

## Descifrando la patogenicidad en el hongo causante de la Fusariosis del banano a través de la edición genética

\*Liliana Villao<sup>1</sup>; Jeffrey Vargas<sup>1</sup>; Nardy Diez<sup>1,2</sup>; Efrén Santos<sup>1,2</sup>; Freddy Magdama<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, Apartado Postal 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador. <sup>2</sup>Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, Apartado Postal 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

\*Autor de

Correspondencia:

Liliana Villao  
lilelvil@espol.edu.ec

Contribución:

Científica

Sección:

Biotecnología y ómicas

Recibido:

15 Diciembre, 2023

Aceptado:

15 Enero, 2024

Publicado:

16 Abril, 2024

Cita:

Villao L, Vargas J, Santos E  
y Magdama F. 2024.

Descifrando la  
patogenicidad en el hongo  
causante de la Fusariosis del  
banano a través de la  
edición genética. *Acorbat  
Revista de Tecnología y  
Ciencia* 1(1): 1  
[https://doi.org/10.62498.AR  
TC.2401](https://doi.org/10.62498.AR<br/>TC.2401)

### RESUMEN

Ecuador es uno de los principales exportadores de banano a nivel mundial, razón por la cual es vital demostrar las garantías necesarias en cuanto al manejo adecuado de esta fruta. *Fusarium* tropical raza 4 (TR4), amenaza con desaparecer los cultivares Cavendish, por lo que esta investigación se centró en realizar el diseño de 2 sgRNA en el primer exón de la secuencia target en estudio, perteneciente a la familia de los genes SIX (Secreted In Xylem) y provocar una delección *in vitro* en la secuencia a través de la tecnología CRISPR Cas9, ya que se presume dicho gen está directamente asociado a la virulencia de *Fusarium* y otros hongos fitopatógenos.

**Palabras clave:** mal de Panamá, *Fusarium oxysporum*, edición genética, CRISPR Cas9, Biotecnología.

### ABSTRACT

Ecuador is one of the main exporters of bananas worldwide, which is why it is crucial to demonstrate the necessary assurances regarding the proper handling of this fruit. *Fusarium* tropical race 4 (TR4) poses a threat to the disappearance of Cavendish cultivars. Therefore, this research focused on designing 2 sgRNA in the first exon of the target sequence under study, belonging to the SIX gene family (Secreted in Xylem), and inducing an *in vitro* deletion in the sequence through CRISPR Cas9 technology. This is because it is presumed that this gene is directly associated with the virulence of *Fusarium* and other phytopathogenic fungi.

**Keywords:** Panama disease, *Fusarium oxysporum*, gene editing, CRISPR Cas9, Biotechnology.



## INTRODUCCIÓN

### Estado actual del banano frente a TR4

El banano es una de las frutas con mayor demanda y producción a nivel mundial al cual enfrenta desafíos debido a la Fusariosis del banano, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc). La variedad Cavendish, que representa el 40% de la oferta global, ha sufrido pérdidas significativas, afectando a los principales países productores (FAO, 2019).

La enfermedad, que se ha expandido a Colombia, Perú y Venezuela, amenaza especialmente a Ecuador, uno de los mayores exportadores. *Fusarium oxysporum*, un hongo cosmopolita, infecta las plantas a través del sistema radicular, obstruyendo el sistema vascular y afectando procesos vitales como la fotosíntesis. Esta problemática plantea la necesidad urgente de estrategias genéticas para abordar la resistencia a la Fusariosis (López-Zapata y Castaño-Zapata, 2019).

Evidencia reciente demuestra que *F. oxysporum* ha evolucionado complejos mecanismos para superar la inmunidad en plantas a través de la secreción de proteínas llamadas efectores dentro de la célula de la planta y entre todos los genes SIX identificados en Foc, el gen SIX9 está presente en todos los genotipos conocidos (Carvalhais et al., 2019). Estos hallazgos motivan la consideración del gen SIX9 como un prometedor candidato para estudios de funcionalidad, con el objetivo de evaluar su papel durante la infección en bananos mediante enfoques genéticos.

En los últimos años, se ha desarrollado la tecnología de edición genética conocida como CRISPR-Cas9, que utiliza el sistema de inmunidad adaptativa de microorganismos para realizar cortes específicos en el ADN. Esta técnica es altamente compatible con diversas especies, tanto procariontas como eucariotas. La proteína Cas9, fundamental en este proceso, puede ser modificada con una señal de localización nuclear, formando un complejo ribonucleoproteico (RNP) con el ARN guía. A diferencia de otros sistemas, el RNP no requiere procesos de traducción o transcripción, reduciendo el riesgo de introducir ADN extraño o variaciones genéticas en las plantas regeneradas (Woo et al., 2015).

