

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

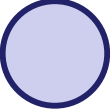

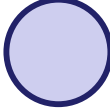

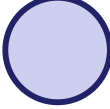

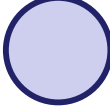

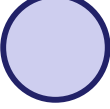

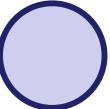

“Construcción de un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RPM1 asociado a la resistencia de fusariosis en banano”

Brun Velásquez, Jesús Andrés

DIRECTOR: Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

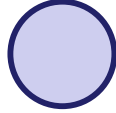
Sangolquí, 29 de Agosto del 2023



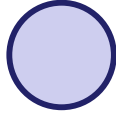
	1. INTRODUCCIÓN	
	2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	
	3. MATERIALES Y MÉTODOS	
	4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
	5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
	6. AGRADECIMIENTOS	



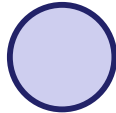
1. INTRODUCCIÓN



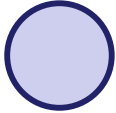
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS



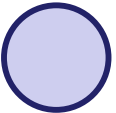
3. MATERIALES Y MÉTODOS



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



6. AGRADECIMIENTOS



JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Banano “Cavendish”

Musa acuminata

Alimento para 400 Millones de personas

> 40% de la producción mundial

10% de las exportaciones del Ecuador

No es posible utilizar cruzamientos para desarrollar resistencia a FocR4T.

CRISPR-Cas9



Conferir resistencia a FocR4T en banano.

Gen RPM1

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense*
Tropical Raza 4 (FocR4T)



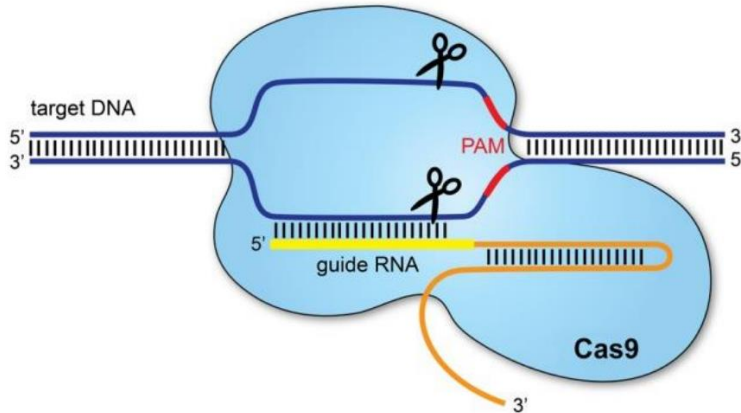
Figura 4: Síntomas externos e internos de la Fusariosis por *FocR4T*. Adaptado de: García-Bastidas, (2020).



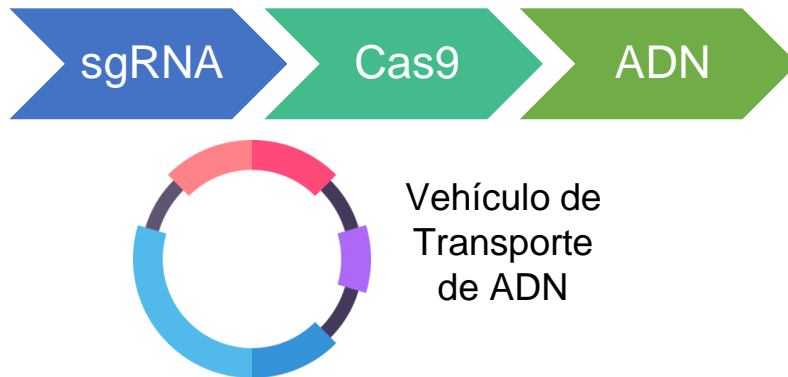
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Sistema CRISPR-Cas9

Imagen 1:
Sistema CRISPR-Cas9

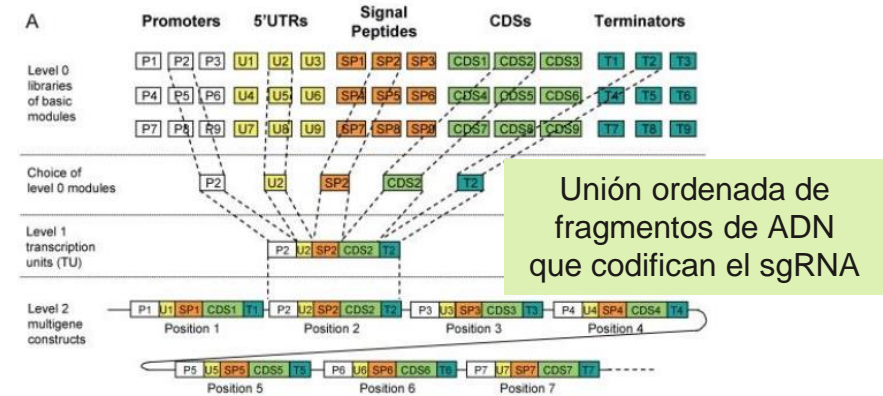


Adaptado de: Redman et al., (2016).



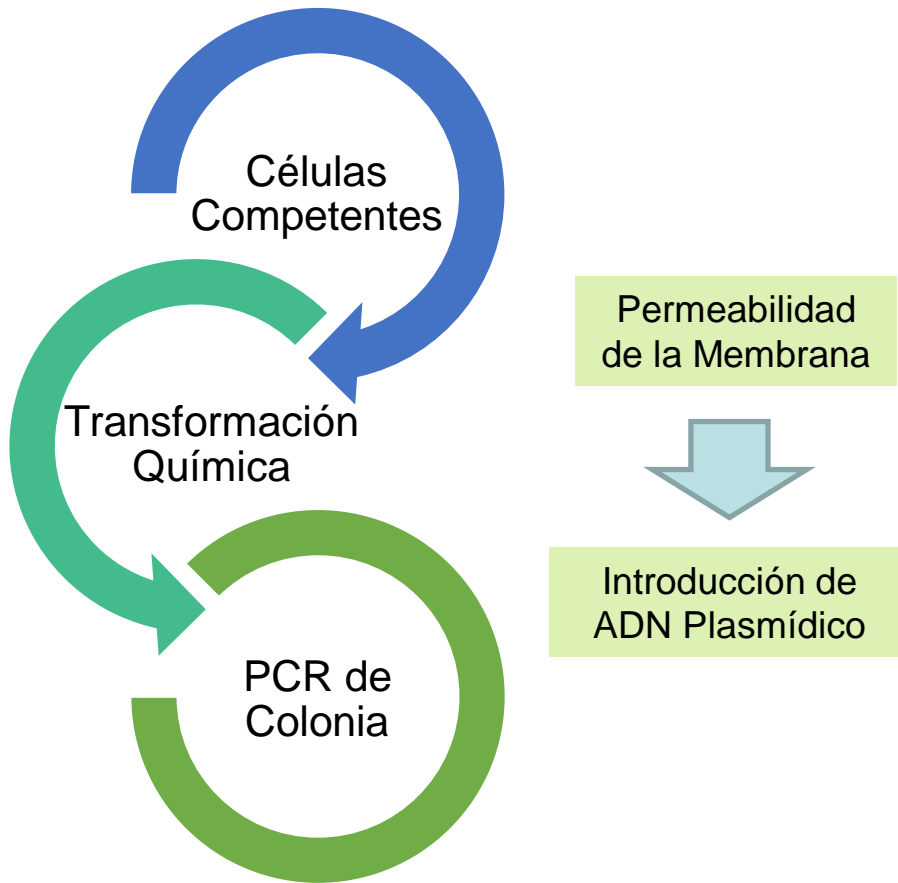
Ensamblaje MoClo (Golden Gate)

Imagen 2:
Esquema del Ensamblaje MoClo.



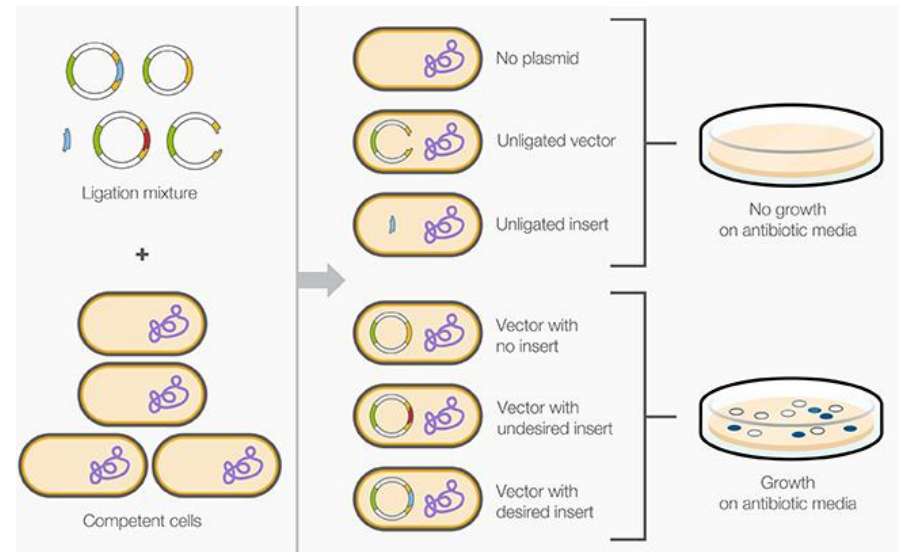
Adaptado de: Weber et al., (2011).



