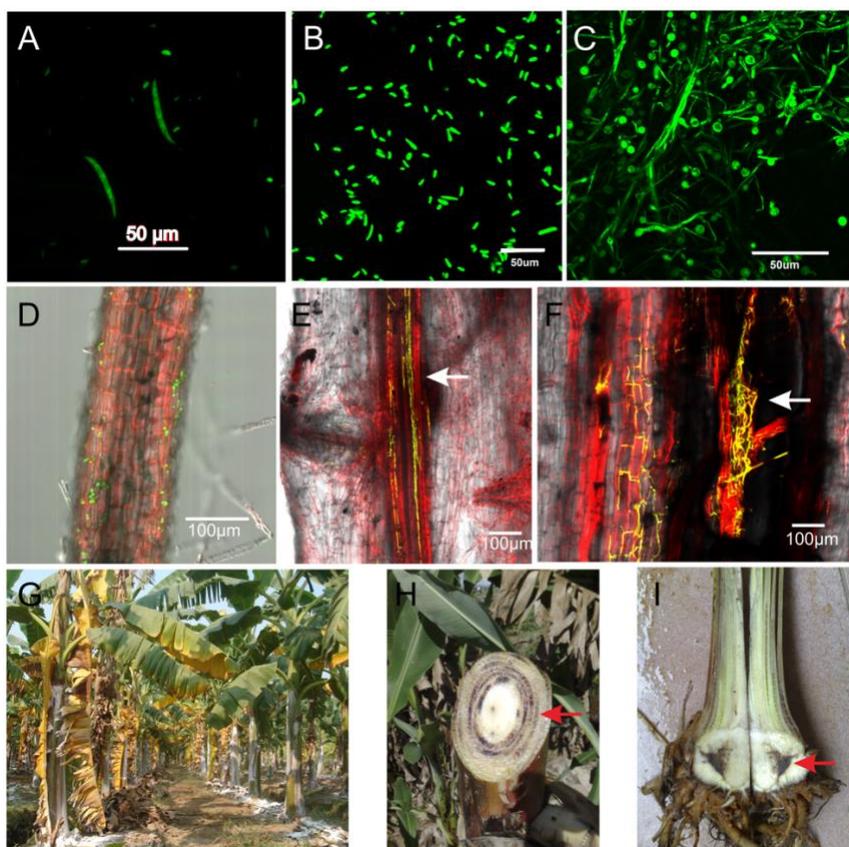
La enfermedad del marchitamiento por *Fusarium* o enfermedad de Panamá es una de las enfermedades más importantes que afectan al banano, siendo esta la responsable de la destrucción de los cultivos de banano Gros Michel en Centroamérica a mediados del siglo XX (Dita et al., 2018). El agente causal de la epidemia fue (Foc R1), debido a esto, se reemplazó casi por completo los cultivos de Gros Michel con variantes resistentes del subgrupo Cavendish, este último representa actualmente más del 40% de la producción de banano a nivel mundial (Dale et al., 2017).

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* es un hongo del suelo con reproducción estrictamente asexual, este patógeno tiene una larga persistencia en el suelo debido a los microconidios, macroconidios y clamidosporas que produce como estructuras de supervivencia (Pegg et al., 2019). Este patógeno produce una enfermedad típica del marchitamiento vascular,

infectando las raíces tanto de plantas de banano susceptibles como resistentes, con la diferencia de que la infección avanza hacia porciones vascularizadas del rizoma únicamente en genotipos susceptibles (Mace et al., 1981). Se considera a Foc un hemibiótrofo ya que inicialmente tiene una relación biotrófica con la planta, para luego convertirse en un necrótrofo destruyendo así el tejido del huésped hasta matarlo (Ploetz, 2015).

Figura 1

Ciclo de infección del patógeno del marchitamiento vascular del banano *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). A) macroconidios. B) microconidios. C) clamidospora con GFP. D) Fijación de hifas Foc en raíces de banano. E) Colonización de hifas Foc en haces vasculares de raíces de banano. F) Una sección longitudinal de raíces de banano. G) Plantas de banano enfermas. H-I) Haces vasculares del pseudotallo y el rizoma del banano enfermo de color marrón rojizo oscuro.



Nota. Tomado de Guo et al., (2014).

El patógeno ataca principalmente las raíces secundarias y terciarias de la planta, esto se debe a que las clamidosporas del hongo que se encuentran en el suelo perciben los exudados de las raíces del banano, infectando las puntas de las raíces, para esto traspasan la cofia de la raíz y su zona de elongación para luego llegar a los haces vasculares del xilema (Pegg et al., 2019), una vez infectadas las raíces, el movimiento de Foc es lento inicialmente, se estima que avanza 75 cm en 4 semanas, mientras que una vez en los vasos maduros del xilema, el patógeno puede avanzar 30 cm en dos días (Nelson et al., 1981).

La nueva variante Foc TR4 fue descubierta a finales del siglo XX, afectando al banano Cavendish tanto en climas tropicales como subtropicales (Mostert et al., 2017). La alerta aparece cuando las plantaciones de Cavendish de diferentes partes del mundo se vieron afectadas por este patógeno, esta enfermedad representa nuevamente una amenaza para la producción agrícola de banano en todo el mundo (Dale et al., 2017). Foc TR4 ha logrado esparcirse rápidamente debido a la propagación mediante plantas enfermas, contaminación por el material de siembra, suelo contaminado, vehículos, trabajadores, entre otros, lo que ha provocado la pérdida de miles de hectáreas de banano (Dita et al., 2018). La solución definitiva a este problema es el cultivo de un banano resistente al patógeno, actualmente no existe una especie con resistencia aceptable por lo que las medidas de exclusión y cuarentena favorecen al control de la enfermedad, mas no la erradica (Pegg et al., 2019). Se han encontrado fuentes de resistencia a Foc TR4 en especies silvestres de banano, pero no han podido ser insertadas en las especies comerciales debido al cultivo de banano poliploides (Pegg et al., 2019).

En un estudio acerca del análisis de genoma y transcriptoma de Foc R1 y Foc TR4 se identificaron genes putativos asociados a virulencia relacionados con la unión de raíces, degradación celular, biosíntesis de metabolitos, entre otros (Magdama et al., 2020). Foc en presencia de raíces de banano activa sus mecanismos de patogenicidad mediante la activación de la expresión genes de patogenicidad, esta fase de transición está controlada por reguladores transcripcionales maestros (Gurdaswani et al., 2020). El gen *SGE1* se encarga de

regular la expresión de los genes efectores *SIX* por sus siglas en inglés (secreted in xylem), siendo el gen *SGE1* esencial para la patogenicidad (Michielse et al., 2009). Por un lado, en estudios con mutantes de delección *SGE1* se observa la pérdida de expresión de genes efectores, por otro lado la delección de este gen no afecta a la colonización o penetración de la superficie de la raíz (Hou et al., 2018). Se ha demostrado que la proteína *SGE1* de *Foc TR4* se encarga de la regulación de una serie de genes necesarios para la infección, siendo necesario para el crecimiento parasitario lo que conduce a la enfermedad de FWB (Michielse et al., 2009).

Tecnología de RNA de interferencia

El silenciamiento de genes es un mecanismo de retroalimentación negativa la cual regula la expresión génica, esta regulación de la expresión ocurre de forma natural y en respuesta a un estímulo exterior (El-Sappah et al., 2021). El RNA de interferencia es un mecanismo de silenciamiento a nivel postranscripcional que se encarga de degradar o inactivar una secuencia específica de RNA, es un mecanismo de silenciamiento génico conservado evolutivamente (Fire et al., 1998). El RNA de interferencia abarca dos moléculas de RNA: small interfering RNA (siRNA) y micro interfering (miRNA), los siRNA se obtienen a partir de los precursores de dsRNA, estos precursores se unen en el citoplasma a una proteína endonucleasa llamada Dicer la cual corta el dsRNA en fragmentos cortos, estos RNA funcionales (siRNA) se incorporan en la proteína argonauta del complejo de silenciamiento inducido por RNA o por sus siglas en inglés (RISC), posterior a esto una helicasa dependiente de ATP separa la doble cadena, dejando una cadena unida a la proteína, la cual se encarga de dirigir a RISC al mRNA diana, este mecanismo actúa como una endonucleasa específica para el silenciamiento postranscripcional (Leung & Whittaker, 2005; Sanan-Mishra et al., 2021). El grado de complementariedad que existe entre la cadena guía y mRNA diana determina si el silenciamiento génico se logra por la escisión específica del sitio de mensaje o por un mecanismo de represión en la traducción.

Biología sintética

La biología sintética emplea las diferentes técnicas y conocimientos de biología molecular con la finalidad de modificar el comportamiento celular, la bacteria *Escherichia coli* ha sido uno de los microorganismos en el cual se ha enfocado la biología sintética para el diseño de circuitos, la ingeniería metabólica, entre otros (Cameron et al., 2014). Se ha demostrado que las células pueden ser programadas mediante circuitos genéticos sintéticos regulados los cuales permiten la manipulación de microorganismos con fines productivos (Nielsen et al., 2016).