La edición de genomas mediante complejos de ribonucleoproteínas permite una rápida y eficiente modificación genética, siendo degradada rápidamente por proteasas celulares tras la transfección (Sant'Ana et al., 2020). Por lo que, utilizando la tecnología de edición genética, el objetivo es encontrar genes de resistencia en accesiones silvestres de banano, ya que mejorarlos mediante cruce convencional es difícil debido

a su ploidía y baja fertilidad. Se busca determinar si los genes efectores, como los relacionados con Foc, confieren patogenicidad para mejorar los esfuerzos de mejoramiento.

En última instancia, la meta es lograr el mejoramiento genético de variedades como Cavendish o variedades resistentes, así como la edición directa del microorganismo causante de la Fusariosis, como una alternativa eficiente a largo plazo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de cepas de *Fusarium oxysporum* raza 1

Para los ensayos de edición se utilizaron las cepas EC44-M-GM1 y O-1968, ambas caracterizadas como Foc (raza 1) y conservadas en el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

### Diseño *in silico* y síntesis del sgRNA

El sgRNA se diseñó utilizando el software Breaking-Cas (Juan C. Oliveros, n.d.), para lo cual se tomaron varios detalles en cuenta entre ellos la similitud del protoespaciador y la secuencia PAM en base al genoma de *Fusarium oxysporum*, para evitar cortes en otros locis y posibles efectos off-target, además se trató que el sitio de corte del sgRNA sea cercano a la región 5' mismo que codifica al gen de interés SIX9, el sgRNA está compuesto de 20 nucleótidos más la secuencia PAM (NGG), es decir en la región 5' se agregó la secuencia del promotor T7 (TTCTAATACGACTCACTATA) y al final de la región 3' una secuencia de solapamiento compuesta por 14 nucleótidos (GTTTTAGAGCTAGA).

Para el proceso de síntesis del sgRNA se utilizó el kit de EnGen® sgRNA Synthesis *S. pyogenes* kit (New England Biolabs #E3322). La reacción fue llevada a incubación durante 30 minutos a 37 °C, transcurrido este periodo se transfirieron las muestras al hielo. Adicionalmente se realizó un tratamiento con DNasas añadiendo 30 µL de agua ultrapura y 2 µL de Dnase I, se incubó la reacción durante 15 minutos más a 37 °C, al finalizar las muestras fueron analizadas mediante un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X.

### Purificación de la proteína CAS9

Para este estudio, se empleó el plásmido pHis-parallel1-NLSHBCas9 (9761 pb) de Addgene, que contiene una señal de localización nuclear (NLS) de la histona H2B

de *Fusarium oxysporum* fusionada a el promotor y terminador T7, en la cepa de *E. coli* Dh5alpha.

El vector se cultivó en medio LB sólido con ampicilina (100 µg/mL) a 37°C durante 24 horas, y la presencia del gen de interés se confirmó mediante PCR con cebadores específicos. Para lograr una alta concentración de la proteína Cas9, se diluyó el medio LB líquido 1:100, y se indujo con IPTG (0.3 mM) cuando la densidad óptica alcanzó aproximadamente 0.6 Unidades. Tras 5 horas de incubación a temperatura ambiente y 160 rpm, se evaluó la expresión mediante SDS-PAGE. La purificación de la proteína se llevó a cabo utilizando cartuchos cromatográficos HisPur™ Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific, 88221), seguida de dialización y centrifugación para eliminar las proteínas no asociadas. Este proceso garantizó la obtención de una preparación purificada de la proteína Cas9, lista para su implementación en estudios de edición genética y otras aplicaciones científicas relacionadas.

### **Producción de protoplastos de *Fusarium oxysporum***

Para generar protoplastos, se inoculó medio líquido PDB con aproximadamente  $1 \times 10^7$  conidios de *Fusarium*, incubándolos a 28 °C y 160 rpm durante la noche. Tras la germinación, las esporas se recolectaron y se trataron con Driselasa (10mg/mL) en NaCl 0.7M para degradar la pared celular durante 3 horas. La suspensión se incubó a temperatura ambiente durante dos horas en un agitador rotatorio, los protoplastos obtenidos se filtraron con una malla de nylon de 40 µm. Tras dos lavados en la suspensión SuTC, los protoplastos se diluyeron en el buffer estabilizador SuTC a  $2 \times 10^7$ /mL. Para cada experimento de transformación, se utilizaron 200 mL de la solución de protoplastos (Liu and Friesen, 2012).