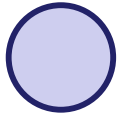


Amplificar la secuencia objetivo.

Imagen 3:
Transformación para expresión en *Escherichia coli*.



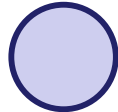
Adaptado de: Sachdev et al., (2019).



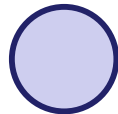
1. INTRODUCCIÓN



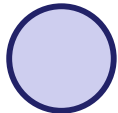
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS



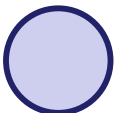
3. MATERIALES Y MÉTODOS



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

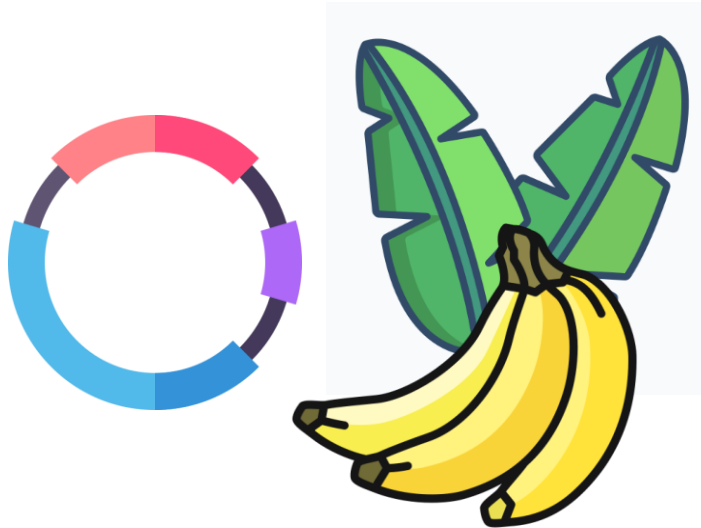


6. AGRADECIMIENTOS



OBJETIVO GENERAL

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



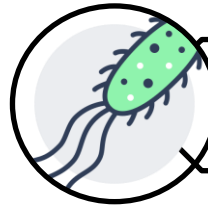
OBJETIVOS ESPECÍFICOS



Diseñar un ARN guía dirigido a la región promotora del gen RPM1 de banano.



Ensamblar un plásmido que contenga la secuencia del sgRNA diseñado, una nucleasa y un promotor para monocotiledóneas.


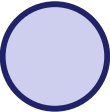

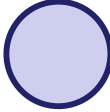



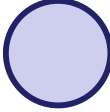

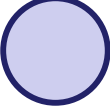

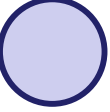



Transformar cepas de *Escherichia coli* con el plásmido ensamblado.

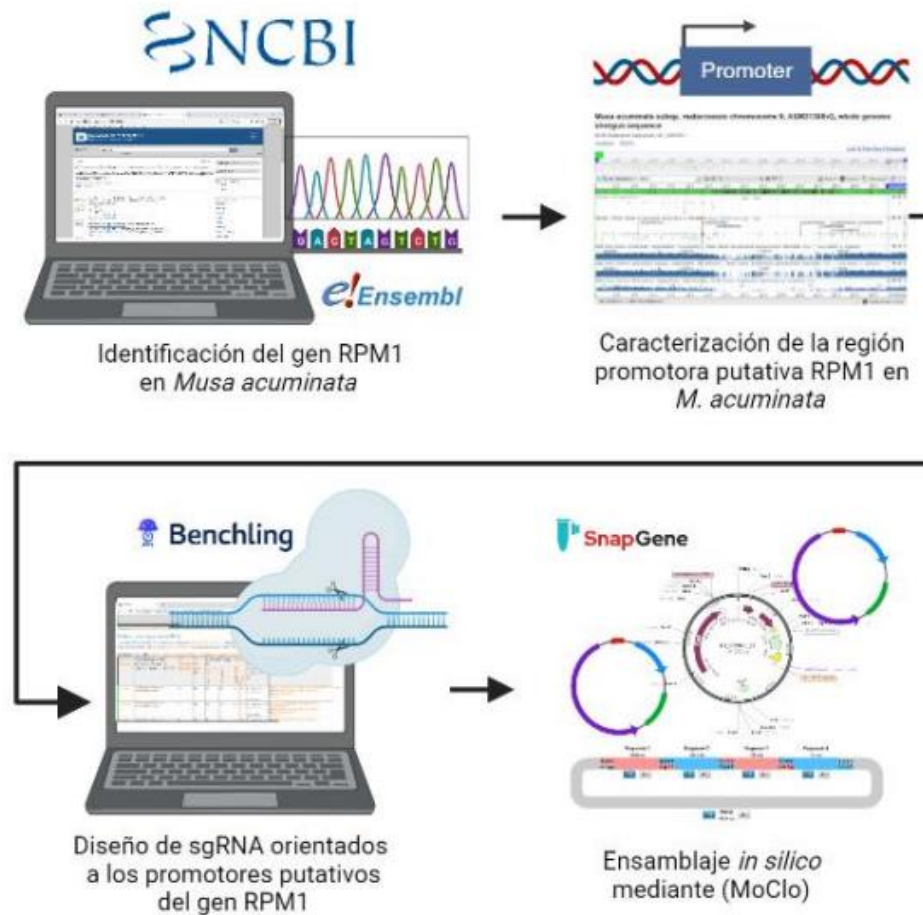
HIPÓTESIS

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



		1. INTRODUCCIÓN	
		2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	
		3. MATERIALES Y MÉTODOS	
		4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
		5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
		6. AGRADECIMIENTOS	

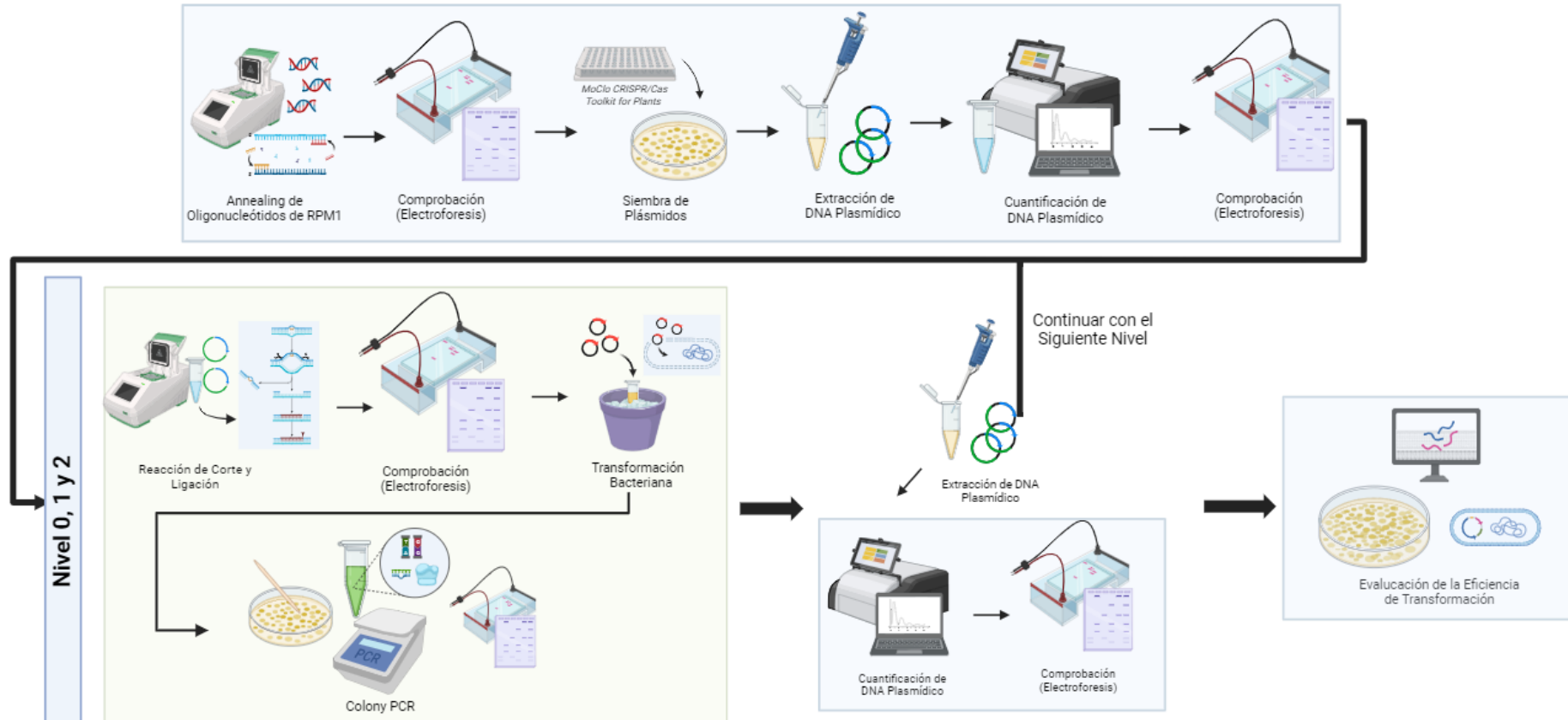
PROCEDIMIENTO IN SILICO



Nota. Elaborado con BioRender.