En la última década, la biología sintética ha mostrado varios avances y logros, de los cuales los que destacan son: un mejor diseño *in silico* y un mejor entendimiento de las partes a utilizar (Meng & Ellis, 2020). Se requiere la construcción de circuitos génicos robustos y predecibles para alcanzar un equilibrio entre la función del circuito y la viabilidad celular, actualmente nuevas herramientas permiten regular la expresión génica de mejor manera y cada vez se amplían las bibliotecas de partes que pueden ser utilizadas (Kent & Dixon, 2020).

Ensamblaje de digestión y ligación

La mutagénesis dirigida al sitio es una herramienta empleada en biología molecular para la investigación de proteínas y mecanismos de control celular, los métodos empleados para esto se pueden resumir en dos pasos: la separación de cadenas e hibridación de un primer de mutagénesis (Costa et al., 1996). La mutagénesis dirigida al sitio obtenida mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas más utilizadas para generar genes mutantes *in vitro*, en la overhang PCR o PCR de extensión se añaden los sitios de corte para las enzimas de restricción a los extremos de los fragmentos de interés amplificados, los productos de PCR obtenidos son utilizados en la clonación del plásmido (Zhang et al., 2021).

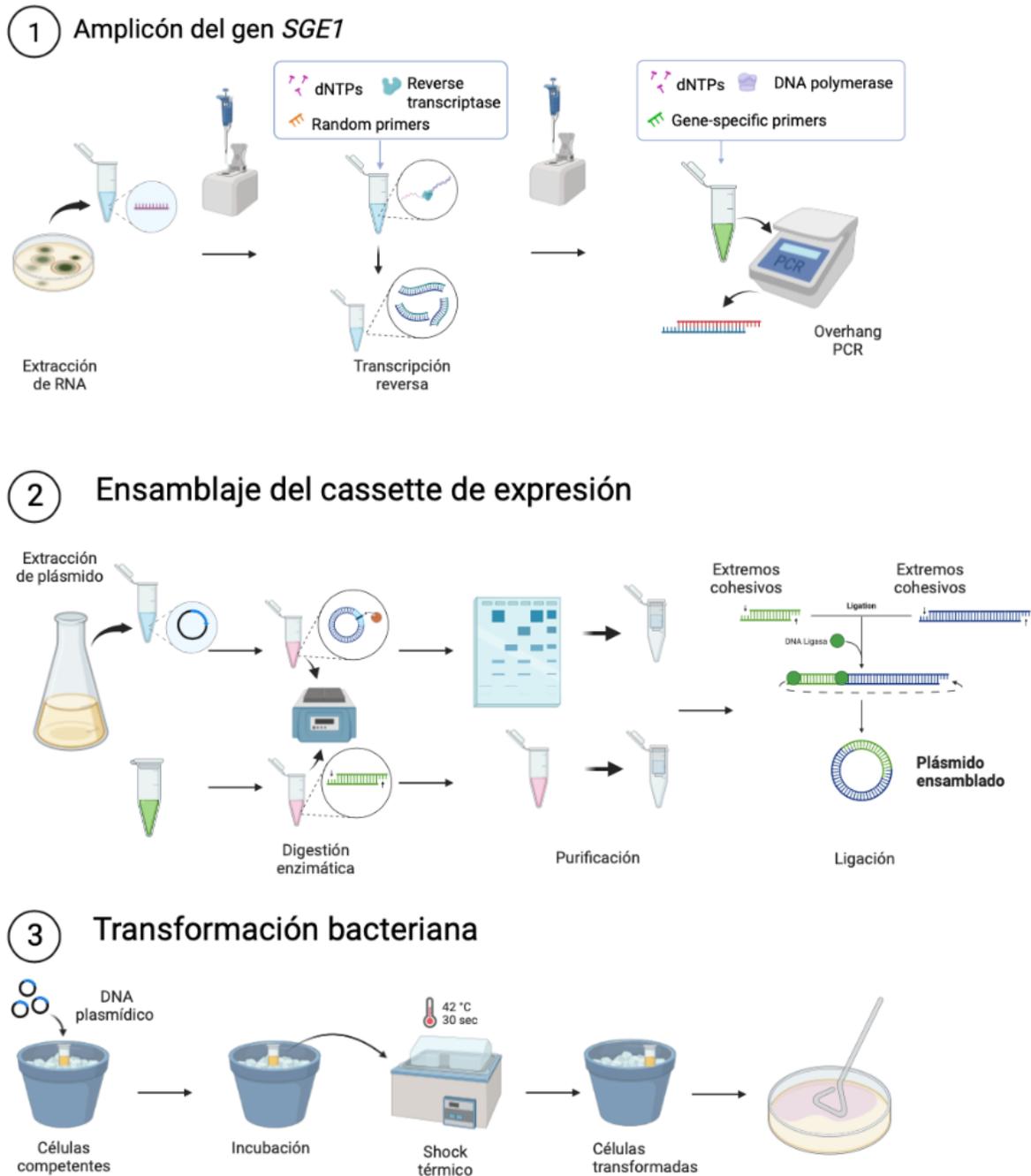
En el proceso de digestión, las enzimas de restricción o endonucleasas reconocen una secuencia específica de DNA, la cual cortan generando extremos cohesivos o romos, su descubrimiento ha permitido la manipulación de secuencias específicas de DNA (Herrero, 2016).

El ensamblaje de fragmentos de DNA es una parte fundamental para la biología sintética, ya que las diferentes partes descritas pueden ser ensambladas para cumplir un objetivo específico como la expresión de genes, crear rutas metabólicas, entre otros (Ellis et al., 2011). El ensamblaje de digestión y ligación permite unir cadenas de DNA con secuencias flanqueantes, esto permite obtener un resultado económico, simple y estandarizado (Smolke, 2009).

Capítulo III: Metodología

Figura 2

Flujo de trabajo



Nota. Creado en Biorender.com

Esta investigación fue realizada en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE y en el laboratorio de diagnóstico molecular IDgen. El microorganismo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1 utilizado en el estudio fue entregado por el laboratorio de diagnóstico molecular IDgen, el cual lo obtuvo de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

Extracción de RNA Total de Foc (R1)

La extracción de RNA total se realizó a partir de tejido fúngico, para este proceso se utilizó el kit E.Z.N.A.® Fungal RNA siguiendo el protocolo estándar (Omega Bio-tek, 2018). Se utilizó un cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* R1 sembrado en medio PDA durante 10 días. Previo a la extracción se realizó una limpieza exhaustiva de la cámara de flujo laminar donde se colocó una solución de SDS 0,5% y agua oxigenada 0,3% para eliminar cualquier posible contaminación con RNAsa.

El RNA extraído se almacenó en el ultra congelador a -80°C para su posterior uso.

Evaluación de la calidad del RNA y cDNA

La cuantificación tanto de RNA como de cDNA y la evaluación de su pureza se realizó mediante espectrofotometría, para esto se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 de la marca (Thermo Scientific), la medición se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó como blanco el agua libre de nucleasas de cada kit. Se obtuvo la concentración de RNA y cDNA en las unidades (ng/μL) y la calidad mediante las relaciones de absorbancia.

Transcripción reversa

Para la obtención de cDNA se utilizó el kit GoScript™ Reverse Transcription System, se utilizó Random primers para la retrotranscripción, para la preparación del master mix de la reacción se utilizó: 4μL de GoScript 5x Reaction buffer, 1μL de PCR Nucleotide Mix, 1μL de Random primers, 2μL de RNA experimental, 1μL de GoScript™ Reverse Transcriptase y 11μL de agua libre de nucleasas, se obtuvo un volumen total de 20μL. Para la etapa de annealing se

colocó el tubo con la mezcla en un bloque de calor durante 5 minutos a 25°C, en la etapa de extensión se colocó en un bloque de calor a 42°C durante una hora.

Amplificación por PCR

Se obtuvo los amplicones de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se utilizó dos pares de primers, estos se indican en la Tabla 1, el primer par de primers utilizados contienen dos partes, la primera es una sección complementaria al DNA y la segunda parte contiene los sitios de restricción para el ensamblaje. Esta segunda parte de los primers se observa en la Tabla 1 de color rojo, esta secuencia sobresaliente o adicional permite agregar dichos nucleótidos al producto de PCR, esto permitió agregar los sitios de restricción para cortar el DNA.

Tabla 1

Primers utilizados para las diferentes amplificaciones por PCR

Primer	Secuencia
dsRNA_SGE1_F_2	AAAAGATCTCCCTTTCCAAACAGGCC
dsRNA_SGE1_R_2	AAAGGTACCCCGTGTTGAGCTTCCTC
BBa_G00100	TGCCACCTGACGTCTAAGAA
BBa_G00101	ATTACCGCCTTTGAGTGAGC

Nota: Las secuencia en rojo contienen los sitios de restricción.

