

Edición *In vitro* del gen SIX9 de *Fusarium oxysporum* asociado a la marchitez del banano mediante CRISPR-Cas9.

PROBLEMA

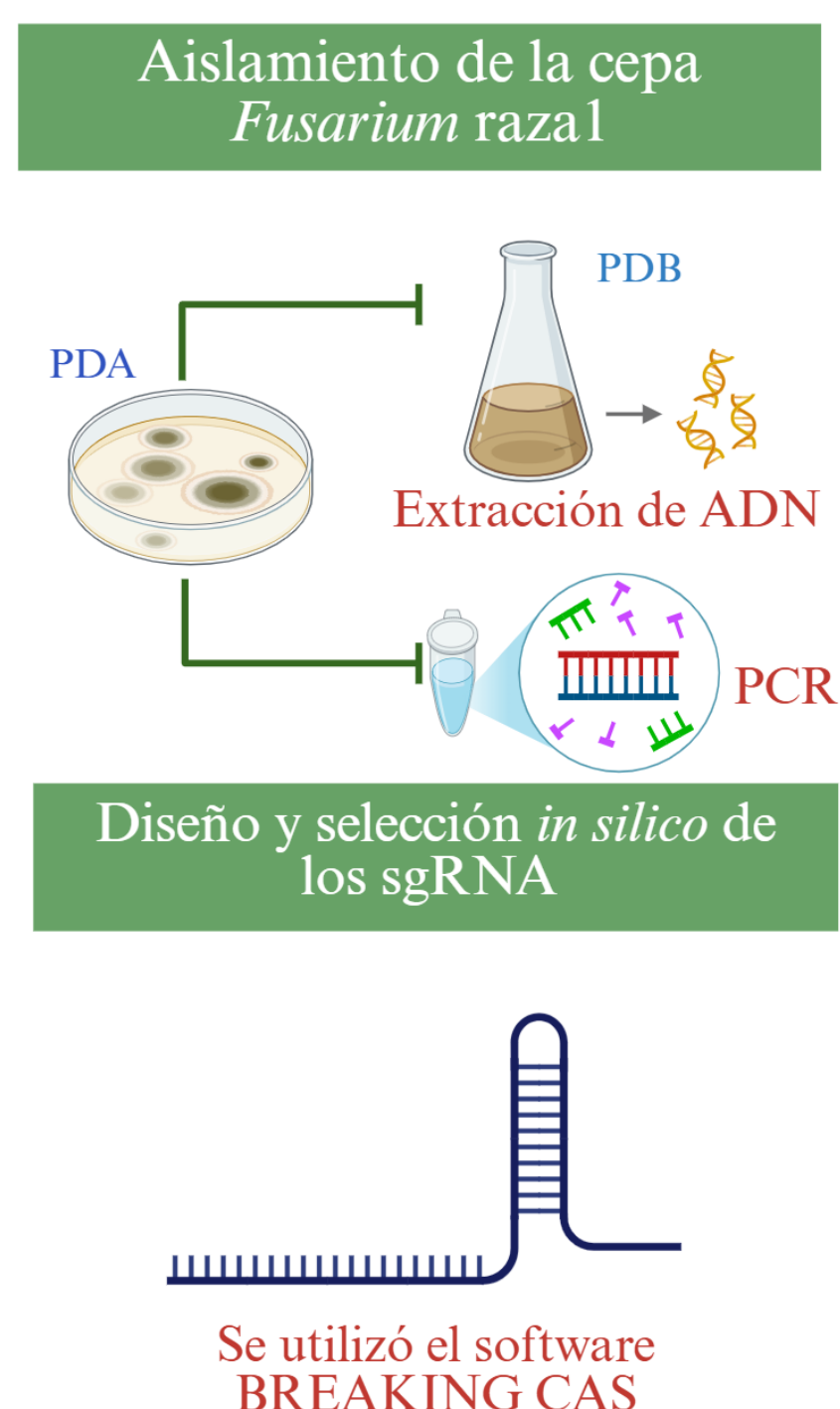
La marchitez por *Fusarium* causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) es una de las enfermedades más importantes del cultivo de banano a nivel mundial. Esta enfermedad, también conocida como "Mal de Panamá", es causada por un hongo del suelo que infecta las raíces y vasos conductores de la planta, provocando su marchitamiento y eventual muerte. Su persistencia y la falta de tratamientos eficaces hacen urgente el desarrollo de nuevas estrategias de manejo, incluyendo herramientas biotecnológicas como la edición génica para estudiar genes clave como SIX9, relacionados con la patogenicidad del hongo.