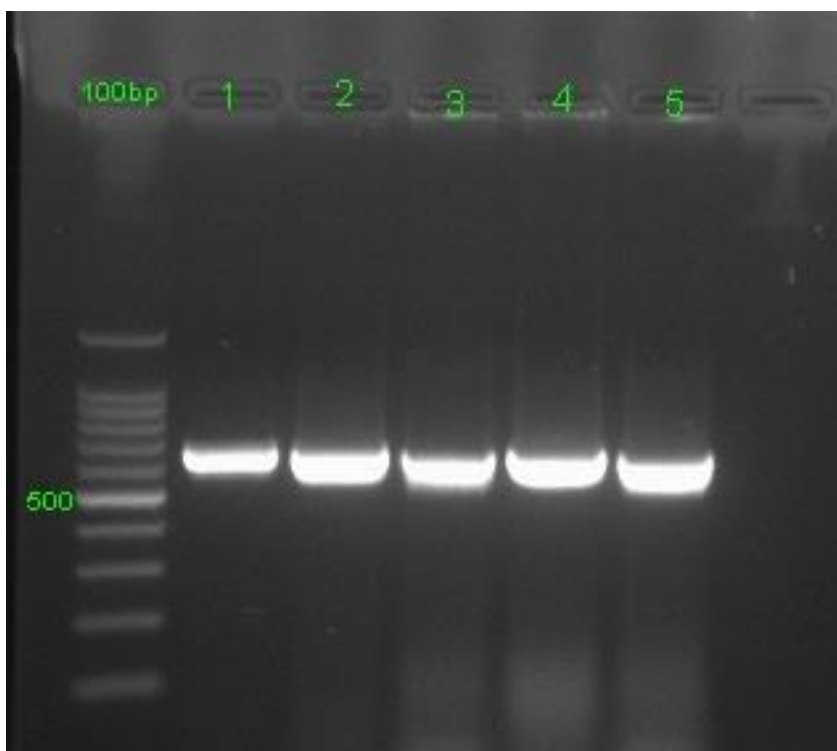
### **Transformación fúngica mediada por PEG**

Se preparó simultáneamente la proteína CAS9 y el ARN guía (sgRNA) en una relación molar 1:1, totalizando 50 µL, con solución tampón nucleasa Cas9 10x y agua tratada con DEPC. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Para la transformación, se combinaron 200 µL de protoplastos con 50 µL de Cas9 RNPs (donante) o ADN, más un volumen igual de PEG al 60%, incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos. El producto se transfirió a un tubo con medio selectivo TB3 y se agitó a 160 rpm a temperatura ambiente durante 24 horas. Los protoplastos regenerados se mezclaron con medio selectivo y se transfirieron a placas Petri estériles para secuenciación posterior.

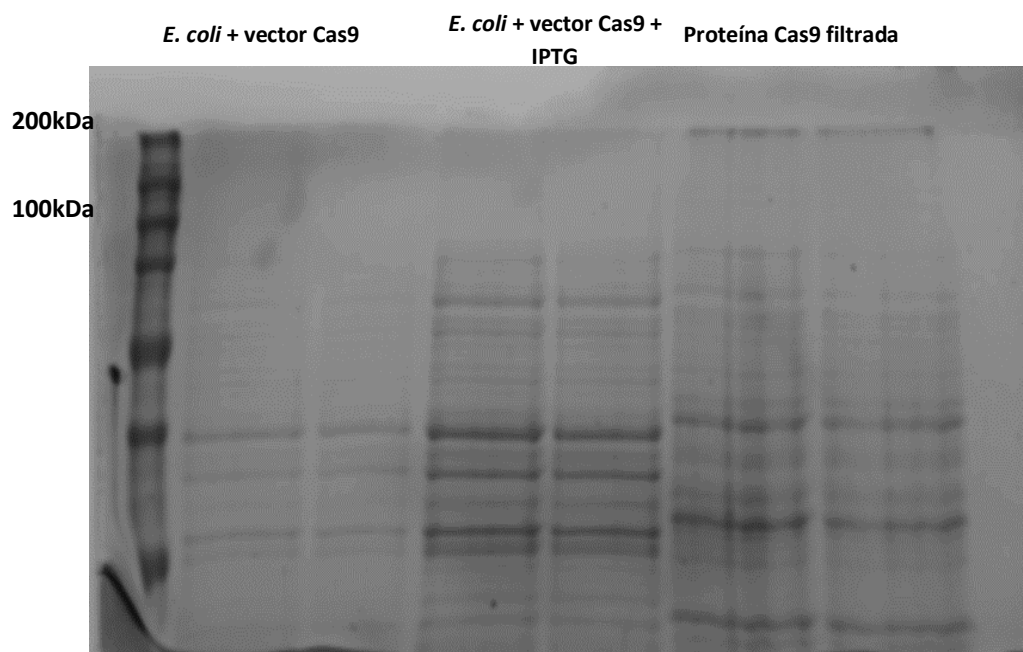
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Purificación de la proteína Cas9