PROCEDIMIENTO IN VITRO

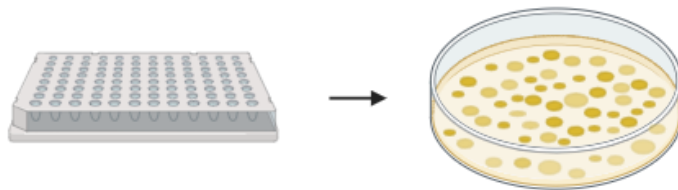
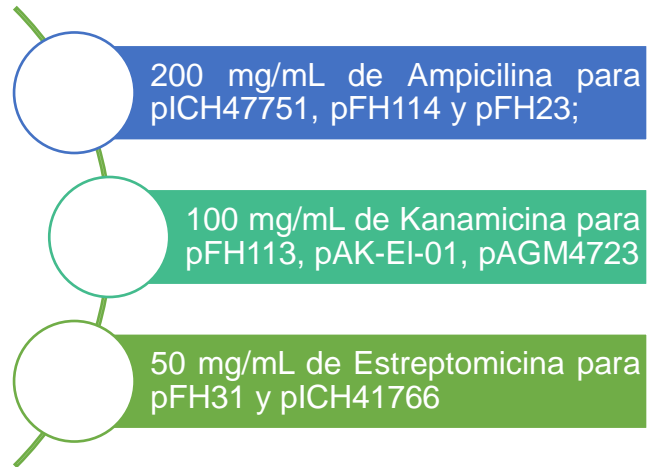


Nota. Elaborado con BioRender.



PROCEDIMIENTO IN VITRO

SIEMBRA DE *E. coli* PORTADORAS DE PLÁSMIDOS



MoClo Tool Kit - #1000000044
MoClo CRISPR/Cas for Plants -
#1000000159

Agar LB
IPTG (0.1 M)
X-Gal (20 mg/mL)

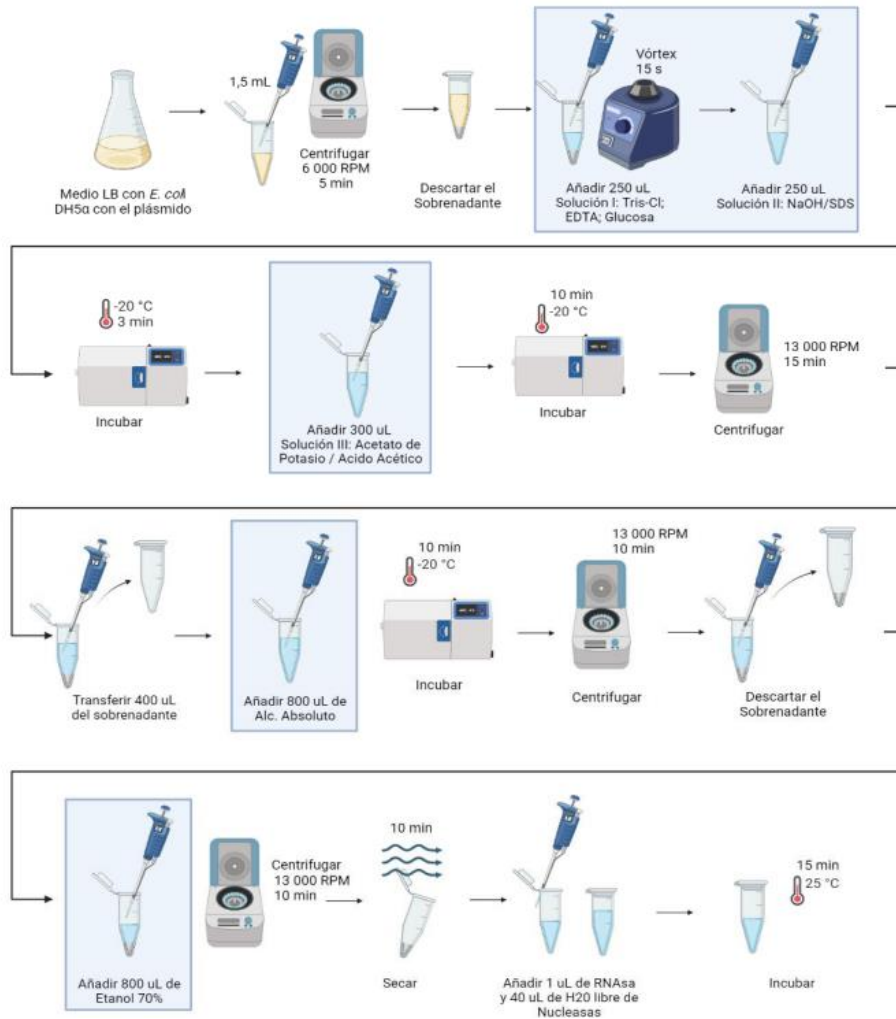
Tabla 1

Plásmidos utilizados para el ensamblaje de MoClo por niveles

Nombre (Vector)	Código	Aplicación	ID AddGene	Marcador
Nivel 0 (L0)				
pFH113	E4	sgRNA Columna Vertebral	128210	Kan
Nivel 1 (L1)				
pICH47751	D3	Aceptor / Backbone.	48002	Amp
pFH31	B11	Pol III Promotor (Monocotiledóneas).	125884	Str
pAK-EL-01	C11	End-linker para tRNA – sgRNA.	125760	Kan
Nivel 2 (L2)				
pAGM4723	A5	Aceptor / Backbone.	48015	Kan
pFH114	H7	Marcador plantas (Monocotiledóneas).	148015	Amp
pFH23	G2	SpCas9	128408	Amp
pICH41766	D5	End-linker.	48018	Str



EXTRACCIÓN DE ADN



LISIS ALCALINA (CONVENCIONAL) iGEM™

(Sambrook, et al., 1989)



KIT MINIPREP PURELINK™ PLASMID
DNA INVITROGEN™

Nota. Elaborado con BioRender.



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

REACCIÓN DE CORTE Y LIGACIÓN

Tabla 2

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

Componente	Volumen
Backbone L0 (pFH113)	1 μ L
sgRNA (Hibridado)	1 μ L
Mix de ADN Ligasa T4 (10X)	2,5 μ L
Albúmina de suero bovino (BSA)	1,5 μ L
Enzima BbsI-HF	1 μ L
Agua Libre de Nucleasas	8 μ L
(Hahn et al. 2020) Volumen Total	15 μ L

Tabla 3

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

Componente	Volumen
Backbone L1 (pICH47751)	1 μ L
Promotor Pol III (pFH31)	1 μ L
Plásmido Ensamblado L0	1 μ L
End-linker (paK-EI-01)	1 μ L
Mix de ADN ligasa T4 (10X)	2,5 μ L
Albúmina de suero bovino (BSA)	1,5 μ L
Enzima Eco31-BsaI	1 μ L
Agua Libre de Nucleasas	6 μ L
Volumen Total	15 μ L

Tabla 4

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

Componente	Volumen
Backbone L2 (pAGM4723)	1 μ L
Marcador de Selección (pFH114)	1 μ L
SpCas9 (pFH23)	1 μ L
Plásmido Ensamblado L1	1 μ L
End-linker 2 (pICH41766)	1 μ L
Mix de ADN ligasa T4 (10X)	2,5 μ L
Albúmina de suero bovino (BSA)	1,5 μ L
Enzima BbsI-HF	1,5 μ L
Agua Libre de Nucleasas	5 μ L
Volumen Total	15 μ L