OBJETIVO GENERAL

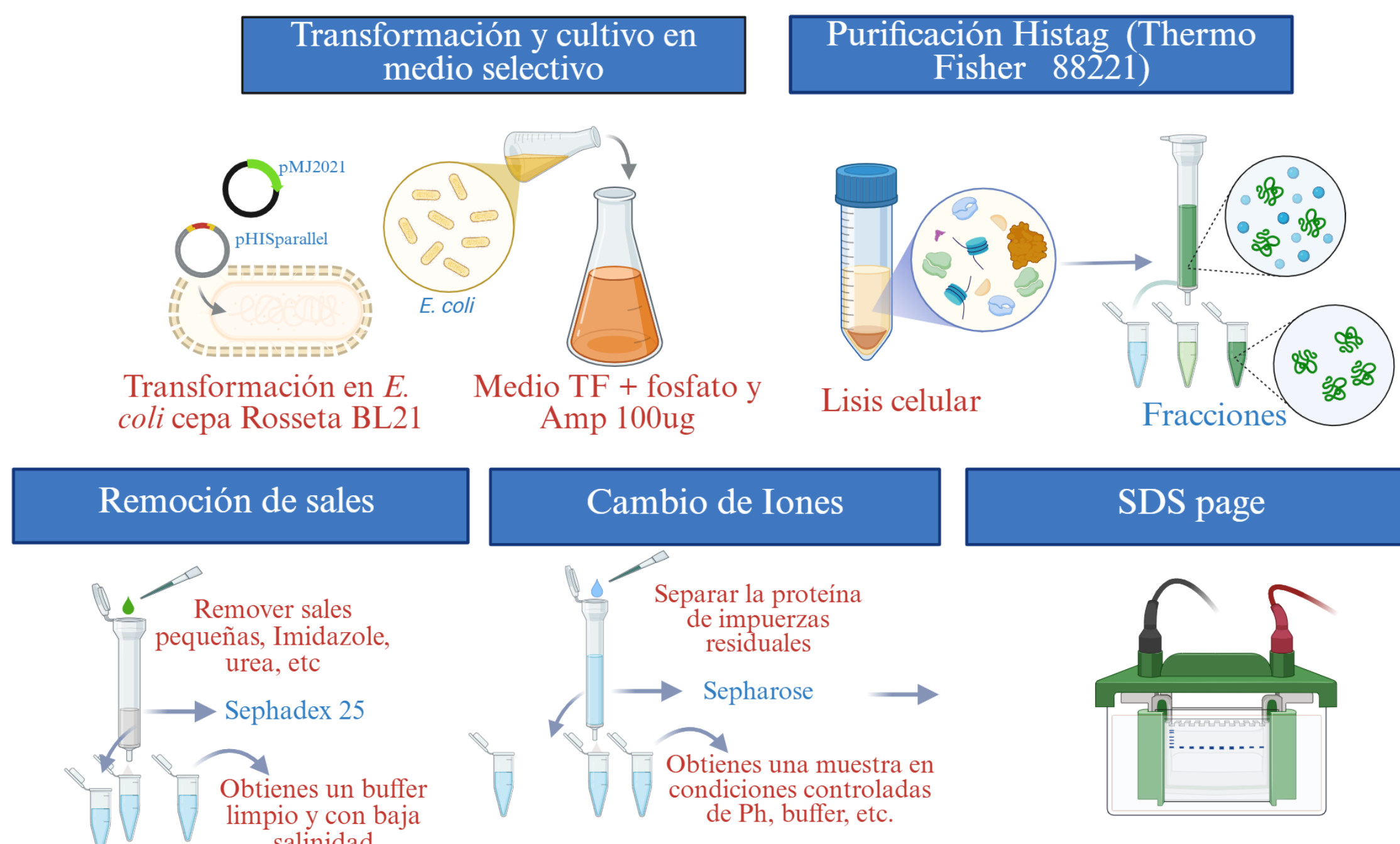
Optimizar un protocolo *in vitro* de edición génica mediante CRISPR-Cas9 para el gen SIX9 de Foc raza 1, evaluando la funcionalidad de la proteína Cas9 producida en CIBE – ESPOL.