Overhang PCR

Los componentes de la PCR se indican en la Tabla 2, la concentración de cDNA utilizado fue de 175 a 200 ng/ μ L, el cDNA fue diluido para alcanzar la concentración deseada, cada reacción se ajustó a un volumen de 25 μ L en tubos de PCR de 0,2 mL.

Tabla 2*Reactivos de la Overhang PCR*

Reactivo	Volumen μL (1x)
GoTaq® Hot Start Green Master Mix, 2X	12.5
Agua libre de nucleasas	9.5
dsRNA_SGE1_F_2	1
dsRNA_SGE1_R_2	1
cDNA	1
Total	25

PCR de colonias

Para las diferentes PCR primero se realizó un master mix, los componentes de la PCR se indican en la Tabla 3, cada reacción se ajustó a un volumen de 12,5 μ L en tubos de PCR de 0,2 mL. Células de una colonia bacteriana fueron añadidas a la mezcla con una punta de micropipeta y posteriormente se colocó el tubo en la centrifuga durante 10 segundos.

Tabla 3*Reactivos de la PCR de colonia*

Reactivo	Volumen μL (1x)
GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix	6.25
Agua libre de nucleasas	5.25
BBa_G00100	0.5
BBa_G00101	0.5
Colonia	-
Total	12.5

Extracción de plásmido

La extracción de plásmido se realizó de dos maneras, en la primera se preparó tres soluciones: solución I o de suspensión, la cual contiene glucosa 50 mM, Tris-HCl (pH 8.0) 25 mM y EDTA (pH 8.0) 10 mM, solución II o de lisis, que contiene NaOH 0.2 N y SDS 1% (p/v) y la solución III o de neutralización, preparada con 6 mL de acetato de potasio 5 M, 1,15 mL de ácido acético glacial y 2,85 mL de agua. Se añadió 1,5 mL de cultivo bacteriano en un tubo de 1,5 mL, se centrifugó a 200 RFC durante 1 min y después se desechó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 250 μ L de solución I fría con ayuda del vortex, se dejó incubar durante dos minutos a temperatura ambiente, luego se colocó 250 μ L de solución II, se homogenizó por inversión cinco veces y se dejó incubar a -20°C durante 3 minutos, posterior a esto se colocó 300 μ L de la solución III, a continuación se homogenizó por inversión siete veces y se incubó a -20°C durante 10 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 9460 RFC durante 15 minutos, una vez finalizado, el sobrenadante fue transferido a nuevos tubos, se continuó con el lavado con 800 μ L de alcohol absoluto, se homogenizó por inversión y se incubó a -20°C durante 20 minutos, se procedió a centrifugar y descartar el sobrenadante, luego se realizó otro lavado con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 9460 RFC durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar en cámara. Finalmente el plásmido fue resuspendido en 20 μ L de agua libre de nucleasas y se agregó 1 μ L de RNAsa para degradar contaminación por RNA.

El otro método para la extracción de plásmidos se realizó utilizando el kit Invitrogen™ PureLink™ Quick Plasmid Miniprep, se siguió el protocolo indicado en el kit (Thermo Fisher Scientific, n.d.).

Ensamblaje de restricción y ligación

Digestión de plásmido y producto de PCR mediante enzimas de restricción

Para la digestión del plásmido y de los productos de PCR se utilizó las enzimas de restricción comerciales FastDigest KpnI y FastDigest BglII de la marca ThermoFisher Scientific. En la Tabla 4, se indica los componentes de la digestión que se utilizaron en ambos casos.

Tabla 4

Reactivos de la digestión enzimática

Reactivo	Volumen μL	
	Plásmido	Producto de PCR
10x FastDigest™ Green Buffer	2	2
Agua libre de nucleasas	11	21
DNA	5	5
FastDigest KpnI	1	1
FastDigest BglII	1	1
Total	20	30

La digestión enzimática del plásmido y del producto de PCR se realizaron por separado en tubos de 0,2 mL, ambos tubos fueron colocados en un bloque térmico durante 4 horas a una temperatura de 37 °C, después de este tiempo, se observaron los fragmentos digeridos del plásmido mediante electroforesis en gel y el fragmento del producto de PCR se purificó directamente. Estos fragmentos digeridos fueron purificados utilizando el kit Wizard® SV Gen and PCR Clean-Up System, se siguió las instrucciones del fabricante (Promega, n.d.).

Reacción de ligación

Previo a la ligación, fue necesario medir la concentración de los fragmentos purificados, esto se realizó mediante espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific). Para calcular la cantidad de vector e inserto necesario en la ligación se utilizó el software NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>), aquí se ingresó la masa del vector previamente calculada a partir de su concentración, el tamaño del inserto y del vector digeridos, con esto se obtuvo la masa de inserto requerido en relación 1:25 (vector: inserto), con dicha masa y la concentración del inserto se calculó el volumen requerido. Para la ligación se utilizó la ligasa comercial T4 DNA Ligasa de la marca Thermo Fisher Scientific, este proceso se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante para la ligación de extremos cohesivos. En un tubo de PCR de 0,2 mL se colocó 4 uL de 5x Ligase Reaction, 1 uL del vector, 1 – 10 uL del inserto, el volumen del inserto a colocar depende de la concentración del mismo, 1 uL de T4 DNA Ligasa y se aforó con agua libre de nucleasas hasta un volumen de 20 uL. El tubo con la reacción de ligación se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Preparación de células competentes

Para las células competentes se utilizó un cultivo bacteriano con un OD₆₀₀ de 0,3 en las cepas de *Escherichia coli* TOP10 y HT115, se colocó tanto el cultivo como los tubos de 1,5 mL a una temperatura de 4°C durante 10 minutos ya que esto favorece a la eficiencia de transformación.

Primero se transfirió 1,5 mL de cultivo bacteriano a los tubos y se centrifugó a 13000 g por 30 segundos, se removió el sobrenadante, mientras que el pellet se resuspendió en 1 mL de solución CCMB80, después se incubó durante 10 minutos a una temperatura de -20°C, posterior a esto se volvió a centrifugar durante 30 segundos a 13000 g, nuevamente se removió el sobrenadante y el pellet se volvió a resuspender pero ahora en 200 uL de solución CCMB80, las células se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

Transformación bacteriana mediante shock térmico

Para la transformación se utilizó tubos de 1,5 mL previamente enfriados, se colocó 50 uL de células competentes en cada tubo, luego se añadió 2 uL de DNA plasmídico, se dejó incubar durante 30 minutos a una temperatura de -20°C , posterior a esto se realizó el choque térmico, para esto los tubos fueron colocados en baño maría durante 30 segundos a 42°C . Posterior a esto se incubaron los tubos durante 5 minutos a -20°C , después se añadió 950 μL de medio SOC, se incubó durante 90 minutos a una temperatura de 37°C y 300 rpm, se centrifugó los tubos a 6800 g por 3 minutos, se descartó 900 μL del sobrenadante y se resuspendió el pellet en los 100 μL restantes. Se sembró los 100 μL de suspensión celular en una caja Petri con medio LB agar + cloranfenicol, el antibiótico se utilizó a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finalmente las cajas fueron incubadas durante 48 horas a 37°C .

La transformación bacteriana se realizó en las cepas de *Escherichia coli* TOP10 y HT115, para la transformación en las cepas TOP10 se utilizó el producto obtenido en la ligación, mientras que para la transformación en HT115, se utilizó el plásmido extraído de *E. coli* Top 10.

Diseño experimental

Para la parte estadística se evaluó la eficiencia de transformación de *Escherichia coli* TOP10 y el plásmido ensamblado pSB1C3_A593 + *SGE1* mediante un análisis de varianza (ANOVA), esto se realizó con el fin de determinar si existe diferencia significativa en la transformación cuando se varía la temperatura de choque térmico.

Se elaboró un diseño experimental al azar y los tratamientos realizados fueron ($T_1=40^{\circ}\text{C}$, $T_2=42^{\circ}\text{C}$ y $T_3=44^{\circ}\text{C}$) por un tiempo de 30 segundos. Para el cálculo de la eficiencia de transformación se utilizó las ecuaciones mostradas a continuación.

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\# \text{ UFC}}{\text{DNA sembrado } (\mu\text{g})}$$

$$\text{DNA sembrado } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Volumen sembrado } (\mu\text{L}) \times \text{DNA plasmídico } (\mu\text{g})}{\text{Volumen de transformación } (\mu\text{L})}$$

Capítulo IV: Resultados

Extracción de RNA Total de Foc (R1)

El microorganismo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 utilizado en el estudio se indica en la (Figura 3). A partir de este se realizó la extracción de RNA Total. Se obtuvo una concentración de 8,3 ng/ μ L de RNA Total.

Figura 3

Fusarium oxysporum f. sp. *ubense* raza 1 en medio PDA.