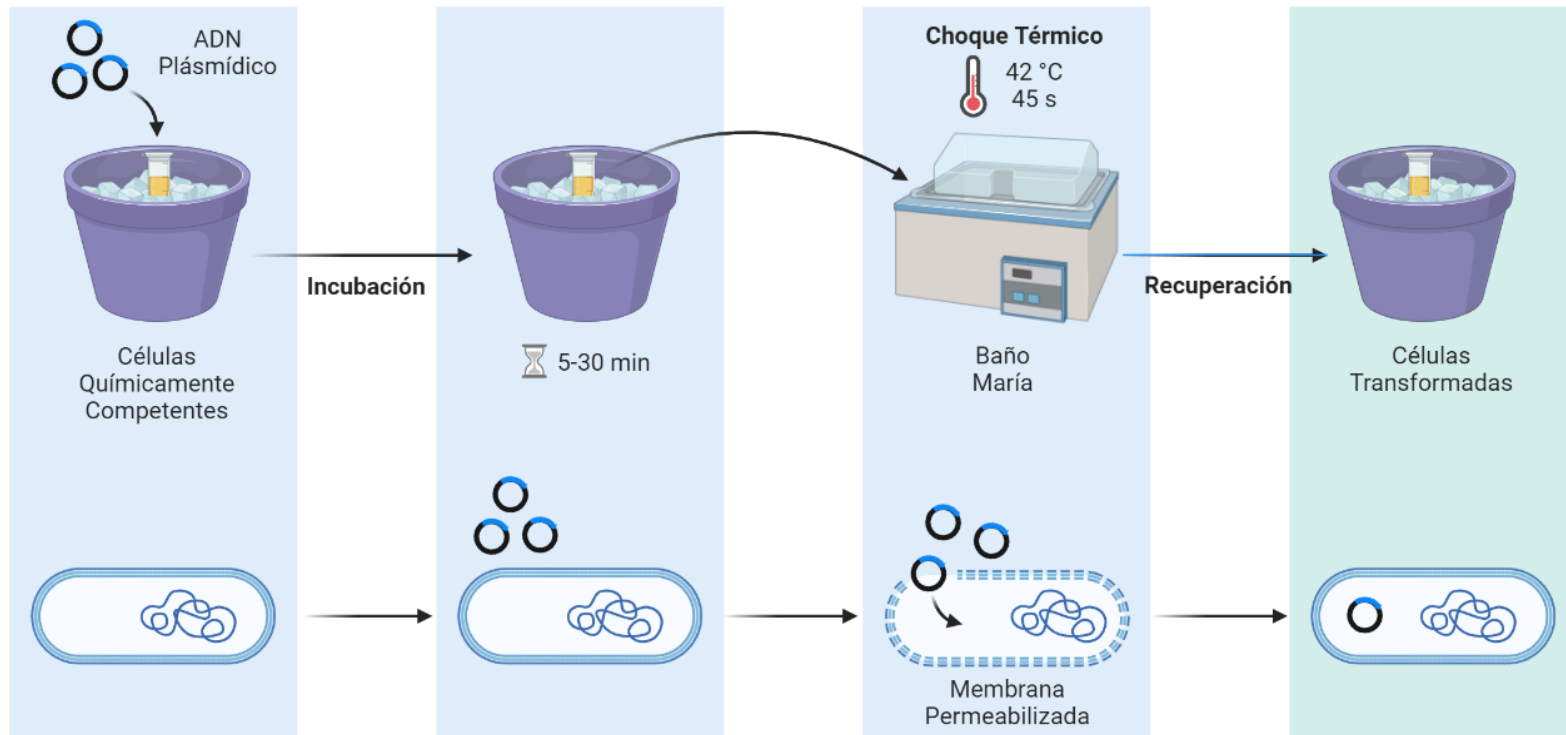
Nota. Cada elemento del ensamblaje se encuentra ajustado a una concentración de 100 ng/ μ L; mientras que el plásmido ensamblado está a 10 μ M.



TRANSFORMACIÓN QUÍMICA

Figura 4

Transformación de células químicamente competentes por choque térmico



Nota. Elaborado con BioRender.

(Hanahan et al., 1991)



COLONY PCR

Figura 5

PCR Colony empleando DreamTaq Green PCR Master Mix

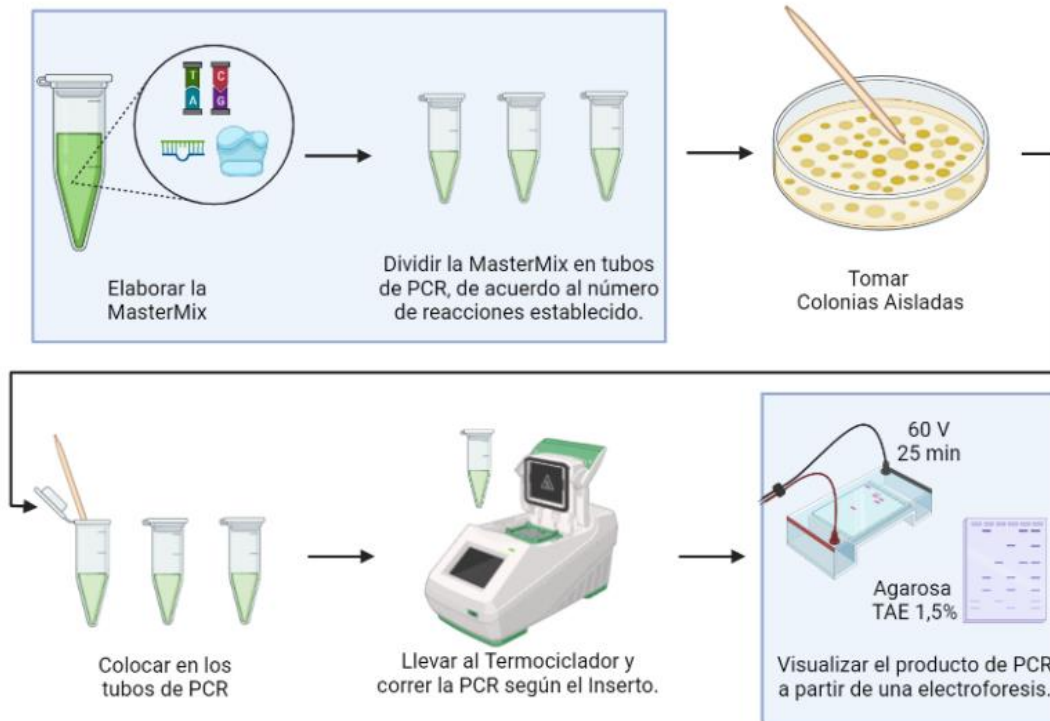


Tabla 5

Condiciones de reacción de la PCR

Componentes	Volúmen 1X
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	6.25µL
Primer Reverse (10µM)	1.25 µL
Primer Forward (10µM)	1.25 µL
Agua libre de nucleasas	3 µL
Volumen Total	12.5 µL

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

Nota. Elaborado con BioRender.

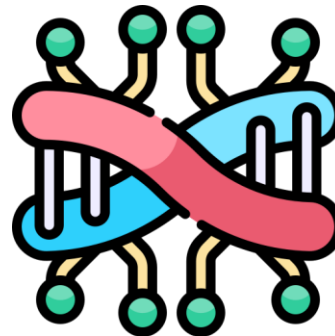


Tabla 6

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

Región	Forward	Reverse
L0	TTCGATTCCCGGCTGGTGCA Tm: 67,4 °C	AGCATAGCTCTGAAACAATC Tm: 53,1 °C
L1	GAACCCTGTGGTTGGCATGC Tm: 55,6 °C	CTGGTGGCAGGATATATTGT Tm: 51,9 °C
L2	TTACGAGGATGCACATGTGA Tm: 57,8 °C	AGCGCAGTAACATAGATGAC Tm: 54,9 °C

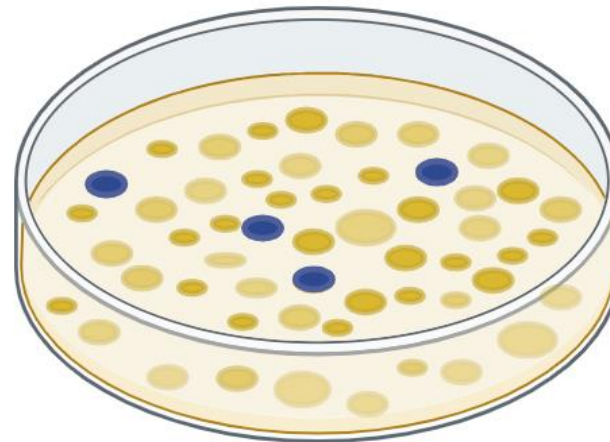
Nota. Se detalla la secuencia de cada oligonucleótido y su temperatura de melting (*T_m*). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Macrogen, Inc



EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN (ET)

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

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



DISEÑO EXPERIMENTAL

DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR (DCA)

Eficiencia de transformación en cada cepa de *E. coli*.

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



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

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

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

VARIABLES

TRATAMIENTOS

T1: *E. coli* DH5 α

T2: *E. coli* JM109


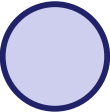

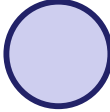

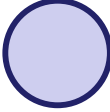



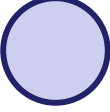

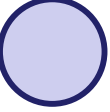

T3: *E. coli* TOP10

- **Dependiente:** ET (UFC/ μ g).
- **Independiente:** *E. coli* (DH5 α , JM109 y Top10).

HIPÓTESIS

- **Nula:** $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$
- **Alternativa:** $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$



		1. INTRODUCCIÓN	
		2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	
		3. MATERIALES Y MÉTODOS	
		4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
		5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
		6. AGRADECIMIENTOS	

RESULTADOS *IN SILICO*

POSIBLE REGIÓN PROMOTORA

```
>NC_025210.1:32128338-32128838 Musa acuminata
chromosome 9, ASM31385v2, whole genome shotgun
sequence
AAATAAATTTTACATGTAAAAATTTGAGCAAACCTTATTTCAATCTGA
ACCACCAGACAAGAAGACTTATTCATGGCTTTGGCATGTAAAAATA
ATTATTATTTTTTTGAACTACTTTTTCTGTTATTTCAAATCATTTA
TGATTTAATAATATTTTAAATATCCATAATAATATTTTCATAAATCTT
AATCATTTAAAGAAAATATGTCCTATGATAAATAGGTGGATGAGTAA
TAAAATACCCCTCTAAATTAAGTAAATTAATTAGCTACCCATATA
CTTCTTCTGACTTACACTTAAACACTCTTCTCTTAGTAAAAGAACAA
TGGATACAACCTCAAGGGATGACTTCAACCTTAACACTTAAGCTTAAA
GCTTAATTTAACCAATAGATATTATTCTTAAGAAATCCAAAAAATAT
TGGCCAACCTTTGGATTAAGTTTGAGTATAACATACCCAAAATTGT
TGTGATTAACCAGTAGATAAGAATCACAAAT
```

sgRNA con una eficiencia de escisión, mayor al 50%, presentan una alta probabilidad de generar la modificación genética deseada en el sitio objetivo (Liu et al., 2022).