METODOLOGÍA

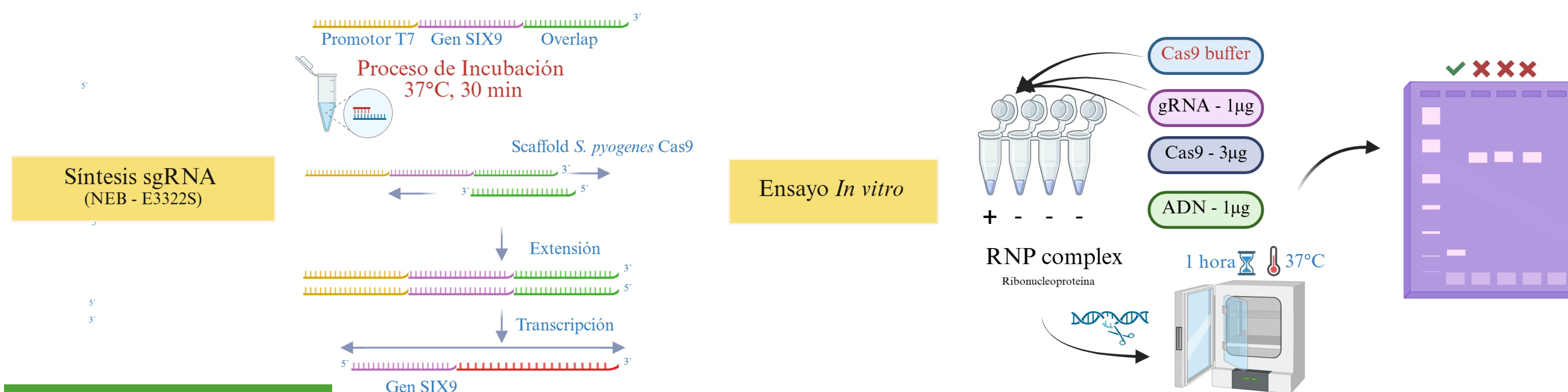
Obtención de ADN, diseño de guías y transformación



Transformación y purificación de la proteína Cas9



Ensayo *In vitro* para la edición del gen SIX9



RESULTADOS

Transformación de *E. coli* con plásmidos de interés



Purificación de Cas9

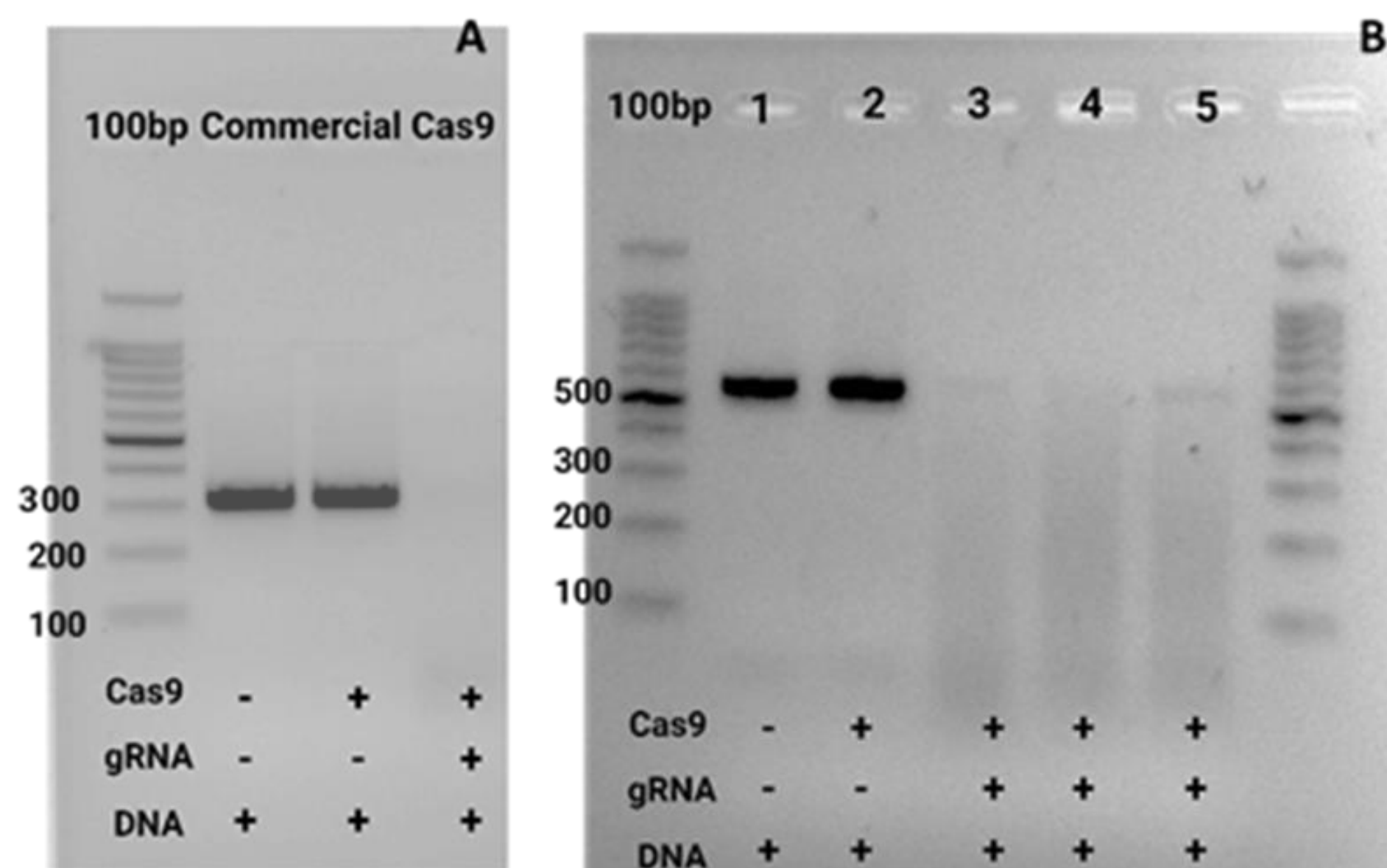


Lisado clarificado en columna HisPur™ Ni-NTA, elución final bajo luz normal, producto con plásmido pMJ922 (GFP) bajo luz UV.

CONCLUSIONES

- El protocolo desarrollado permite producir Cas9 recombinante funcional, ofreciendo una alternativa eficiente y económica para estudios de edición génica dirigida, como la validación *in vitro* del sistema CRISPR/Cas9 en formato RNP.
- El gen SIX9, asociado a la marchitez por *Fusarium* en banano, representa un objetivo clave; se proyectan estudios futuros *in vivo* mediante transformación con protoplastos para selección de líneas editadas.

Ensayo de edición *In vitro* Cas9-gRNA



(A) Marcador 100bp, Ensayo con controles negativos y el positivo usando las Cas9 comercial TrueCut Cas9 Protein v2. (B) Marcador 100bp, Negativos (pocillos 1 y 2) Cas9 comercial (pocillo 3) y Cas9 CIBE-ESPOL (pocillos 4 y 5).