Transcripción reversa

El cDNA obtenido como resultado de la transcripción reversa a partir del RNA Total presentó una concentración de 873.3 ng/ μ L, y relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 de 1.82 y 1.96 respectivamente, las cuales se encuentran dentro de los rangos aceptables de

pureza. El cDNA obtenido se diluyó en un rango de 150 a 250 ng/ μ L para su posterior uso y se almacenó a -20°C .

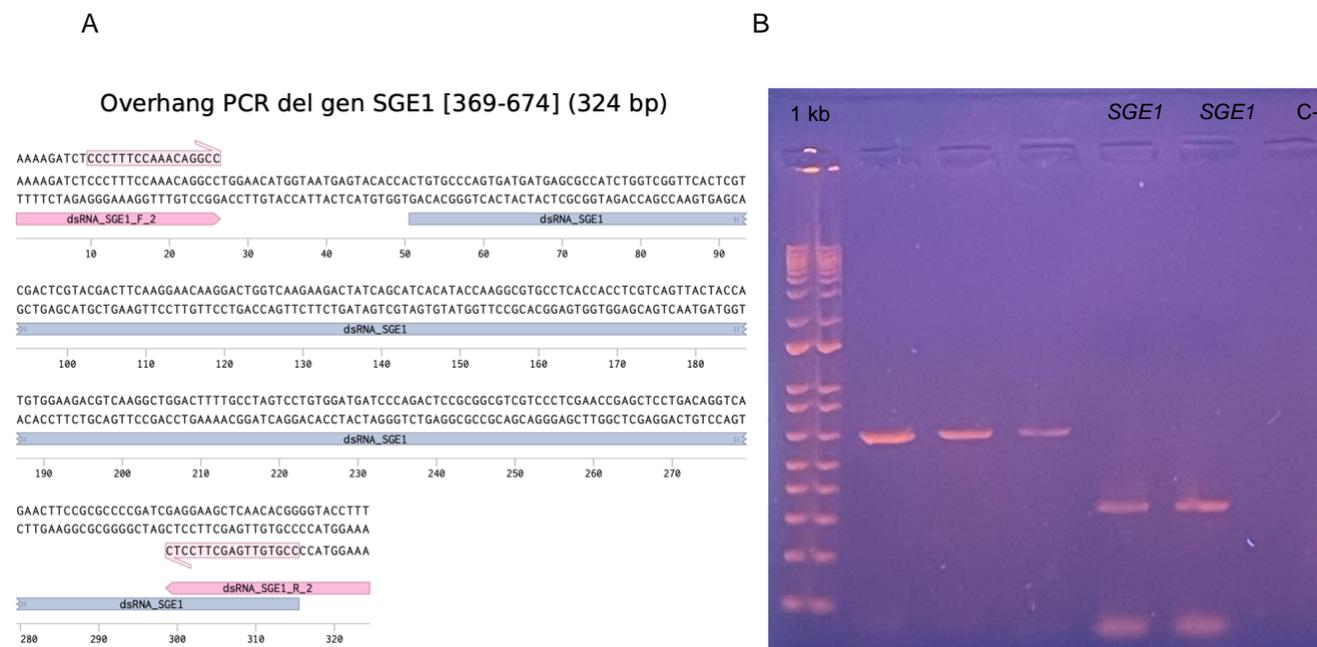
Amplificación por PCR

Overhang PCR

Se obtuvieron amplicones de más de 300 pb al comparar con las bandas del marcador 1 Kb Plus DNA de la marca ThermoFisher Scientific. El resultado obtenido coincide con el diseño *in silico* (Figura 4).

Figura 4

Producto de overhang PCR. A) Resultado *in silico* del amplicón realizado en Benchling. B) Electroforesis del amplicón.



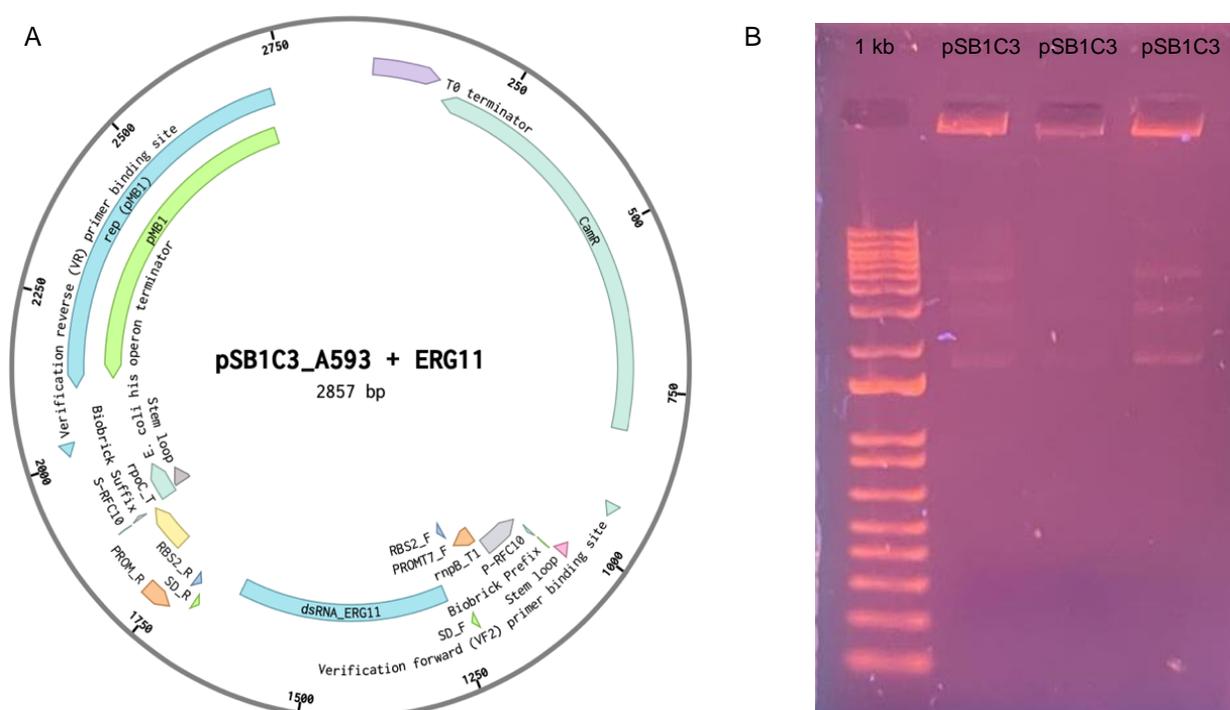
Nota. Primers utilizados: dsRNA_SGE1_F_2 y dsRNA_SGE1_R_2. (Tabla 1)

Extracción de plásmido

Como resultado de la extracción de DNA plasmídico, se observan 3 bandas en el gel de electroforesis, una de estas corresponde al tamaño de 2857 pb, previamente establecido en el diseño *in silico* del plásmido pSB1C3_A593 + ERG11 (Figura 5).

Figura 5

Tamaño del plásmido extraído. A) Mapa de plásmido usando Benchling. B) Electroforesis del DNA plasmídico.



Ensamblaje de restricción y ligación

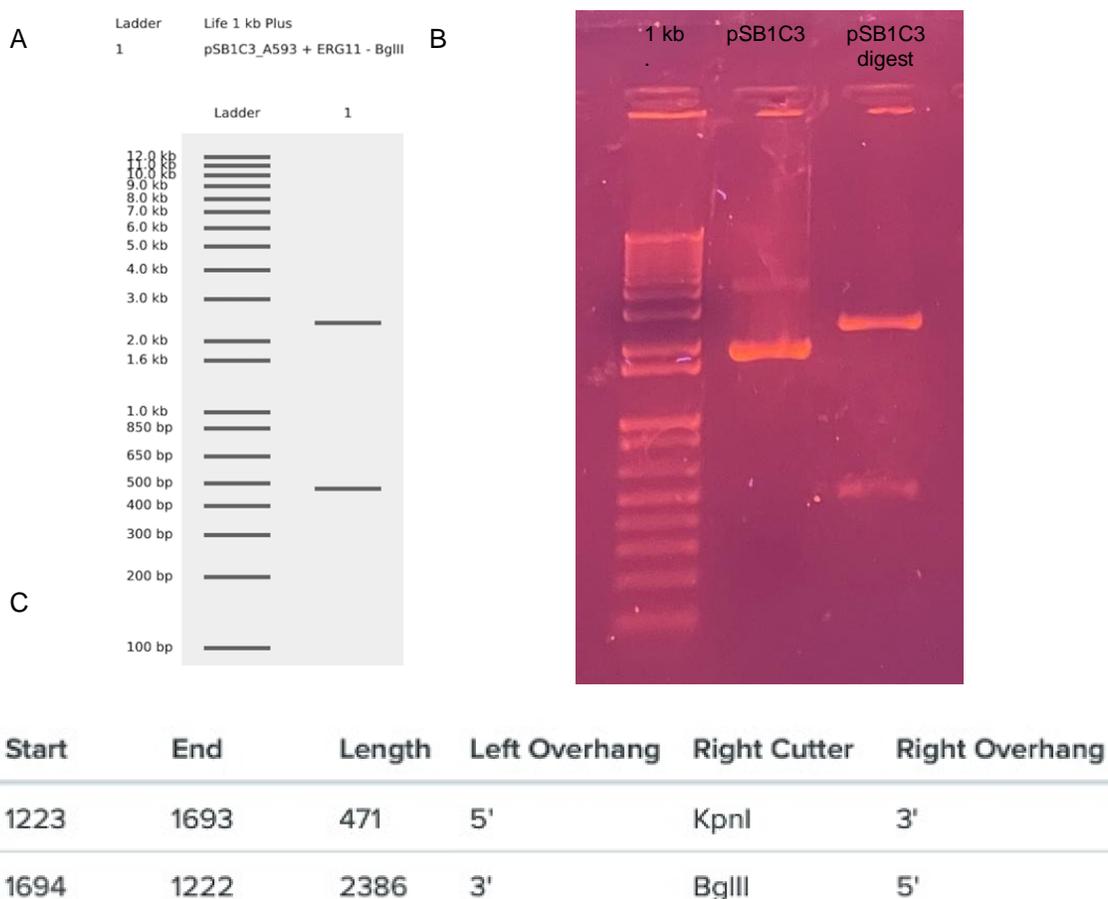
Digestión y purificación del plásmido

La digestión *in silico* muestra el tamaño de las 2 bandas obtenidas en la digestión del plásmido, la banda superior representa un fragmento de longitud de 2386 pb, mientras que la banda inferior tiene una longitud de 471 pb (Figura 6A y 6C). En el gel de agarosa se observa las bandas del plásmido sin digerir y al lado las dos bandas del plásmido digerido (Figura

6B). Una vez identificada la banda de interés para el ensamblaje, se procedió a la purificación a partir de gel. Después de la purificación se obtuvo una concentración de 24,59 ng/uL de plásmido digerido.

Figura 6

Digestión del plásmido con las enzimas de restricción KpnI y BglII. A) Electroforesis virtual B) Electroforesis en gel de agarosa 1% C) Tamaño de las bandas obtenidas en Benchling en la digestión



Digestión y purificación del producto de PCR

La digestión del producto de PCR se realiza a los extremos del fragmento por lo que no se puede visualizar el resultado mediante una electroforesis ya que no existe una diferencia

relevante en cuando a la longitud del fragmento antes y después de la digestión. Para el ensamblaje se le asignó al inserto el nombre de *SGE1*

Después de la purificación se obtuvo una concentración de 25,41 ng/uL.

Reacción de ligación

Con las concentraciones obtenidas del vector e inserto, se calculó el volumen de ambos para realizar la reacción de ligación. Volumen requerido del vector e inserto son 1 uL y 3,20 uL respectivamente.

1. Cálculo de la masa del vector, si utilizo 1uL del mismo

$$m = 24,59 \frac{ng}{\mu L} \times 1 \mu L$$

$$m = 24,59 \text{ ng}$$

2. Ingresar los datos en la calculadora NEBioCalculator

Figura 7

Cálculo de la masa requerida del inserto en proporción (7:1)

Insert DNA length	Required insert DNA mass
316 bp	3.257 ng (1:1)
Vector DNA length	6.513 ng (2:1)
2386 bp	9.770 ng (3:1)
Vector DNA mass	16.28 ng (5:1)
24.59 ng	22.80 ng (7:1)

3. Cálculo de la masa del inserto en relación (25:1)

$$m = \frac{25 \times 22,80 \text{ ng}}{7}$$

$$m = 81,43 \text{ ng}$$

4. Cálculo del volumen del inserto

$$v = \frac{81,43 \text{ ng}}{25,41 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}}$$

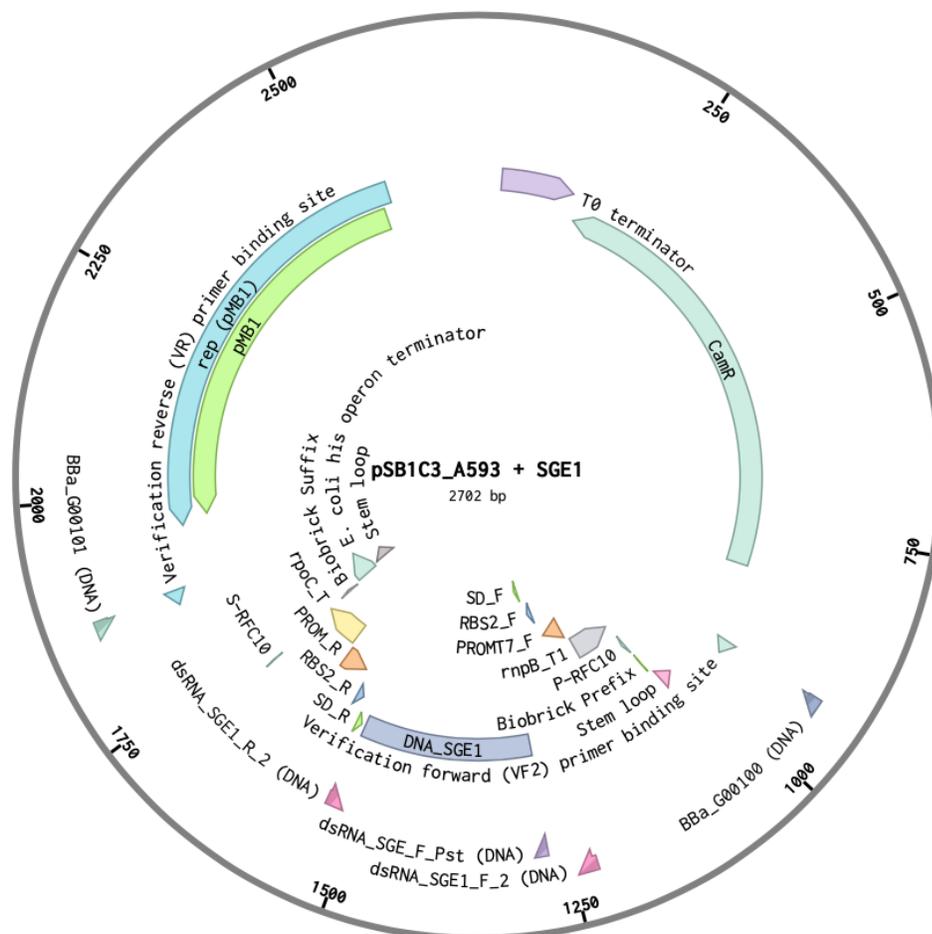
$$v = 3,20 \mu\text{L}$$

Tabla 5*Reactivos de la ligación o ensamblaje*

Reactivo	Volumen μL
10X T4 DNA Ligase Buffer	4
Agua libre de nucleasas	10,8
T4 DNA Ligase 0,1 U/uL	1
SGE1	3,2
pSB1C3_A593	1
Total	20

Figura 8

Ensamblaje del plásmido *in silico*.



Transformación bacteriana mediante shock térmico en *E. coli* Top 10

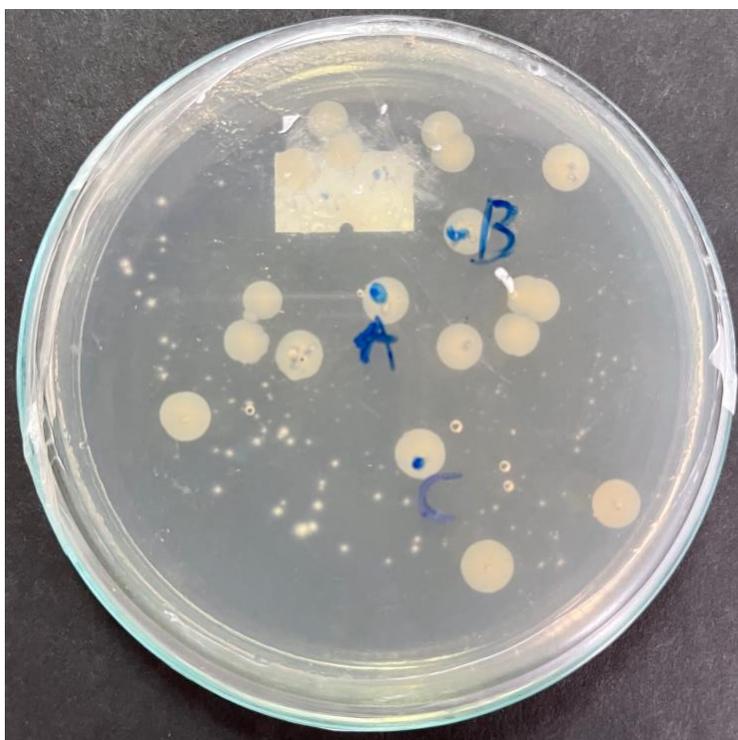
Se utilizó un tubo de 1,5mL con 200 μ L de células competentes, para cada reacción de transformación se utilizó 50 μ L, por lo que se realizó 3 transformaciones y un control negativo. Las células transformadas con el cassette de expresión conformado por el plásmido pSB1C3_A593 y SGE1, se sembraron en medio LB agar + cloranfenicol (25 μ g/mL) (Figura 8), el antibiótico es utilizado para la selección de transformantes.

Todo el proceso de digestión, ligación y transformación se realizó en total 3 veces, las dos primeras hubo crecimiento de colonias pero no se logró extraer el plásmido. Los resultados

mostrados a continuación corresponden al tercer intento de transformación, al momento de sembrar la solución celular se nombraron a las cajas Petri como C-, T3.1, T3.2 y T3.3, el primer número corresponde al número de transformación y el segundo al número de la caja Petri. Para identificar las diferentes colonias se le asignó una letra después del código por ejemplo T1 A.

Figura 9

Cultivo puro de E. coli Top 10 transformado con el plásmido pSB1C3_A593 + SGE1 con resistencia a cloranfenicol.



Nota. Se realizó la PCR de colonia de las siguientes muestras: T3.1A, T3.1B y T3.1C.

PCR de colonia

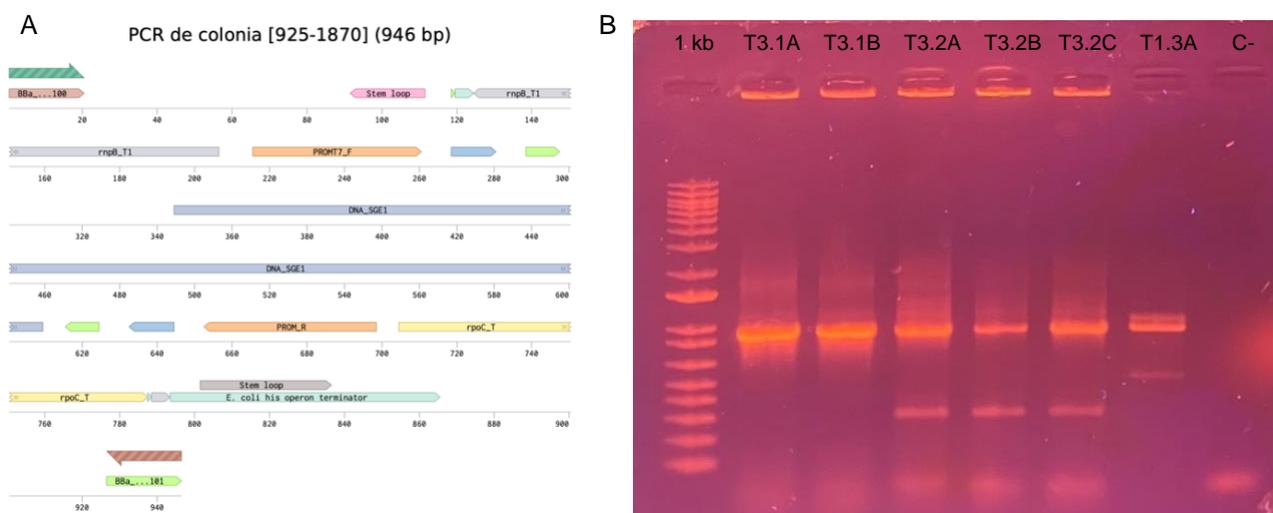
La PCR de colonia se realizó para evidenciar el ensamblaje del cassette de expresión, esto se verificó al comparar la longitud del producto de PCR con el diseño *in silico* correspondiente al plásmido pSB1C3_A593 + SGE1. Al realizar la PCR con los primers BBa_G00100 y BBa_G00101 (Tabla 3) se observa una banda con una longitud de

aproximadamente 1000 pb (Figura 9B), esto concuerda con el tamaño obtenido *in silico* del amplicón (Figura 9A).

Los diferentes productos de PCR de las diferentes colonias concuerdan con los resultados obtenidos *in silico*. Las colonias T3.1A y T3.1B muestran mejores resultados por lo que se subcultivaron en caldo LB + cloranfenicol (25 µg/mL) durante 24 horas a 37°C para una posterior extracción de DNA plasmídico.

Figura 10

Amplicón obtenido a partir de la PCR de colonia A) Resultado *in silico* del amplicón realizado en Benchling. B) Electroforesis



Extracción de plásmido

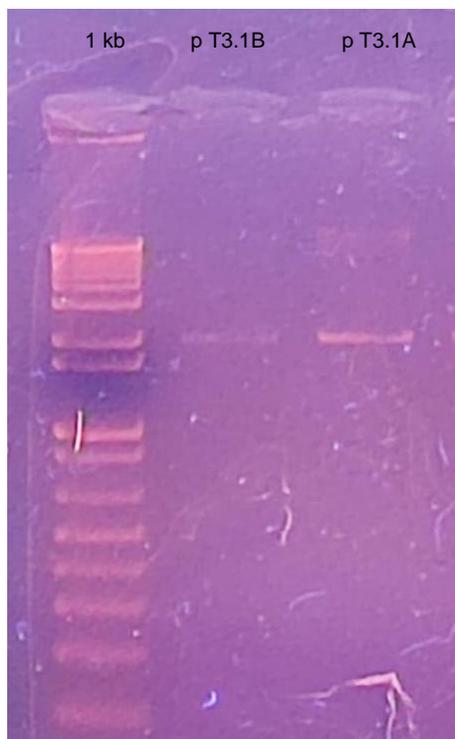
Comprobada la transformación del plásmido ensamblado en la colonias, se extrajo el plásmido de un subcultivo de estas en medio líquido incubadas durante 24 horas a 37°C. Se comprueba la extracción del plásmido mediante una electroforesis.

A plásmido extraído de cada colonia subcultivada se le asigna el nombre de pSB1C3_A593+SGE1 T3.1A y pSB1C3_A593+SGE1 T3.1B, también se midió la concentración de cada extracción obteniendo un resultado de 12,14 ng/µL y 7,653 ng/µL respectivamente.

El cassette de expresión ensamblado tiene una longitud de 2702 pb (Figura 6). Al realizar la extracción de DNA plasmídico se lo compara con las bandas del marcador de peso molecular obteniendo en la electroforesis como resultado un fragmento de más de 2000 pb.

Figura 11

Electroforesis del plásmido extraído



Transformación bacteriana mediante shock térmico en *E. coli* HT115

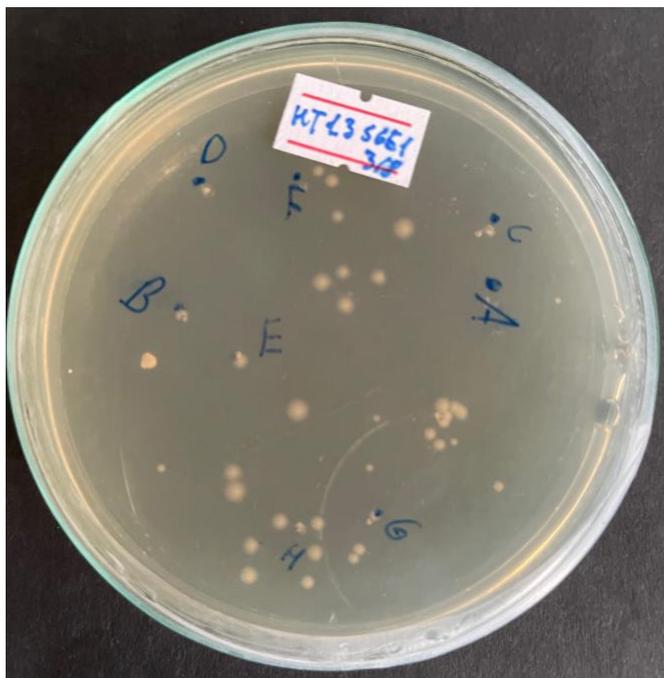
Para la transformación se asignó el nombre a las colonias como HT1.1A, la letra H se refiere a la transformación en la cepa *E. coli* HT115, el primer número es el intento de transformación, el segundo número corresponde a la caja Petri y la letra hace referencia a la colonia seleccionada.

Se realizó dos intento de transformación en *E. coli* HT115, en el primer intento hubo crecimiento de colonias, a las cuales se realizó una PCR para comprobar la transformación (Figura 11). Ninguna de las colonias seleccionadas contenían el plásmido ya que no se observó

ninguna banda al momento de la electroforesis. En el segundo intento de transformación no hubo crecimiento bacteriano.

Figura 12

Cultivo puro de E. coli HT115 transformado con el plásmido ensamblado



Nota. Transformación HT1.3, se observan las colonias seleccionadas para la PCR.

Diseño experimental

Se realizaron 3 tratamientos de transformación bacteriana a diferentes temperaturas de choque térmico ($T_1=40^{\circ}\text{C}$, $T_2=42^{\circ}\text{C}$ y $T_3=44^{\circ}\text{C}$) por un tiempo de 30 segundos. La transformación se realizó en *E. coli* Top10, para cada tratamiento se realizó 6 repeticiones en total ($n=6$) y su respectivo control negativo. Los resultados del diseño experimental se observan en (Apéndice 1, Apéndice 2 y Apéndice 3) respectivamente.