Tabla 7

ARN guías sintetizados dirigidos al promotor del gen RPM1

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

Contenido de GC dentro del rango óptimo, el cual oscila entre un 40 a un 80% (Liu et al., 2022).

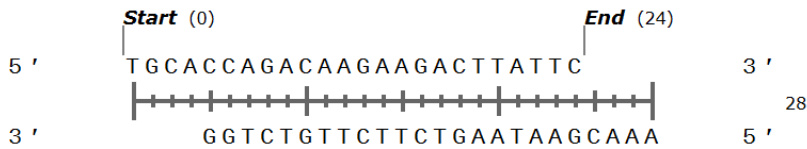


90% Eficiencia y Especificidad, minimiza la escisión fuera del objetivo (Doench et al., 2016).



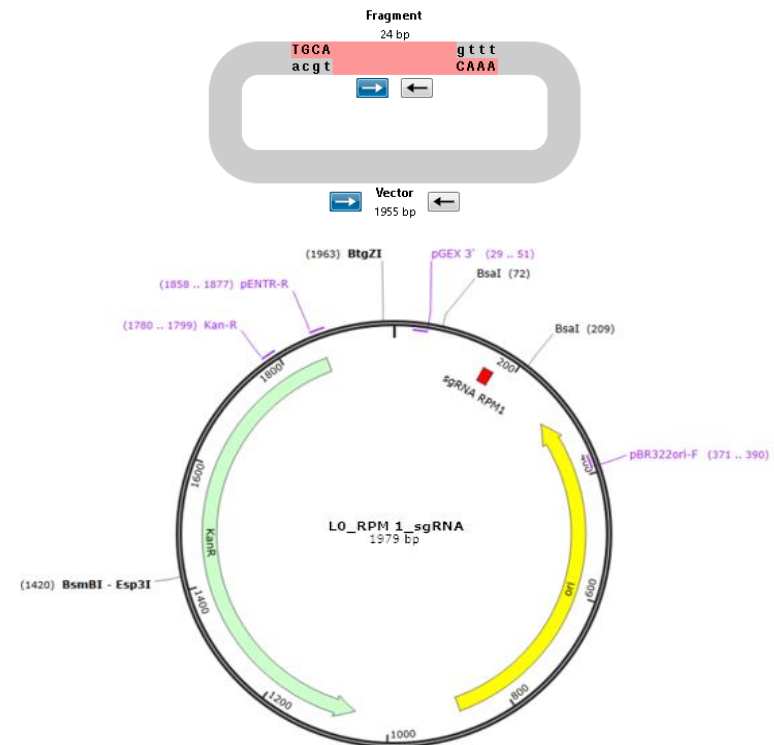
ENSAMBLAJE *IN SILICO* MEDIANTE CLONACIÓN MODULAR (MoClo)

Figura 6:
Oligonucleótidos alineados sgRNA1 RPM1.



Nota. Elaborado con SnapGene™.

Figura 7
Plásmido ensamblado LO



Nota: El fragmento de 24 pb corresponde a los oligonucleótidos hibridados y el vector de 1955 pb corresponde al Backbone pFH113.

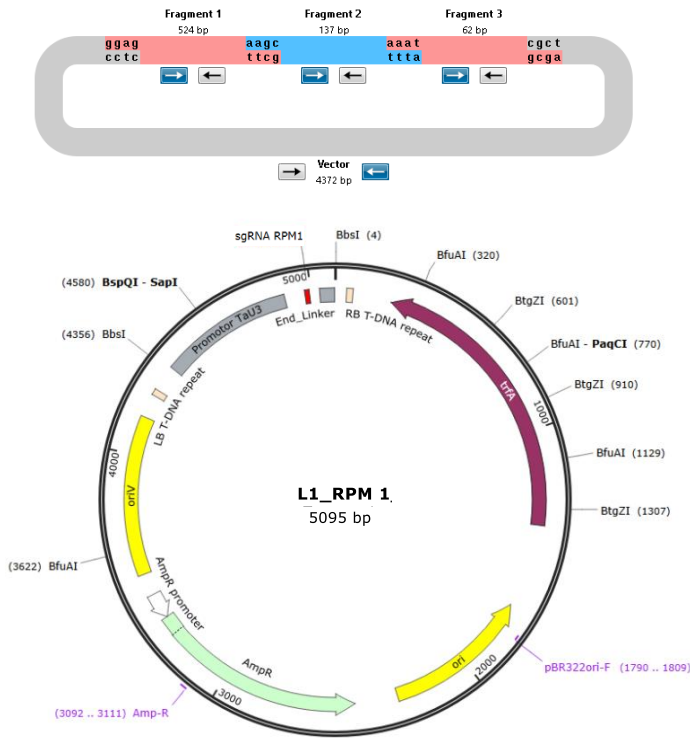
Elaborado con SnapGene™



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

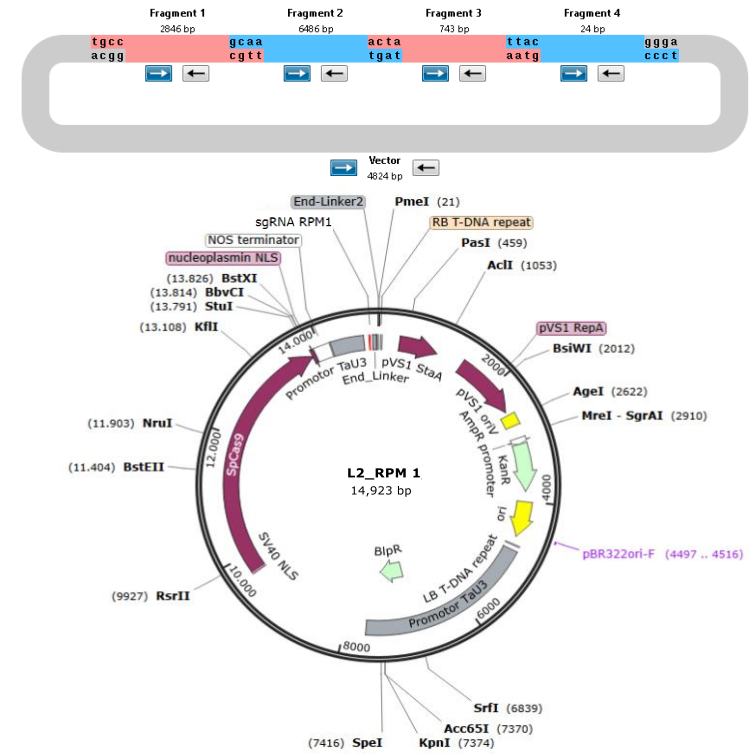
ENSAMBLAJE *IN SILICO* MEDIANTE CLONACIÓN MODULAR (MoClo)

Figura 8
Plásmido ensamblado L1



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

Figura 9
Plásmido ensamblado L2



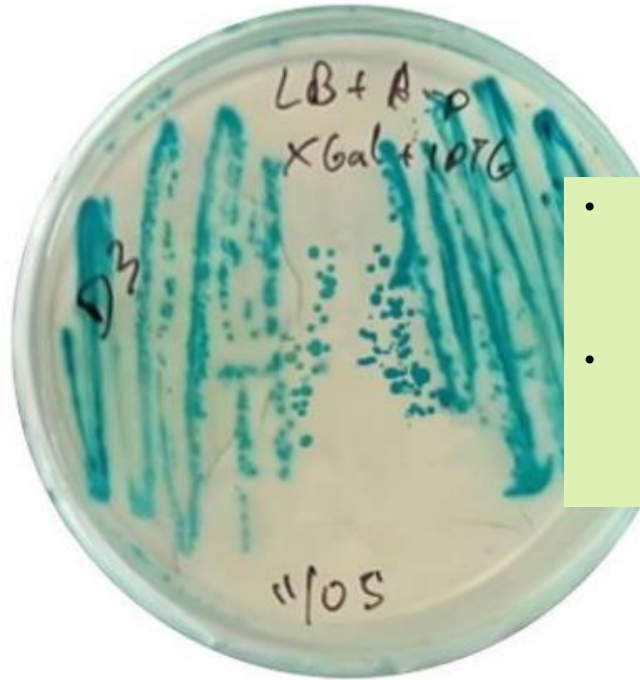
Nota: Plásmido ensamblado en L2, que presenta el promotor Pol III y el sgRNA (473 pb), un marcador de selección (2864 bp), SpCas9 (6486 bp) y un End-linker (24 bp). Elaborado con SnapGene™.



SIEMBRA DE *E. coli* PORTADORAS DE PLÁSMIDOS

Figura 10

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



- pFH113 (E4), pICH47751 (D3), pAGM4723 (A5) se encontraron en colonias azules.
- pFH31 (B11), pAK-EI-01 (C11), pFH114 (H7), pFH23 (G2) y pICH41766 (D5), se encontraron presentes colonias blancas.