El plásmido de expresión Phis-parallel1-NLSH2BCas9 se clonó en la cepa BL21 Rosetta de *E. coli* (Figura1) para la expresión y purificación de la proteína Cas9. La proteína resultante de la purificación tenía un tamaño aproximado de 165kDa (Figura 2).



**Figura 1.** Resultado obtenido de la PCR de colonias *E. coli* para confirmar la presencia de la región Cas9 en un gel de agarosa en medio TAE 1X al 1.2%, para lo cual se utilizaron cebadores específicos del gen de interés y un marcador de peso molecular 100bp, las bandas corresponden al amplicón esperado de 652bp.

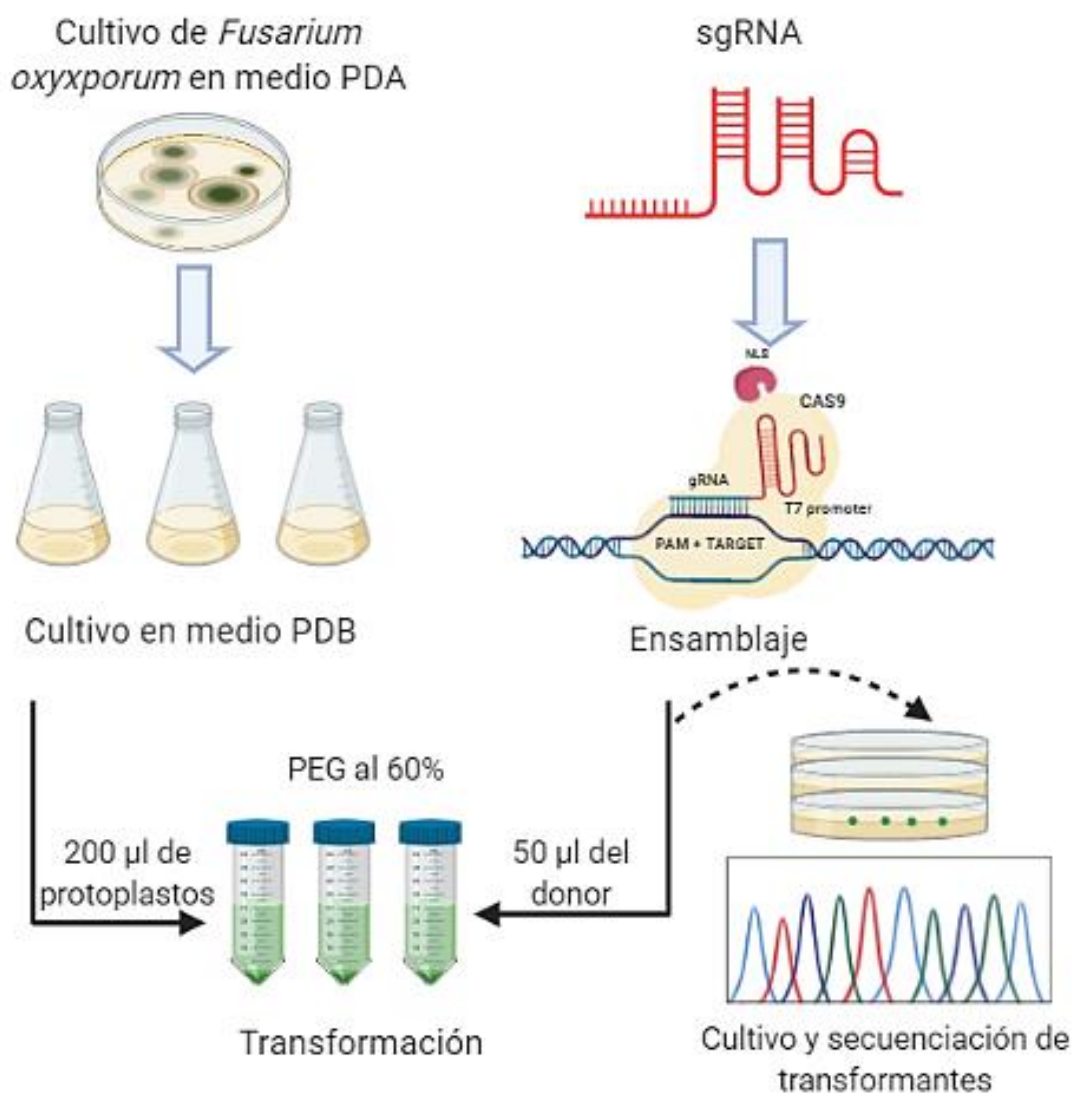


**Figura 2.** Gel SDS page 5 mL 12% con las muestras del vector Cas 9 (pocillo 2-3) vector cas9 con IPTG (4-5) proteína Cas9 filtrada, colocadas por duplicado con 15 $\mu$ L de muestra más el buffer de carga.

### **Transformación de protoplastos mediada por PEG**

El ARN guía generado por medio del software Breaking Cas, estaba dirigido a la región cercana 5' del gen de interés (efector SIX9), con el fin de realizar un bloqueo de esta región y validar la eficacia de la técnica, así como conocer el posible funcionamiento de este efector a partir de protoplastos de *Fusarium oxysporum* raza 1 (Figura 3).





**Figura 3.** Esquema de la transformación con protoplastos mediadas por PEG dirigida por CAS9-RPN, para lo cual se realizó un cultivo de las muestras de *Fusarium* en medio PDB, de las cuales se utilizaron 200 µL con PEG al 60% y 50 µL del donador (Cas9 ensamblada).

### CONCLUSIONES

Las ribonucleoproteínas (RNP) de CRISPR han demostrado ser una estrategia altamente eficaz para la mutagénesis dirigida en protoplastos. Este método exhibe ventajas significativas sobre la edición del genoma mediante plásmidos, mostrando

mayor eficiencia, reducción considerable de efectos fuera del objetivo y una velocidad de edición más rápida en diversos microorganismos.

Un beneficio adicional es su potencial cumplimiento con regulaciones sobre organismos genéticamente modificados (OGM), ya que los complejos ARN guía-proteína Cas9 se desintegran rápidamente en cultivos celulares en regeneración o mediante la segregación. Se necesitan más investigaciones para optimizar el genotipado de microorganismos editados, sin ADN residual, y llevar estas aplicaciones al ámbito agrícola.

## REFERENCIAS

1. Carvalhais, L.C., Henderson, J., Rincon-Florez, V.A., O'Dwyer, C., Czislawski, E., Aitken, E.A.B., Drenth, A., 2019. Molecular Diagnostics of Banana Fusarium Wilt Targeting Secreted-in-Xylem Genes. *Front Plant Sci* 10, 547. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00547>
2. FAO, 2019. Analisis Del Mercado Del Banano 1–13.
3. Juan C. Oliveros, M.F.D.T.-M.D.S.-L.L.M.P.C. and F.P., n.d. Breaking-Cas: off-targets-free gRNAs for CRISPR/Cas technology [WWW Document]. URL [https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/?gset=4x2\\_GENOMES\\_EnsemblGenomes\\_47](https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/?gset=4x2_GENOMES_EnsemblGenomes_47) (accessed 8.1.20).
4. Liu, Z., Friesen, T.L., 2012. Polyethylene glycol (PEG)-Mediated transformation in filamentous fungal pathogens. *Methods in Molecular Biology* 835, 365–375. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_21)
5. López-Zapata, S.P., Castaño-Zapata, J., 2019. Manejo integrado del mal de Panamá [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. sp. *cubense* (E.F. SM.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1240>
6. Sant'Ana, R.R.A., Caprestano, C.A., Nodari, R.O., Agapito-Tenfen, S.Z., 2020. PEG-Delivered CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins System for Gene-Editing Screening of Maize Protoplasts. *Genes (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/genes11091029>
7. Woo, J.W., Kim, J., Kwon, S. Il, Corvalán, C., Cho, S.W., Kim, H., Kim, S.G., Kim, S.T., Choe, S., Kim, J.S., 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology* 33, 1162–1164. <https://doi.org/10.1038/nbt.3389>