Análisis estadístico

Para el crecimiento de los transformantes fue necesario incubar las cajas Petri a 37°C durante 48 horas. Los resultados se observan en la Tabla 6 y Tabla 7.

El tratamiento 1) $T_1=40^{\circ}\text{C}$ muestra un promedio de 22,17 UFC y una eficiencia de transformación de $9,13 \times 10^{-3}$ UFC/ μg , el tratamiento 2) $T_2=42^{\circ}\text{C}$, tiene un promedio de 69 UFC con una eficiencia de transformación de $2,84 \times 10^{-4}$ UFC/ μg , el tratamiento 3) $T_3=44^{\circ}\text{C}$ tiene un promedio de 19,5 UFC con una eficiencia de $8,03 \times 10^{-3}$ UFC/ μg . Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA de la eficiencia de transformación bacteriana promedio (Tabla 8), se observa que existe diferencia estadística significativa ($p\text{-valor} = 0,0074$) en los tratamientos de variación de temperatura durante el choque térmico.

Tabla 6

Resultados del conteo de colonias posterior a la transformación

Tratamientos (temperatura de choque térmico)			
nº	$T_1=40^{\circ}\text{C}$	$T_2=42^{\circ}\text{C}$	$T_3=44^{\circ}\text{C}$
	UFC	UFC	UFC
1	40	32	1
2	18	69	2
3	5	61	1
4	15	84	1
5	11	66	24
6	44	102	88
C-	0	0	0

Tabla 7*Eficiencia de transformación bacteriana*

	n°	Tratamientos		
		T ₁ =40°C	T ₂ =42°C	T ₃ =44°C
		UFC/μg	UFC/μg	UFC/μg
	C -	0	0	0
Eficiencia de transformación	1	1,65E+04	1,32E+04	4,12E+02
	2	7,41E+03	2,84E+04	8,24E+02
	3	2,06E+03	2,51E+04	4,12E+02
	4	6,18E+03	3,46E+04	4,12E+02
	5	4,53E+03	2,72E+04	9,88E+03
	6	1,81E+04	4,20E+04	3,62E+04

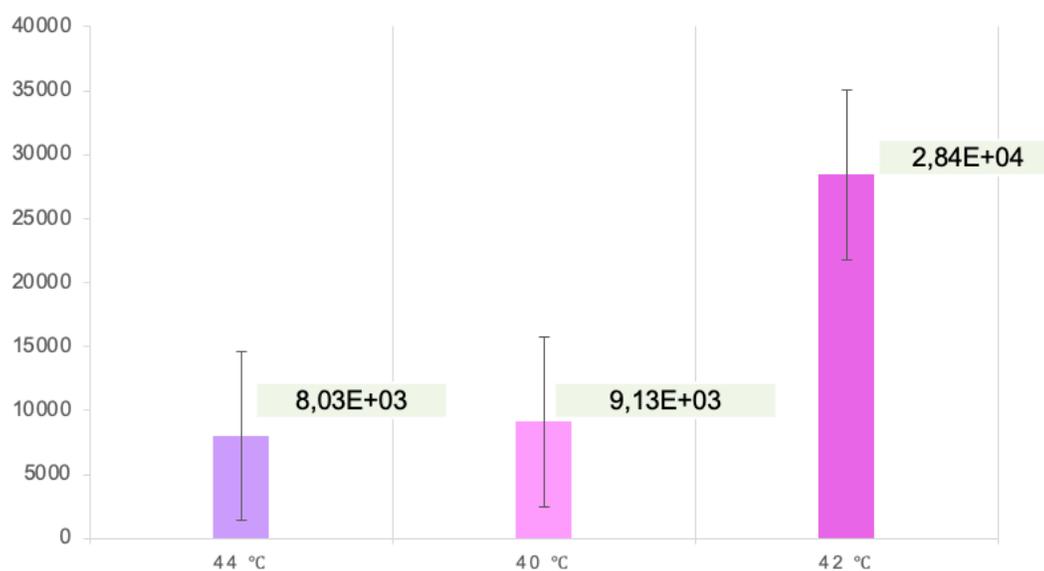
Tabla 8*ANOVA para la eficiencia de transformación*

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F	F (0,95)	p-valor
Tratamiento	2	1,58E+09	7,89E+08	6,92	3,68	0,0074
Error	15	1,71E+09	1,14E+08			
Total	17	3,29E+09				

Mediante al test de Duncan se obtuvo como resultado que el tratamiento de choque térmico a una temperatura de 42°C es significativamente diferente a los otros tratamientos, con una mejor eficiencia de transformación de $2,84 \times 10^4$ UFC/ μ g (Figura 13).

Figura 13

Temperatura de choque térmico vs Eficiencia de transformación



Capítulo V: Discusión

La tecnología del DNA recombinante se utiliza sobre todo en el área industrial para aplicaciones prácticas, por ejemplo el ensamblaje del plásmido para la producción de iRNA (Figura 8). La tecnología del iRNA ha demostrado tener un potencial sobre todo para el control de plagas y enfermedades, pero el principal problema de esta técnica es la producción de cantidades suficientes de dsRNA de manera rentable (Verdonckt & Vanden, 2022).

En la (Figura 4) se observa el amplicón de *SGE1*, inicialmente la amplificación de este fragmento presentó problemas de generación de primer dímeros. En una investigación realizada por Zhang y colaboradores (2021) mencionan que uno de los motivos del fracaso de la mutagénesis dirigida al sitio se debió a los primers de la overhang PCR o de extensión, para solucionar esto recomiendan utilizar primers parcialmente complementarios con una longitud de 33 a 35 pb, donde la región de superposición debe ser de 15 a 20 pb y la región complementaria de 18 a 20 pb, estas recomendaciones ayudan a la eficiencia de la reacción de PCR ya que evitan la formación de primers dímeros.

Durante la extracción de DNA plasmídico, se observa en la electroforesis 3 bandas (Figura 5) donde solo una corresponde al tamaño *in silico*; los plásmidos pueden tener varias conformaciones, la primera es su forma cerrada de doble cadena y las otras dos tiene conformación plasmídica circular abierta o lineal, cada conformación del plásmido migra a diferente velocidad en un gel de agarosa pese a que tienen la misma longitud (Coque et al., 2005).

Para la transformación de *E. coli* Top10 se hicieron 3 repeticiones del proceso de digestión, ligación y transformación, durante el proceso de digestión se dejó incubar durante 1 hora, esto es más tiempo de lo que recomienda el fabricante, pero de acuerdo a los resultados (Figura 6), el tamaño de las dos bandas del plásmido digestado concuerda con lo obtenido *in silico*. Herrero (2016), menciona que las enzimas de restricción cortan en secuencias

específicas y mientras el sitio de restricción tenga mayor número de pares de bases la frecuencia de corte disminuirá, además es necesario inactivar las enzimas de restricción para evitar que sigan cortando después de la ligación.

De acuerdo a Matsumura (2015) la técnica de clonación no funciona en ocasiones y pese a que se repita se obtendrá el mismo resultado, al autor menciona que mejor forma de incrementar la productividad de la clonación es utilizando técnicas de fácil entendimiento, monitoreo y solución de problemas con la finalidad de disminuir las repeticiones, además sugiere que tanto el plásmido como el producto de PCR sean visualizados después de cada etapa. Esto permitirá comprobar que ambos fragmentos culminaron cada una de las etapas de digestión enzimática, purificación y ligación.

Capítulo VI: Conclusiones

Mediante la técnica de mutagénesis dirigida al sitio mediada por overhang PCR se pudo obtener un amplicón del gen *SGE1*, este contiene en los extremos los sitios de corte de las enzimas de restricción necesarios para el ensamblaje de restricción y ligación.

El ensamblaje del plásmido pSB1C3_A593 + *SGE1* para la producción de dsRNA requirió un tiempo de incubación más prolongado que el recomendado por los fabricantes en las etapas de digestión y ligación, además, el tamaño del plásmido ensamblado coincide con el modelo *in silico*.

Se transformó *E. coli* HT115 con el plásmido PSB1C3_A593 + *SGE1* obteniendo una eficiencia de transformación de $2,84E+04$ UFC/ μ g.

En el diseño experimental se demostró mediante un análisis de varianza que existe diferencia estadística significativa (p -valor = 0,0074) en la eficiencia de transformación de *Escherichia coli* cuando se varía la temperatura de choque térmico, por lo tanto, se rechaza H_0 del análisis de varianza a favor de H_i . Además, aplicando la clasificación de Duncan se determina que el tratamiento de choque térmico a una temperatura de 42°C es significativamente diferente a los otros tratamientos, mostrando una mejor eficiencia de transformación.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda realizar la cinética de crecimiento bacteriano de *E. coli* Top 10 y HT115 con la finalidad de encontrar con ayuda del espectrofotómetro la densidad óptica adecuada para la preparación de células químicamente competentes.

Para la extracción de DNA plasmídico se recomienda utilizar el kit comercial ya que favorece a la extracción, además existe poca contaminación con DNA genómico, en el caso de que no se pueda adquirir el kit se recomienda una adecuada preparación de las soluciones de extracción.

Se recomienda secuenciar los amplicones obtenidos del plásmido ensamblado para comprobar la integridad del cassette de expresión.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Aguilar, R. (2015). *La producción y exportación del banano y su incidencia en la economía ecuatoriana en el periodo 2008-2013*. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/8766>
- Cameron, D. E., Bashor, C. J., & Collins, J. J. (2014). A brief history of synthetic biology. *Nature Reviews Microbiology* 2014 12:5, 12(5), 381–390. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3239>
- Cheng, C., Liu, F., Sun, X., Tian, N., Mensah, R. A., Li, D., & Lai, Z. (2019). Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 (Foc TR4) responsive miRNAs in banana root. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50130-2>
- Coque, M. T., Angeles Domínguez, M., Vázquez, J., & Vila, J. (2005). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Procedimientos En Microbiología Clínica*.
- Costa, G. L., Bauer, J. C., McGowan, B., Angert, M., & Weiner, M. P. (1996). Site-directed mutagenesis using a rapid PCR-based method. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 57, 239–248. <https://doi.org/10.1385/0-89603-332-5:239/COVER>
- Dale, J., James, A., Paul, J. Y., Khanna, H., Smith, M., Peraza-Echeverria, S., Garcia-Bastidas, F., Kema, G., Waterhouse, P., Mengersen, K., & Harding, R. (2017). Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01670-6>
- 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>

- Ellis, T., Adie, T., & Baldwin, G. S. (2011). DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 3(2), 109–118. <https://doi.org/10.1039/C0IB00070A>
- El-Sappah, A. H., Yan, K., Huang, Q., Islam, M. M., Li, Q., Wang, Y., Khan, M. S., Zhao, X., Mir, R. R., Li, J., El-Tarabily, K. A., & Abbas, M. (2021). Comprehensive Mechanism of Gene Silencing and Its Role in Plant Growth and Development. *Frontiers in Plant Science*, 12, 705249. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.705249>
- FAO. (2020). *Análisis del Mercado del Banano 2018*. <http://www.fao.org/publications/es>
- FAO. (2021). The impact of disasters and crises on agriculture and food security: 2021. *The Impact of Disasters and Crises on Agriculture and Food Security: 2021*. <https://doi.org/10.4060/CB3673EN>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2021). In Brief to The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. *In Brief to The State of Food Security and Nutrition in the World 2021*. <https://doi.org/10.4060/CB5409EN>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Guo, L., Han, L., Yang, L., Zeng, H., Fan, D., Zhu, Y., Feng, Y., Wang, G., Peng, C., Jiang, X., Zhou, D., Ni, P., Liang, C., Liu, L., Wang, J., Mao, C., Fang, X., Peng, M., & Huang, J. (2014). Genome and Transcriptome Analysis of the Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Causing Banana Vascular Wilt Disease. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0095543>
- Gurdaswani, V., Ghag, S. B., & Ganapathi, T. R. (2020). FocSge1 in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 is essential for full virulence. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12866-020-01936-Y/FIGURES/10>

- Herrero, M. (2016). *Modificación de vectores plasmídicos y su aplicación en polímeros ELR para aplicaciones biomédicas*. <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/19683>
- Hou, X., An, B., Wang, Q., Guo, Y., Luo, H., & He, C. (2018). SGE1 is involved in conidiation and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. *Canadian Journal of Microbiology*, *64*(5), 349–357. https://doi.org/10.1139/CJM-2017-0638/SUPPL_FILE/CJM-2017-0638SUPPLA.ZIP
- Kent, R., & Dixon, N. (2020). Contemporary Tools for Regulating Gene Expression in Bacteria. *Trends in Biotechnology*, *38*(3), 316–333. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2019.09.007>
- Leung, R. K. M., & Whittaker, P. A. (2005). RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, *107*(2), 222. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2005.03.004>
- Li, Y., Jiang, S., Jiang, J., Gao, C., Qi, X., Zhang, L., Sun, S., Dai, Y., & Fan, X. (2022). Synchronized Efficacy and Mechanism of Alkaline Fertilizer and Biocontrol Fungi for *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4. *Journal of Fungi*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/JOF8030261>
- Mace, M., Bell, A., & Beckman, C. (1981). *Fungal Wilt Diseases of Plants*. Academic Press. https://books.google.com.ec/books?id=S0Djy-X2GTcC&printsec=frontcover&dq=Fungal+wilt+diseases+of+plants&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Fungal%20wilt%20diseases%20of%20plants&f=false
- 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 2020*, *Vol. 9*, Page 1133, *9*(9), 1133. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9091133>
- Markham, R. (2009). Managing diseases and pests of banana: The way ahead? *Acta Horticulturae*, *828*, 417–427. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2009.828.44>

- 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>
- Meng, F., & Ellis, T. (2020). The second decade of synthetic biology: 2010–2020. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19092-2>
- 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>
- Mostert, D., Molina, A. B., Daniells, J., Fourie, G., Hermanto, C., Chao, C. P., Fabregar, E., Sinohin, V. G., Masdek, N., Thangavelu, R., Li, C., Yi, G., Mostert, L., & Viljoen, A. (2017). The distribution and host range of the banana *Fusarium* wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, in Asia. *PLoS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0181630>
- Nelson, P., Toussoum, T., & Cook, J. (1981). *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*, Edited by Paul E. Nelson, T. A. Toussoun, and R. J. Cook. *Book*, 457. <http://www.psupress.org/books/titles/0-271-00293-X.html>
- Nielsen, A. A. K., Der, B. S., Shin, J., Vaidyanathan, P., Paralanov, V., Strychalski, E. A., Ross, D., Densmore, D., & Voigt, C. A. (2016). Genetic circuit design automation. *Science*, 352(6281). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAC7341/SUPPL_FILE/NIELSEN.SM.PDF
- Omega Bio-tek. (2018). *E.Z.N.A.® Fungal RNA Mini Kit - Product Manual*. <https://www.omegabiotek.com/product/e-z-n-a-fungal-rna-mini-kit/?cn-reloaded=1>
- 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/BIBTEX>
- Ploetz, R. C. (2015). *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology*, 105(12), 1512–1521. https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-04-15-0101-RVW_T2.JPEG

- Promega. (n.d.). *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System | PCR Purification | PCR Clean Up*. Retrieved August 5, 2022, from <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/clean-up-and-concentration/wizard-sv-gel-and-pcr-clean-up-system/?catNum=A9281>
- Raman, T., Raj, E. E., Muthukathan, G., Loganathan, M., Periyasamy, P., Natesh, M., Manivasakan, P., Kotteeswaran, S., Rajendran, S., & Subbaraya, U. (2021). Comparative whole-genome sequence analyses of fusarium wilt pathogen (Foc r1, str4 and tr4) infecting cavendish (aaa) Bananas in India, with a special emphasis on pathogenicity mechanisms. *Journal of Fungi*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/JOF7090717/S1>
- Robinson, J., & Galán, V. (2010). *Bananas and plantains* (2nd Edition). CAB International.
- Sanan-Mishra, N., Abdul Kader Jailani, A., Mandal, B., & Mukherjee, S. K. (2021). Secondary siRNAs in Plants: Biosynthesis, Various Functions, and Applications in Virology. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.610283>
- Smolke, C. D. (2009). Building outside of the box: iGEM and the BioBricks Foundation. *Nature Biotechnology*, 27(12), 1099–1102. <https://doi.org/10.1038/NBT1209-1099>
- Teycheney, P. Y., Acina, I., Lockhart, B. E. L., & Candresse, T. (2007). Detection of Banana mild mosaic virus and Banana virus X by polyvalent degenerate oligonucleotide RT-PCR (PDO-RT-PCR). *Journal of Virological Methods*, 142(1–2), 41–49. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2007.01.004>
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *Invitrogen™ PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit | Fisher Scientific*. Retrieved July 19, 2022, from <https://www.fishersci.ca/shop/products/invitrogen-purelink-quick-plasmid-miniprep-kit-2/k210011>
- Verdonckt, T. W., & Vanden, J. (2022). Methods for the Cost-Effective Production of Bacteria-Derived Double-Stranded RNA for in vitro Knockdown Studies. *Frontiers in Physiology*, 13, 1. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2022.836106/FULL>

Zhang, K., Yin, X., Shi, K., Zhang, S., Wang, J., Zhao, S., Deng, H., Zhang, C., Wu, Z., Li, Y., Zhou, X., & Deng, W. (2021). A high-efficiency method for site-directed mutagenesis of large plasmids based on large DNA fragment amplification and recombinational ligation. *Scientific Reports*, 11(1), 10454. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-89884-Z>

Apéndices