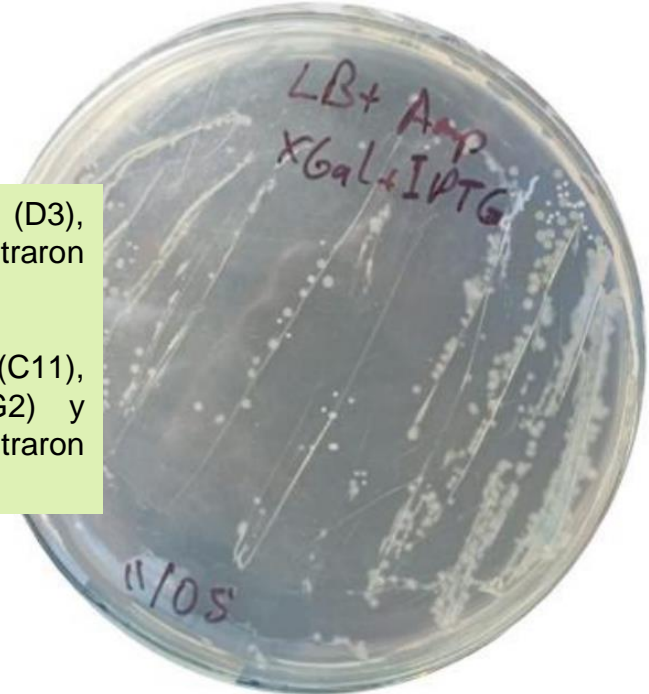
Nota. Plásmido pICH47751 (D3) (Backbone L1).

pFH31: Promotor TaU3, el cual permite impulsar la expresión del sgRNA (Yue et al., 2020).

pFH23: SpCas9 media la escisión del ADN, guiada por el sgRNA (Shojaei Baghini et al., 2021).

Figura 11

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



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

pFH114: Casete ZmUBI_p:BAR::NOST, asegura la expresión génica (Liou et al., 2014).

CUANTIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Plásmido	Muestra	LISIS ALCALINA (CONVENCIONAL)			MINIPREP PURELINK™		
		Concentración (µg/mL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A230/260)	Concentración (µg/mL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A230/260)
pAGM4723	A5	2933	2,015	2,532	2,653	1,733	5,2
pFH31	B11	3014	2,049	2,022	2,959	1,318	1,933
pAK-EI-01	D3	2862	2,065	2,047	6,327	2,067	1,771
pICH47766	D5	2284	2,13	1,885	16,12	2,107	0,6031
pFH23	G2	2094	2,067	2,665	434,4	1,753	1,505
pFH114	H7	2927	2,097	1,987	37,65	1,873	1,708

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

Proteínas
> 1,8

C. Químicos
1,8- 2,2

Absorbancia de la luz a dos diferentes longitudes de onda.

(Sasagawa, 2018)

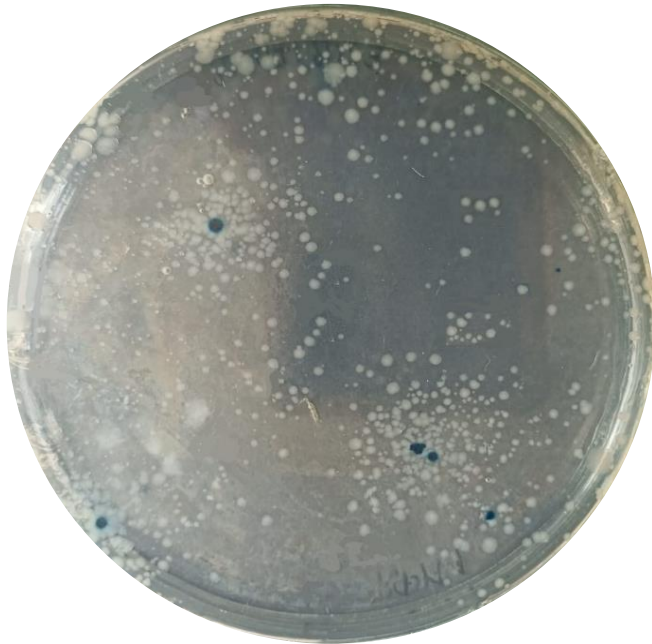
Limitaciones de la columna de resina (Bird et al., 2022). Plásmidos de mayor tamaño disminuyen los sitios de unión disponibles dentro de la resina.



SIEMBRA DE *E. coli* TRANSFORMADAS

Figura 12

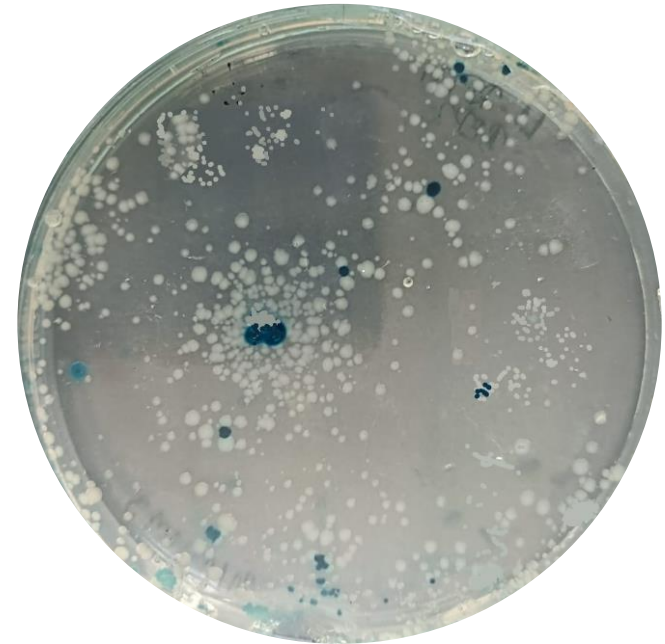
E. coli DH5 α con plásmido ensamblado L0 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Kanamicina (100 mg/mL)



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

Figura 13

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



Nota: Dentro de las colonias de *E. coli* DH5 α , se encuentra el plásmido ensamblado de L1, el cual contiene el promotor Pol III (524 bp), el sgRNA (137 pb) y un End-linker (62 pb). Elaborado con SnapGene™.

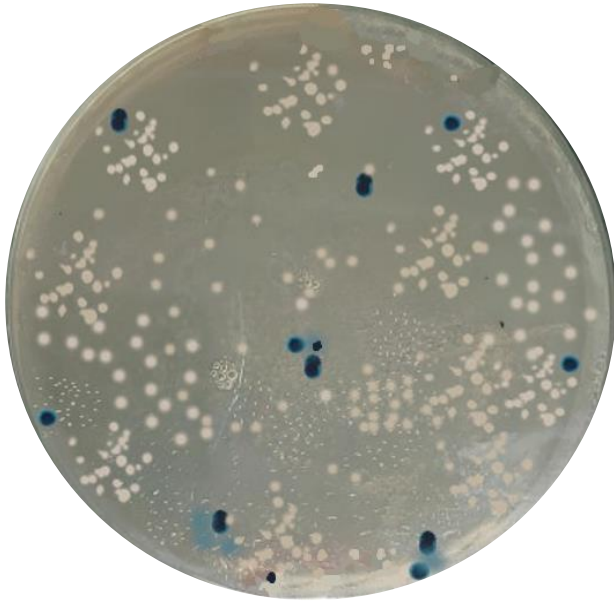


SIEMBRA DE *E. coli* TRANSFORMADAS

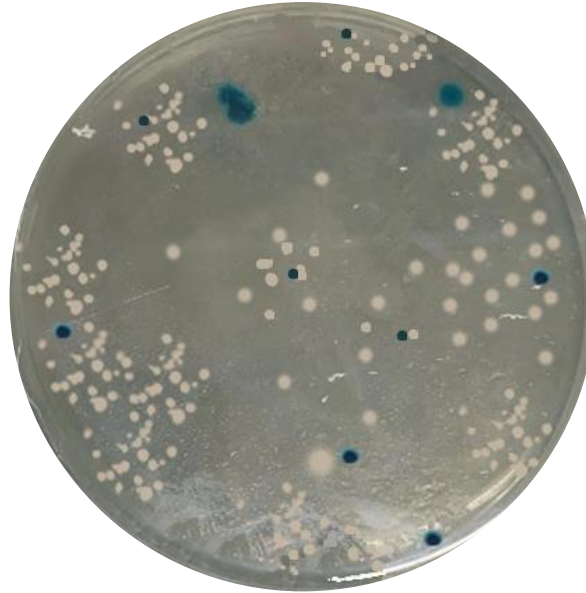
Figura 14

E. coli DH5 α JM109 y TOP10, con plásmido ensamblado L2 sembrado en medio LB-agar, IPTG, X-gal y Kanamicina (100 mg/mL)

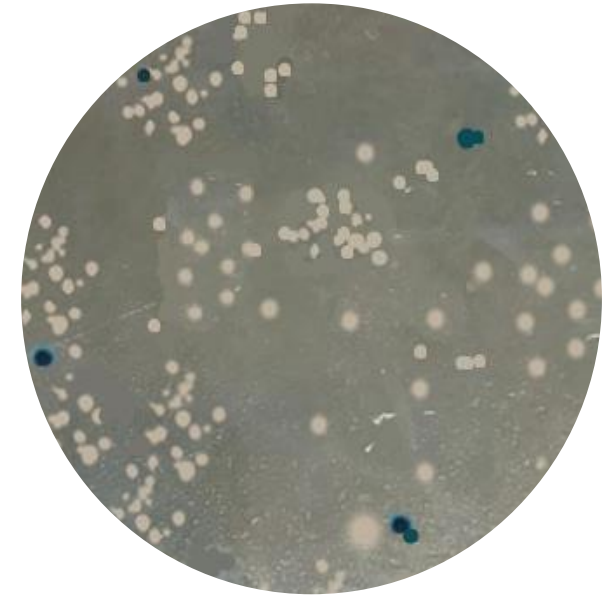
E. coli JM109



E. coli TOP10



E. coli DH5 α



Colonias Azules y Blancas



Gen lacZ

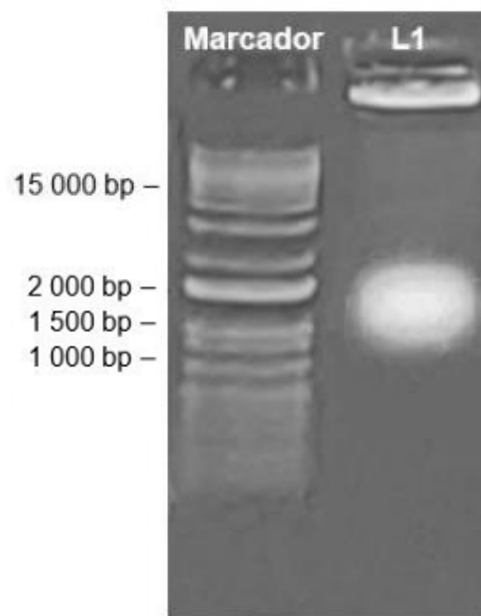
Las bacterias con plásmidos sin inserto expresan la enzima β -galactosidasa, que produce el color azul en presencia del sustrato X-gal (Green & Sambrook, 2019).



PCR DE COLONIA

Figura 15

Confirmación de la transformación de *E. coli* DH5 α con el plásmido ensamblado de L1 a través de una PCR de colonia.



Secuenciación directa de ADN plasmídico aislado de cultivos de colonias individuales (Fischer et al., 2018).



Requiere más pasos de manipulación y no ofrecen la velocidad y simplicidad de la PCR de colonia para identificar clones positivos portando la construcción del plásmido de interés

Nota: (L1) corresponde al producto amplificado del constructo de nivel 1 hallado en *E. coli* DH5 α de 1766 pb



EXTRACCIÓN ADN PLASMÍDICO

Nivel 0 (L0)

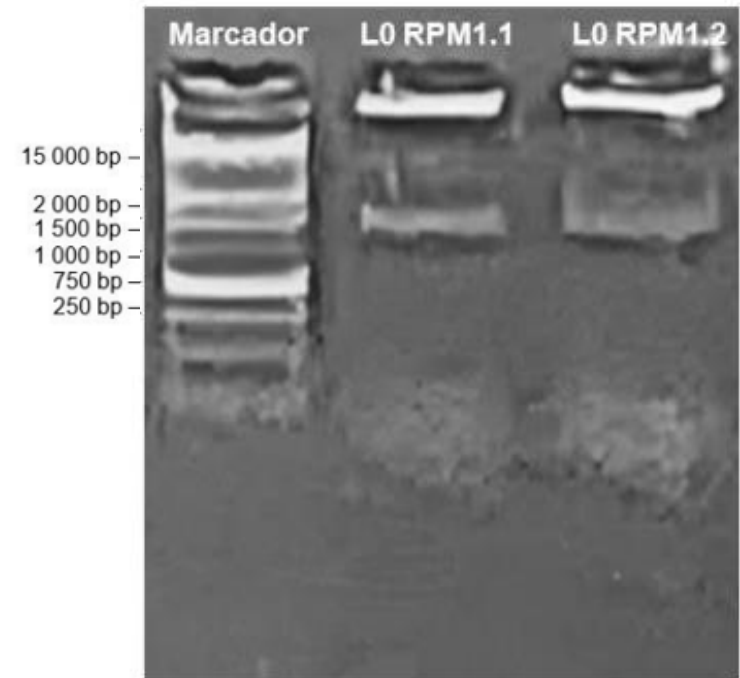
Tabla 9

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

Muestra	Concentración (µg/mL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/230)
L0_RPM1.1	2532	1,961	2,032
L0_RPM1.2	2562	1,828	2,216
L0_RPM1.3	1952	1,843	2,041
L0_RPM1.4	1745	1,911	2,007

Figura 16

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



Nota. Marcador de peso molecular: 1kb DNA Ladder de Promega™.



EXTRACCIÓN ADN PLASMÍDICO

Nivel 1 (L1)

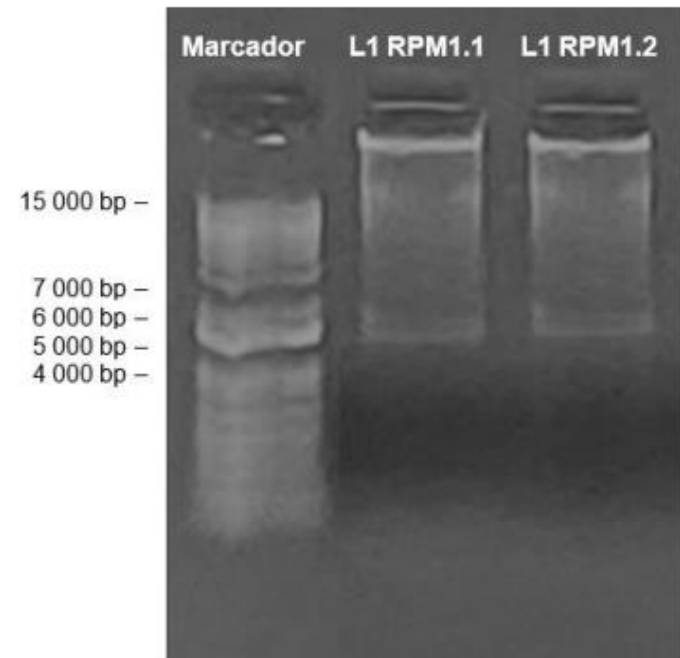
Tabla 10

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

Muestra	Concentración (µg/mL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/230)
L1_RPM1.1	2215	1,857	2,053
L1_RPM1.2	1989	1,967	2,027
L1_RPM1.3	1542	1,942	2,031
L1_RPM1.4	1678	1,842	2,141

Figura 17

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



Nota. Marcador de peso molecular: 1kb DNA Ladder de Promega™.



EXTRACCIÓN ADN PLASMÍDICO

Nivel 2 (L2)

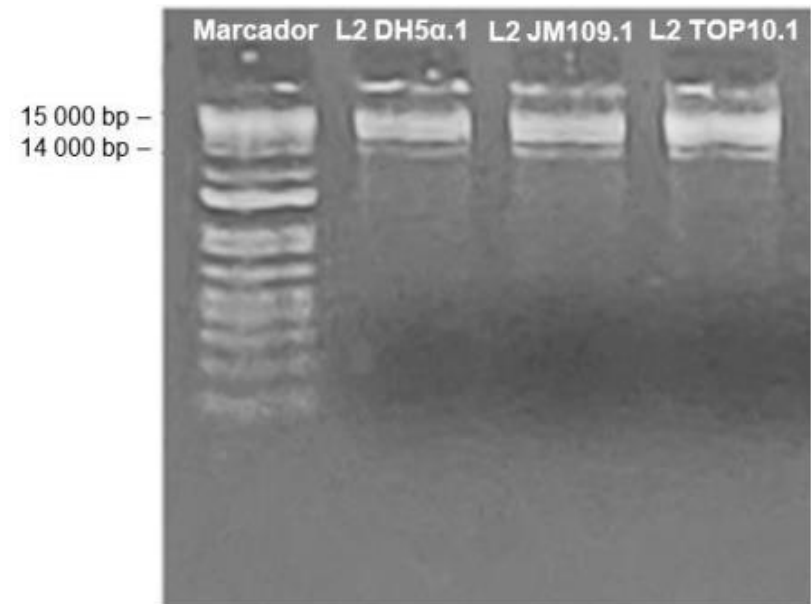
Tabla 11

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

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

Figura 18

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



Nota. Marcador de peso molecular: 1kb DNA Ladder de Promega™.



EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN

Tabla 12

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

Cepa	Nº	Número de Colonias	UFC	TE (UFC/μg)	Media \bar{x} TE
DH5α	1	135	$3,51 \times 10^8$	$4,21 \times 10^7$	$4,30 \times 10^7$
DH5α	2	122	$3,17 \times 10^8$	$3,80 \times 10^7$	
DH5α	3	157	$4,08 \times 10^8$	$4,90 \times 10^7$	

Tabla 13

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

Cepa	Nº	Número de Colonias	UFC	TE (UFC/μg)	Media \bar{x} TE
DH5α	1	223	$5,79 \times 10^8$	$8,11 \times 10^7$	$7,87 \times 10^7$
DH5α	2	215	$5,58 \times 10^8$	$7,81 \times 10^7$	
DH5α	3	212	$5,50 \times 10^8$	$7,70 \times 10^7$	

Tabla 14

Eficiencia de transformación de E. coli DH5α, JM109 y TOP10 en relación a la inserción del constructo ensamblado de nivel 2 (L2).

CEPA	Nº	Número de Colonias	UFC	TE (UFC/μg)	Media \bar{x} TE
DH5α	1	75	$1,95 \times 10^8$	$3,46 \times 10^7$	$3,55 \times 10^7$
DH5α	2	83	$2,15 \times 10^8$	$3,83 \times 10^7$	
DH5α	3	72	$1,90 \times 10^8$	$3,37 \times 10^7$	
JM109	1	110	$2,86 \times 10^8$	$5,07 \times 10^7$	$5,64 \times 10^7$
JM109	2	136	$3,53 \times 10^8$	$6,27 \times 10^7$	
JM109	3	121	$3,15 \times 10^8$	$5,58 \times 10^7$	
TOP 10	1	88	$2,28 \times 10^8$	$4,06 \times 10^7$	$3,63 \times 10^7$
TOP 10	2	71	$1,85 \times 10^8$	$3,28 \times 10^7$	
TOP 10	3	77	$2,00 \times 10^8$	$3,55 \times 10^7$	



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Figura 19

Análisis de varianza (ANOVA) y prueba Tukey, respecto a la eficiencia de transformación en las cepas TOP10, DH5α y JM109 de *E. coli*.

Medidas resumen

Variable	n	Media	D.E.	CV	Min	Máx
DH5α	3	3.55	0.24	6.86	3.37	3.83
JM109	3	5.64	0.60	10.68	5.07	6.27
TOP10	3	3.63	0.40	10.91	3.28	4.06

Análisis de la varianza

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

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

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

Test: Tukey Alfa=0,05

CEPA	Media	n	E.E.	gr. d
DH5α	3.55	3	542.54	A
JM109	5.64	3	542.54	B
TOP10	3.63	3	542.54	A

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

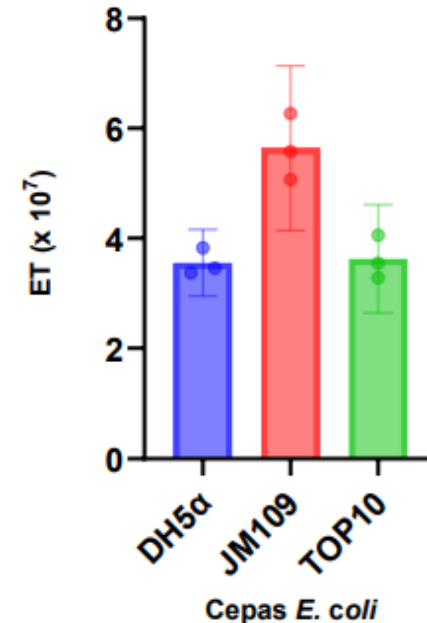
Nota: Elaborado con InfoStat.

JM109 es RecA+, mientras TOP10 y DH5α son RecA- (Yang et al. 2022).

Recombinación y reparación de DNA más eficiente (Yang et al. 2022).

Tiempo de almacenamiento de las células TOP10 y DH5α (72 horas) en comparación a JM109 (48 horas) (Chung et al. 1989)

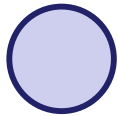
Eficiencia de Transformación (ET) en *E. coli*



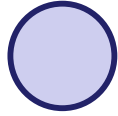
Nota: Elaborado con Prism GraphPad 10.

Se cumple con: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$

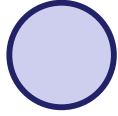




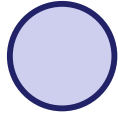
1. INTRODUCCIÓN



2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS



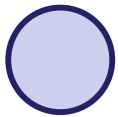
3. MATERIALES Y MÉTODOS



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



6. AGRADECIMIENTOS



CONCLUSIONES

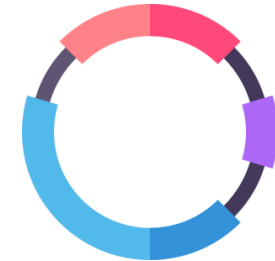
El análisis ANOVA mostró un valor $p < 0.05$, indicando que al menos una cepa tiene una eficiencia de transformación significativamente diferente.



La prueba de Tukey reveló que la cepa JM109 presenta una eficiencia de transformación mayor ($5,64 \times 10^7$ UFC/ μ g) en comparación con las cepas DH5 α ($3,55 \times 10^7$ UFC/ μ g) y TOP10 ($3,63 \times 10^7$).

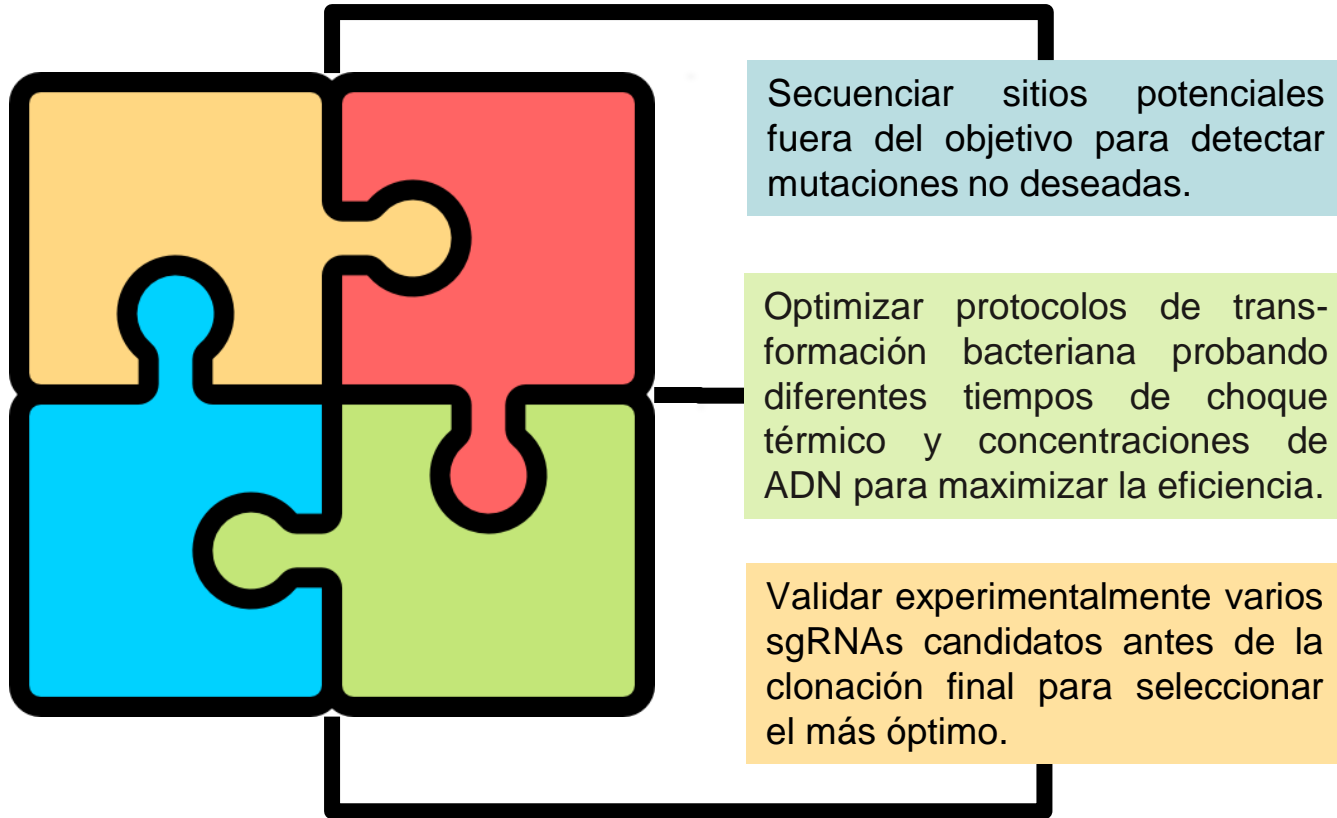


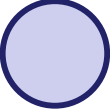

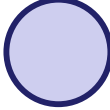

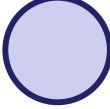

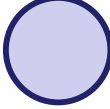

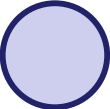




Mediante análisis bioinformático se identificó la secuencia del promotor RPM1 en banano y se diseñaron sgRNAs altamente específicos para dirigir el sistema CRISPR-Cas9 a esta región.



La metodología de clonación MoClo, basada en Golden Gate, permitió el ensamblaje del vector plasmídico, uniendo el promotor, el sgRNA, la endonucleasa Cas9 y un marcador de selección en un solo plásmido.





	1. INTRODUCCIÓN	
	2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	
	3. MATERIALES Y MÉTODOS	
	4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
	5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
 	6. AGRADECIMIENTOS	

AGRADECIMIENTOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Francisco Flores, Ph.D.
Tutor Académico

Silvana Granda M.Sc.
**Técnica del Laboratorio de
Microbiología Molecular - ESPE**

Antonio Bustamante, Ph.D.
Director de Proyecto - INIAP

Docentes

Familia

Amigos

Compañeros

¡Muchas Gracias!



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA