



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



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

**PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“Desarrollo de un nanosensor para la detección del agente causal de la agalla de corona
(*Agrobacterium tumefaciens*) en plantas de rosa (*Rosa spp.*)”**

Elaborado por
Garrido Rivera, Sofía

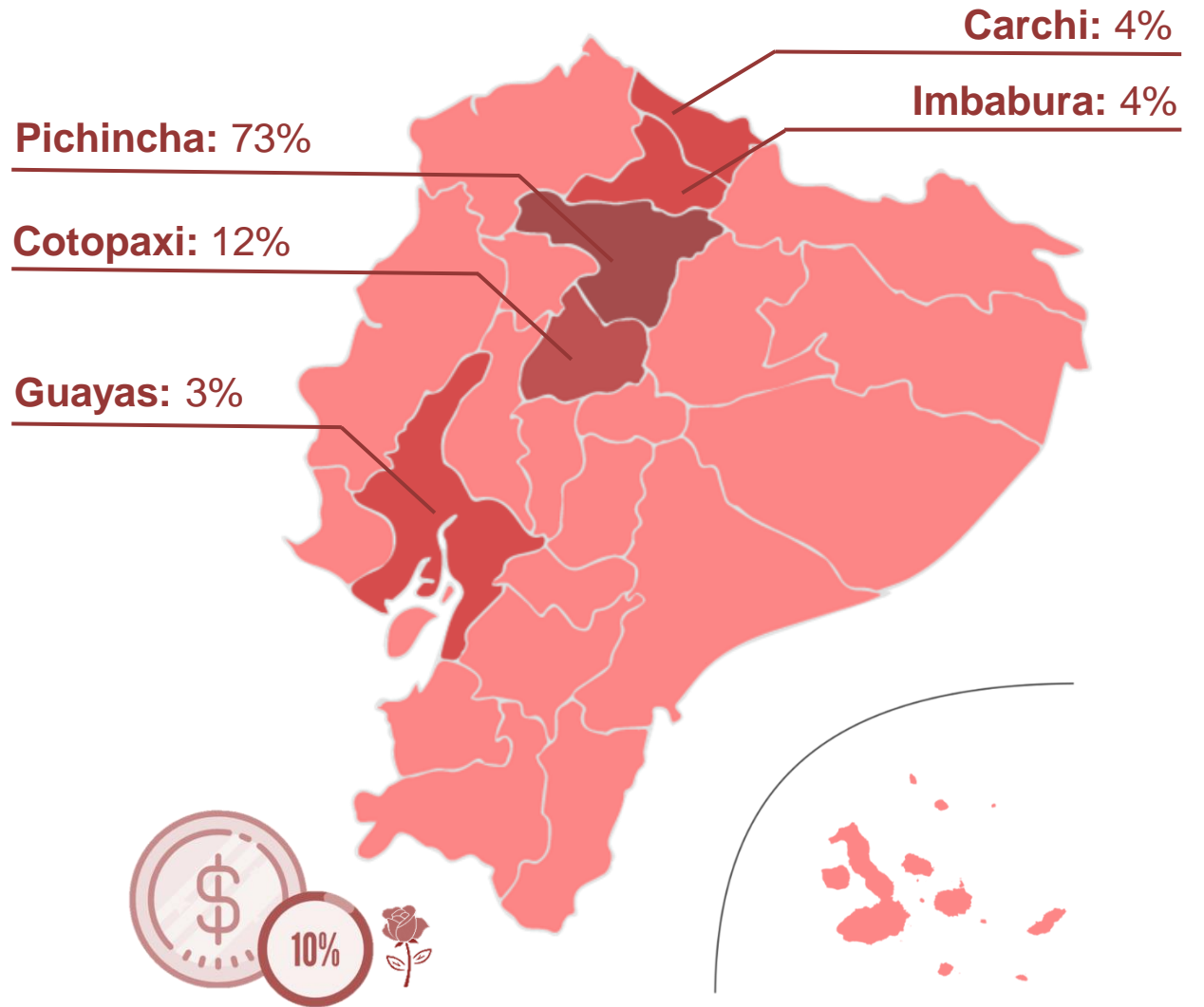
Director del proyecto
Ph.D. Francisco Javier Flores Flor.

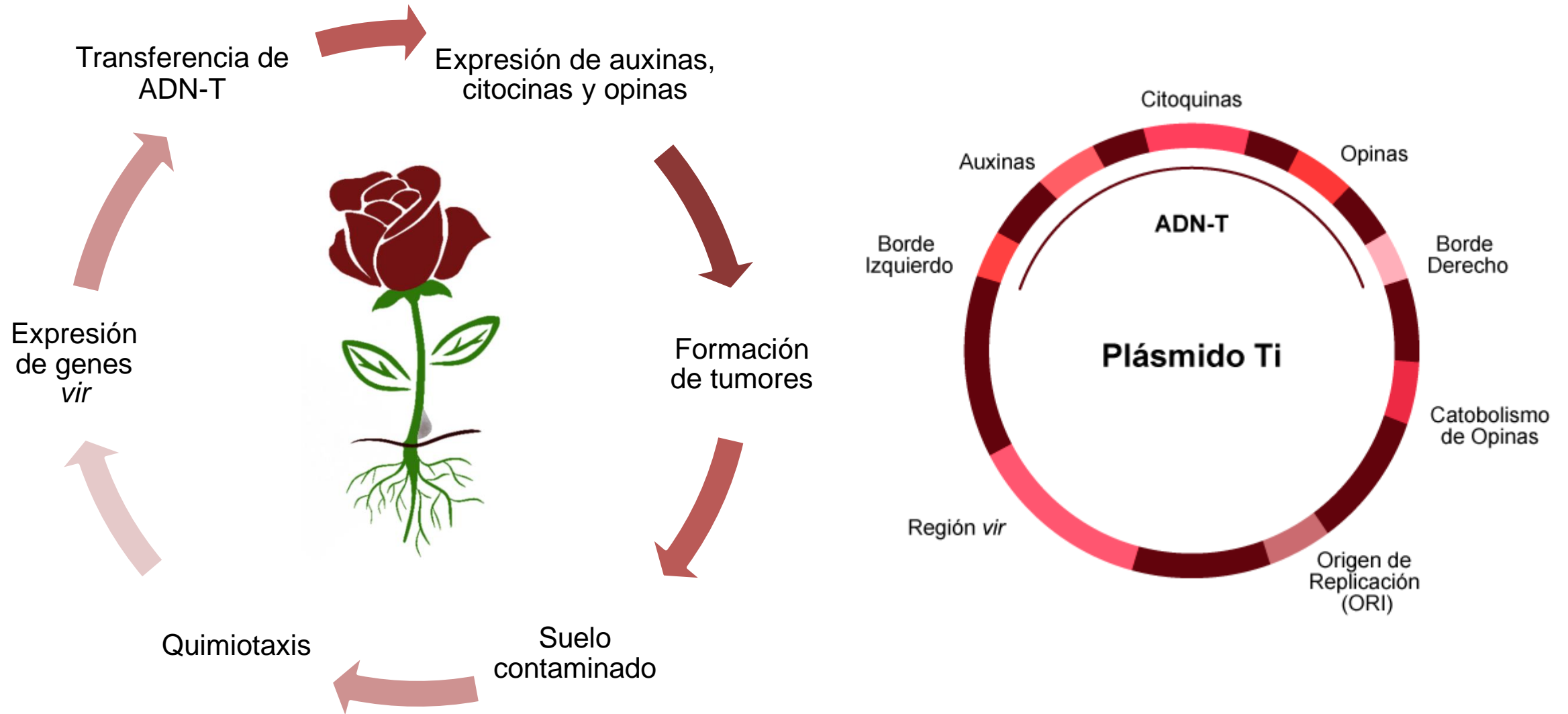
Sangolquí - 2022.

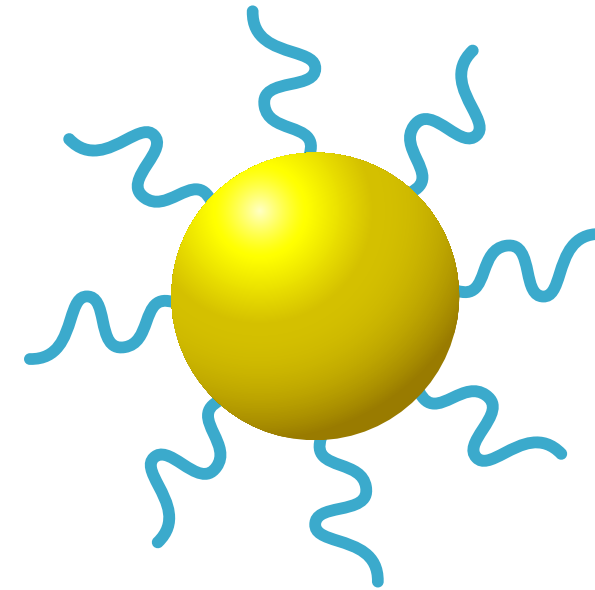
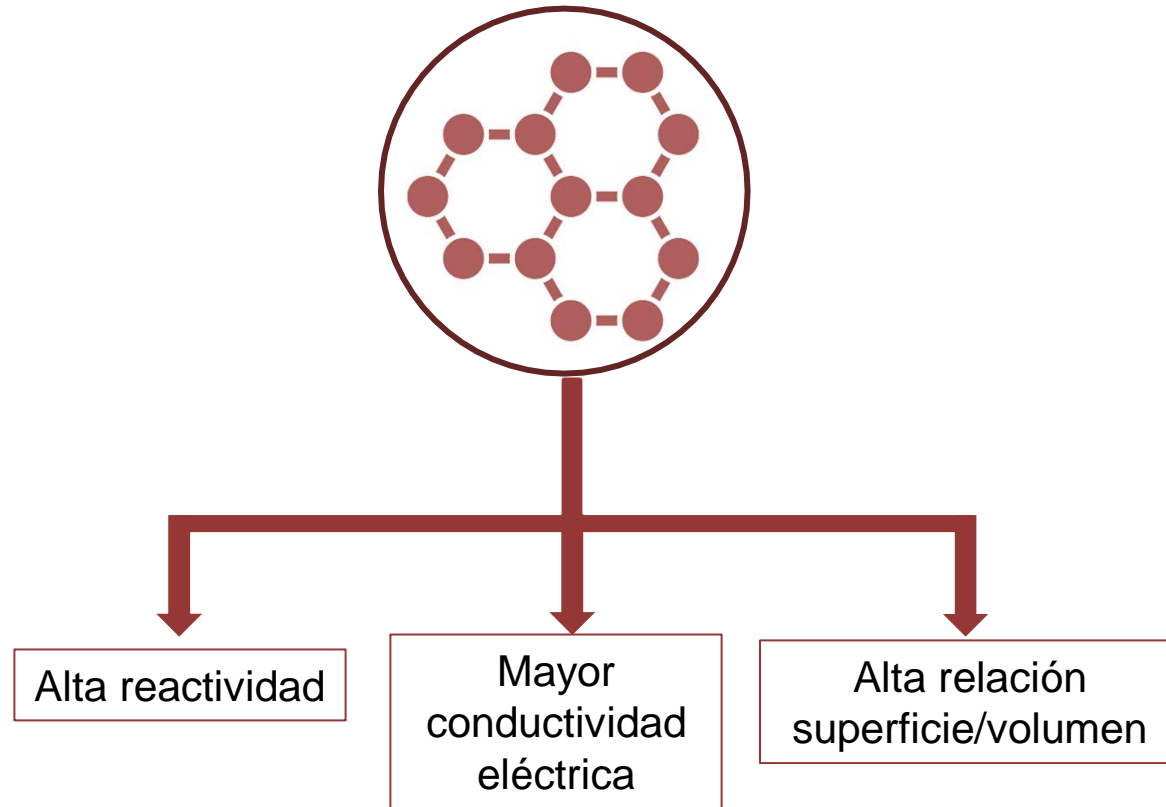
VERSIÓN: 1.0











Au-NP funcionalizadas

Objetivo General



Desarrollar un nanosensor para la detección del agente causal de la agalla de corona (*Agrobacterium tumefaciens*) en plantas de rosa (*Rosa* spp.).

Objetivos específicos



Obtener un control positivo de ADN sintético.

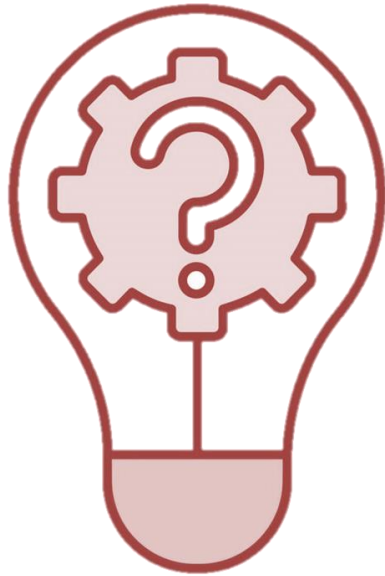


Sintetizar nanopartículas de oro funcionalizadas para la detección de *Agrobacterium tumefaciens*.



Estandarizar el método de detección de *Agrobacterium tumefaciens* con nanopartículas funcionalizadas.





El desarrollo del nanosensor funcionalizado con un oligonucleótido específico detecta en forma estadísticamente significativa a *Agrobacterium tumefaciens*.



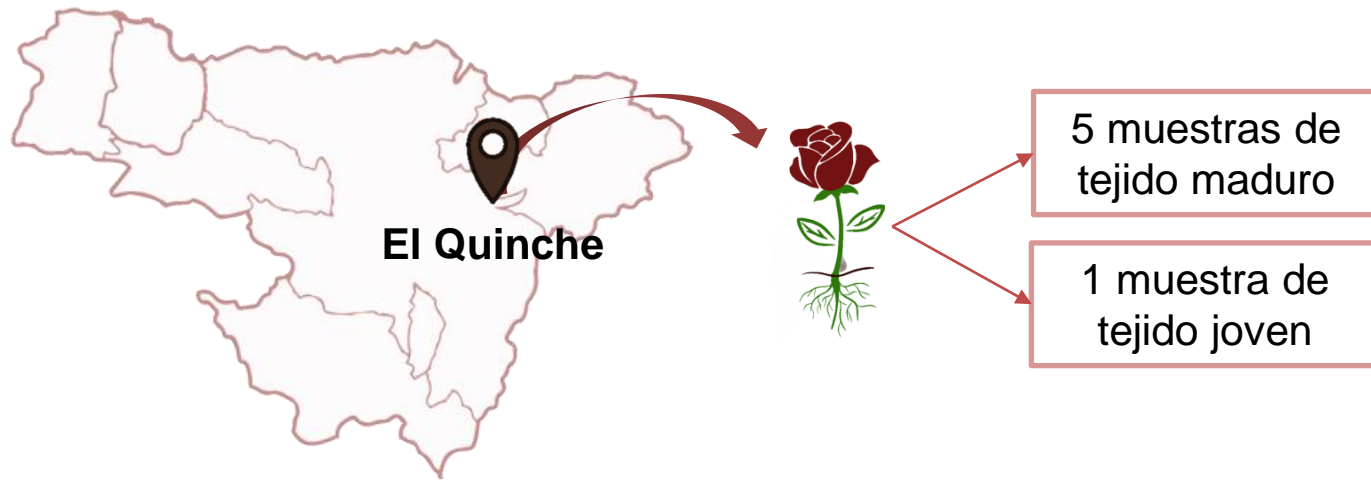
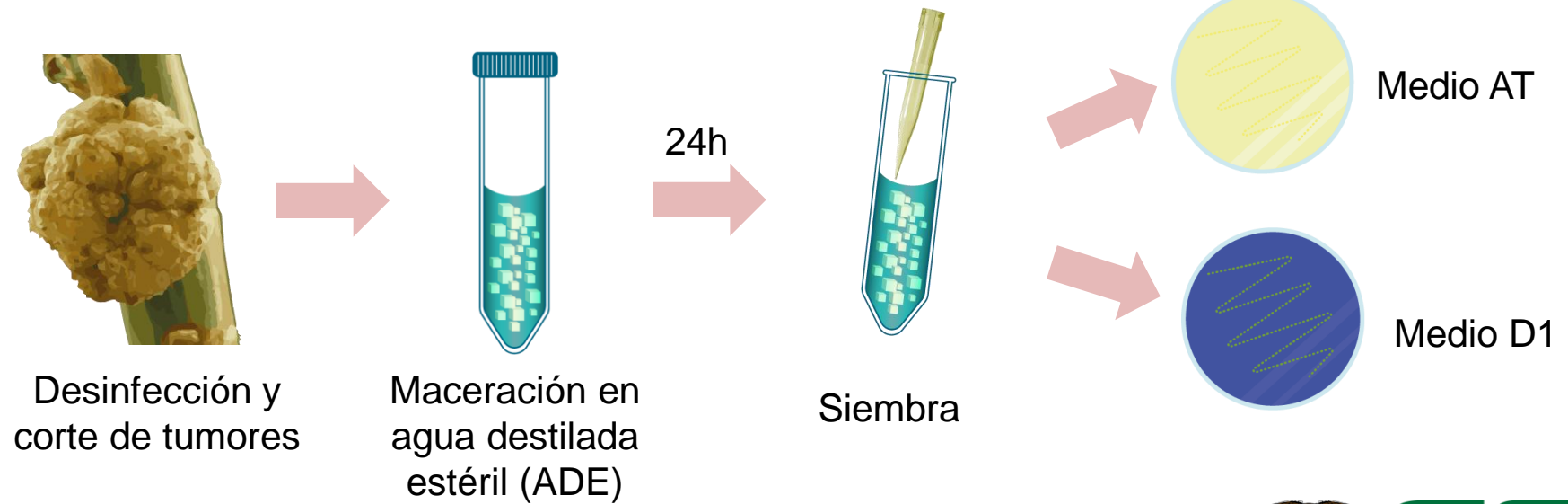
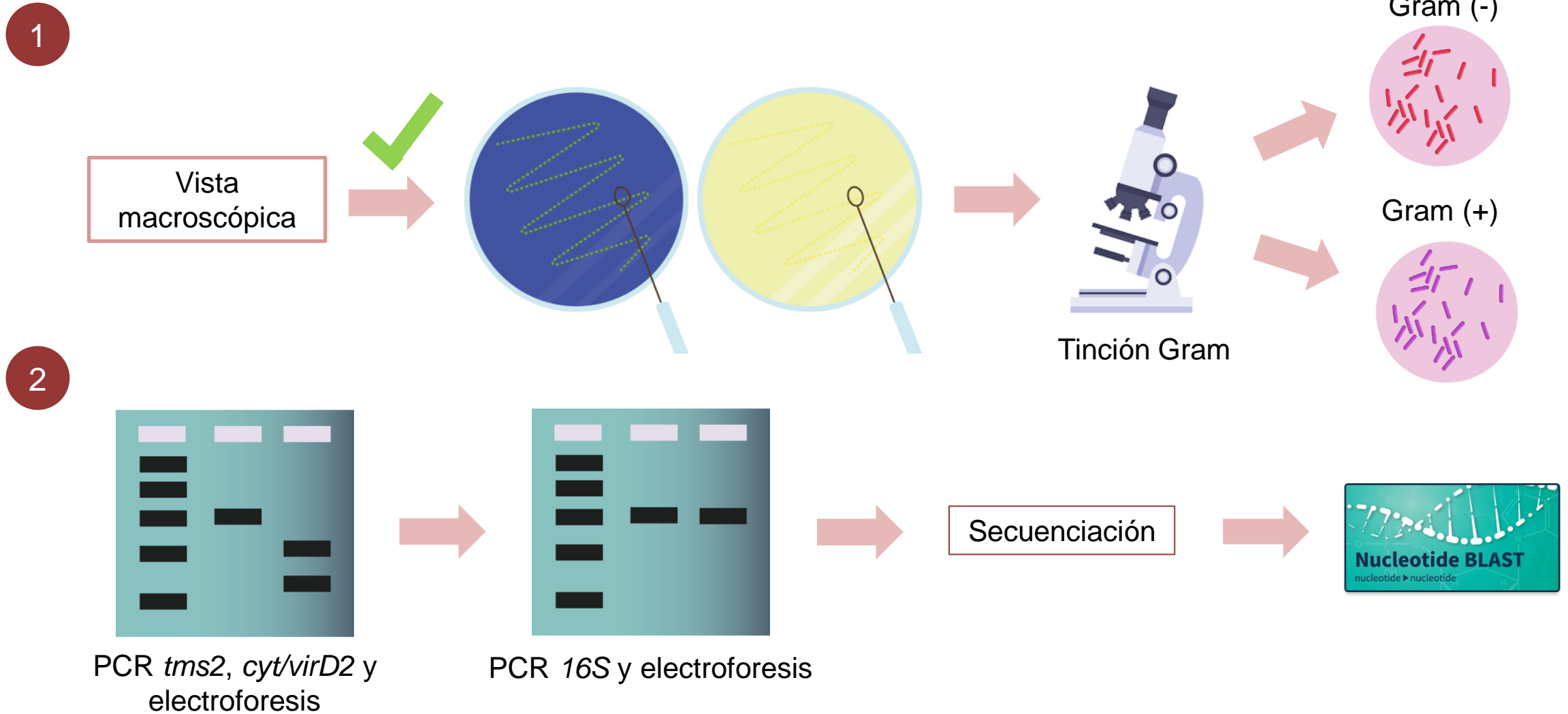
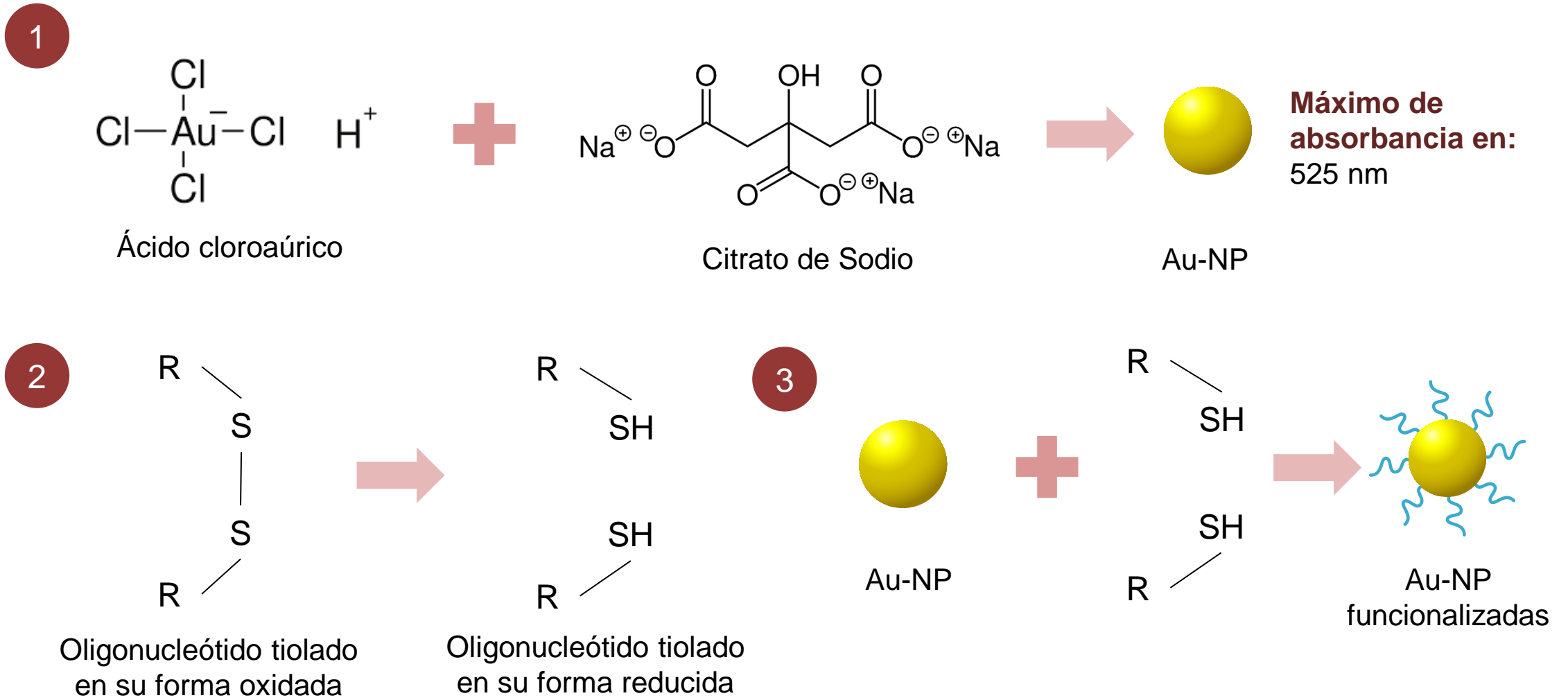
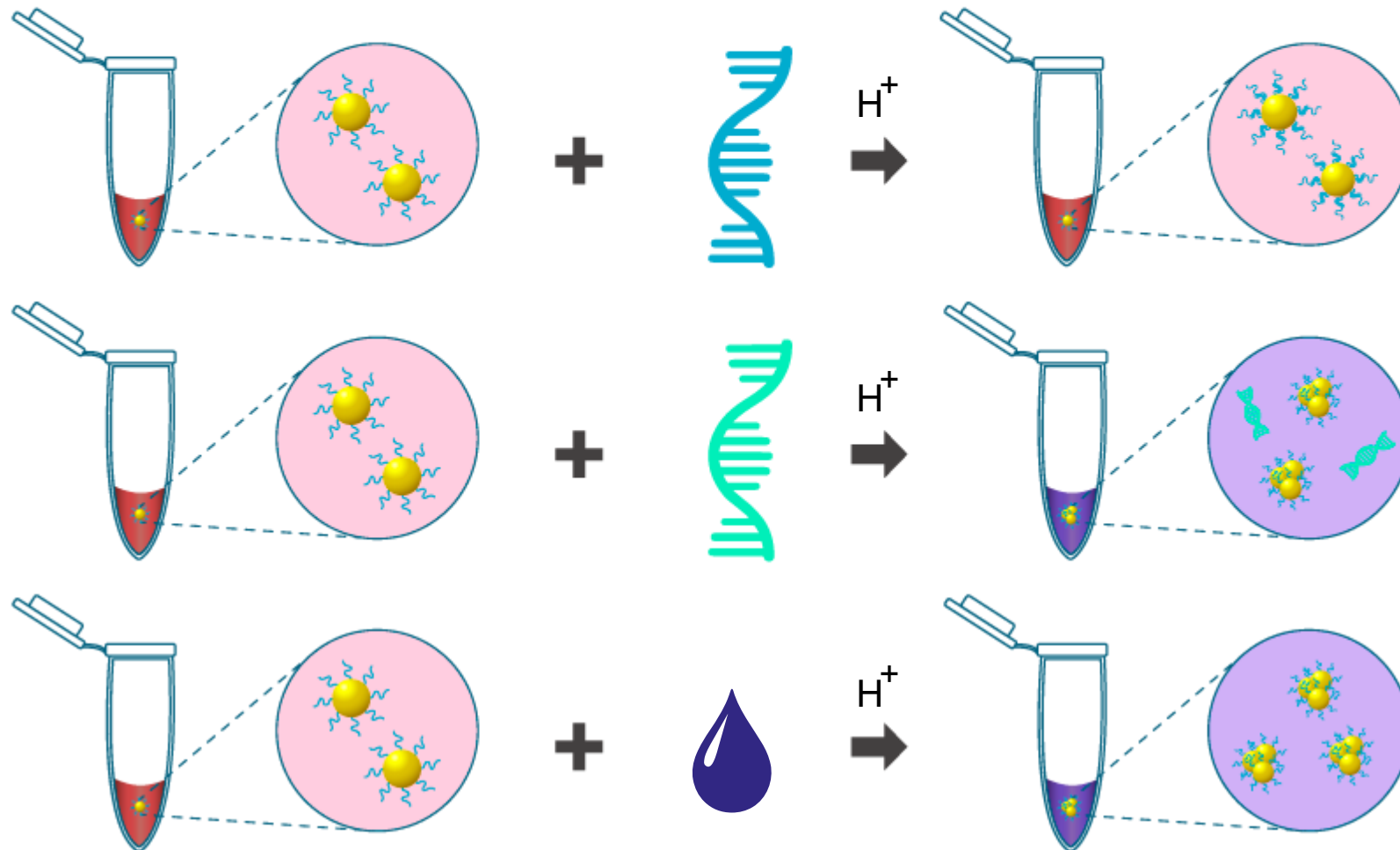


Figura 1. Fotografías tomadas a partir de tejido sintomático









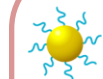
Concentraciones de ADN
25, 50, 100 y 200 ng/μL



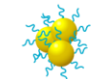
Tiempo
0, 10 y 25 minutos



$Cut - off = \bar{X}_b + 2\sigma$



Au-NP



Au-NP >20 nm



ssADN CPS



dsADN CN



ssADN CN



Agua DEPC

Figura 2. Aislados bacterianos en medio AT. (A) S1T1 y (B) S2T2

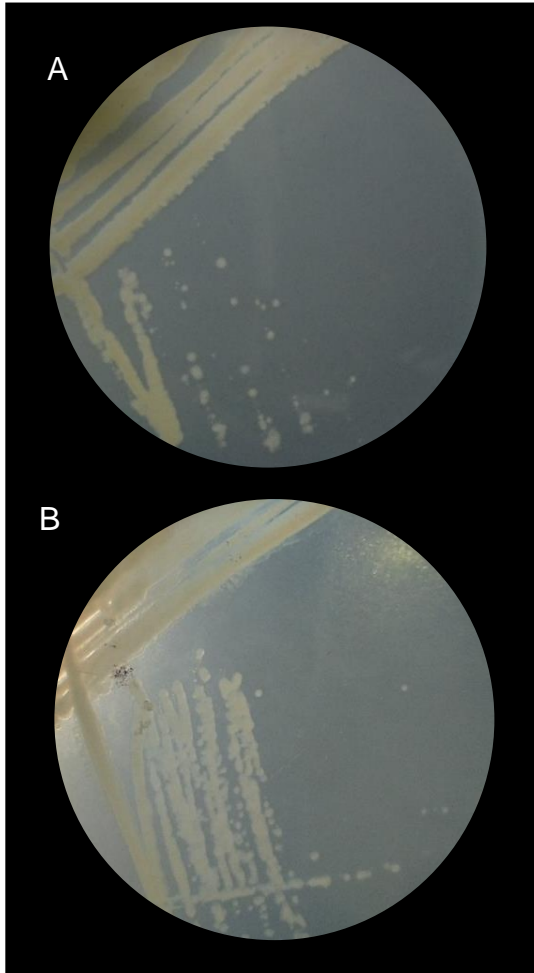


Figura 3. Tinción Gram de los aislados. Bacilos (A) S1T1 y (B) S2T2

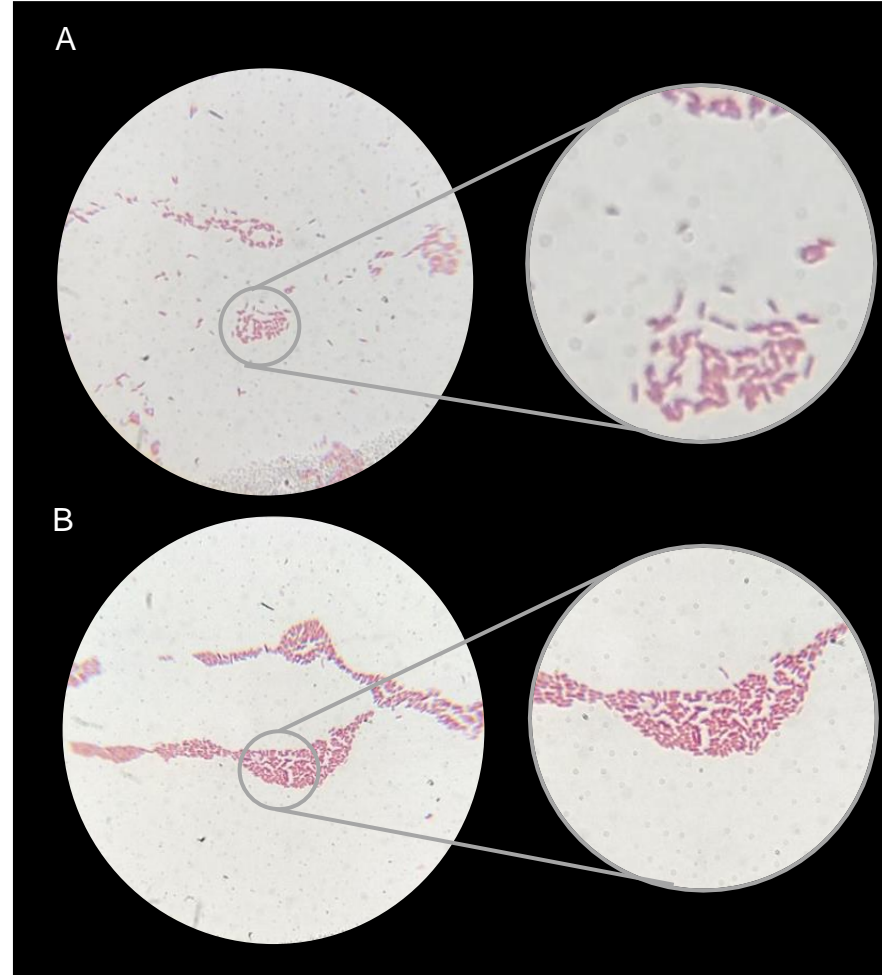
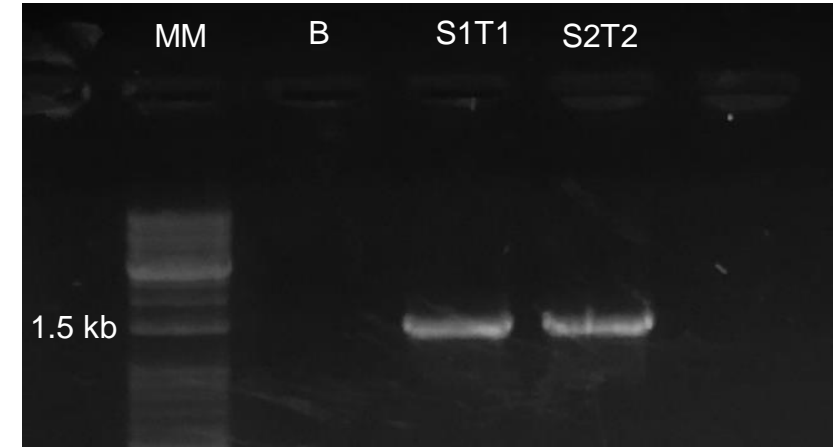


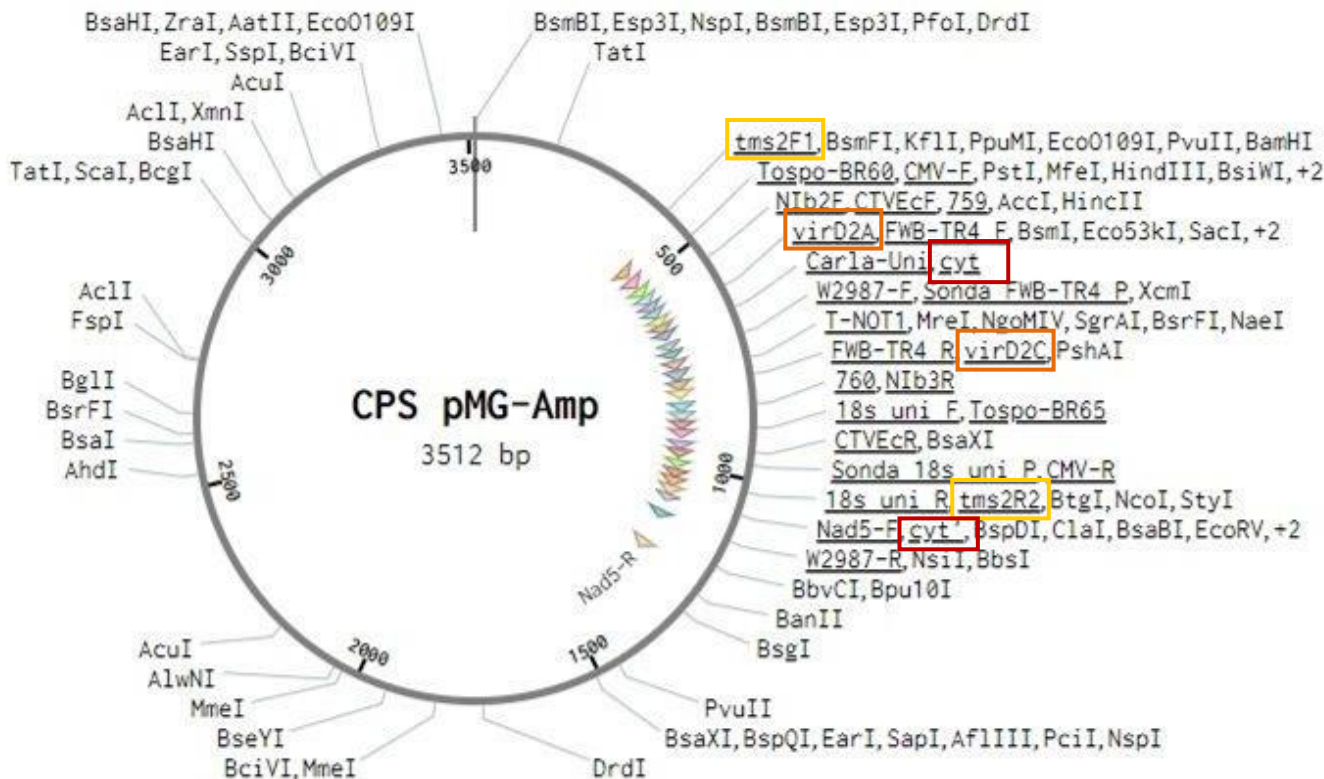
Figura 4. PCR 16S



Pseudomonas sp.



Figura 5. Representación gráfica del plásmido CPS pMG-Amp y PCR *in silico*. Por colores se diferencian los conjuntos de cebadores para cada gen; amarillo para *tms2*, naranja para *virD2* y rojo para *ipt*. (A) (A) *tms2F1/tms2R2*, (B) *cyt/cyt'* y (C) *virD2A/virD2C*



Porcentaje de CG

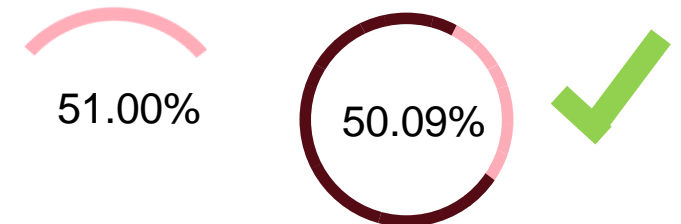


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplicones obtenidos a partir de la PCR de colonias del CPS

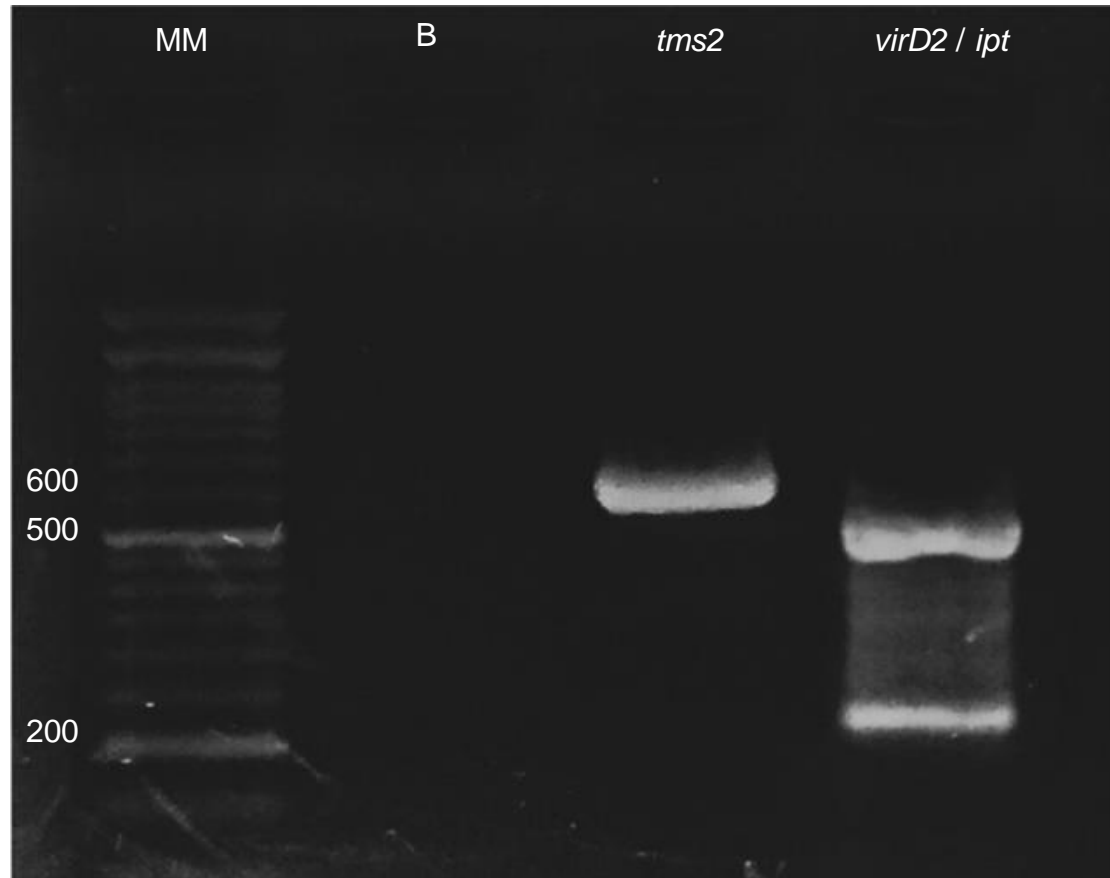


Figura 7. Bacterias transformadas luego de 48h de cultivo



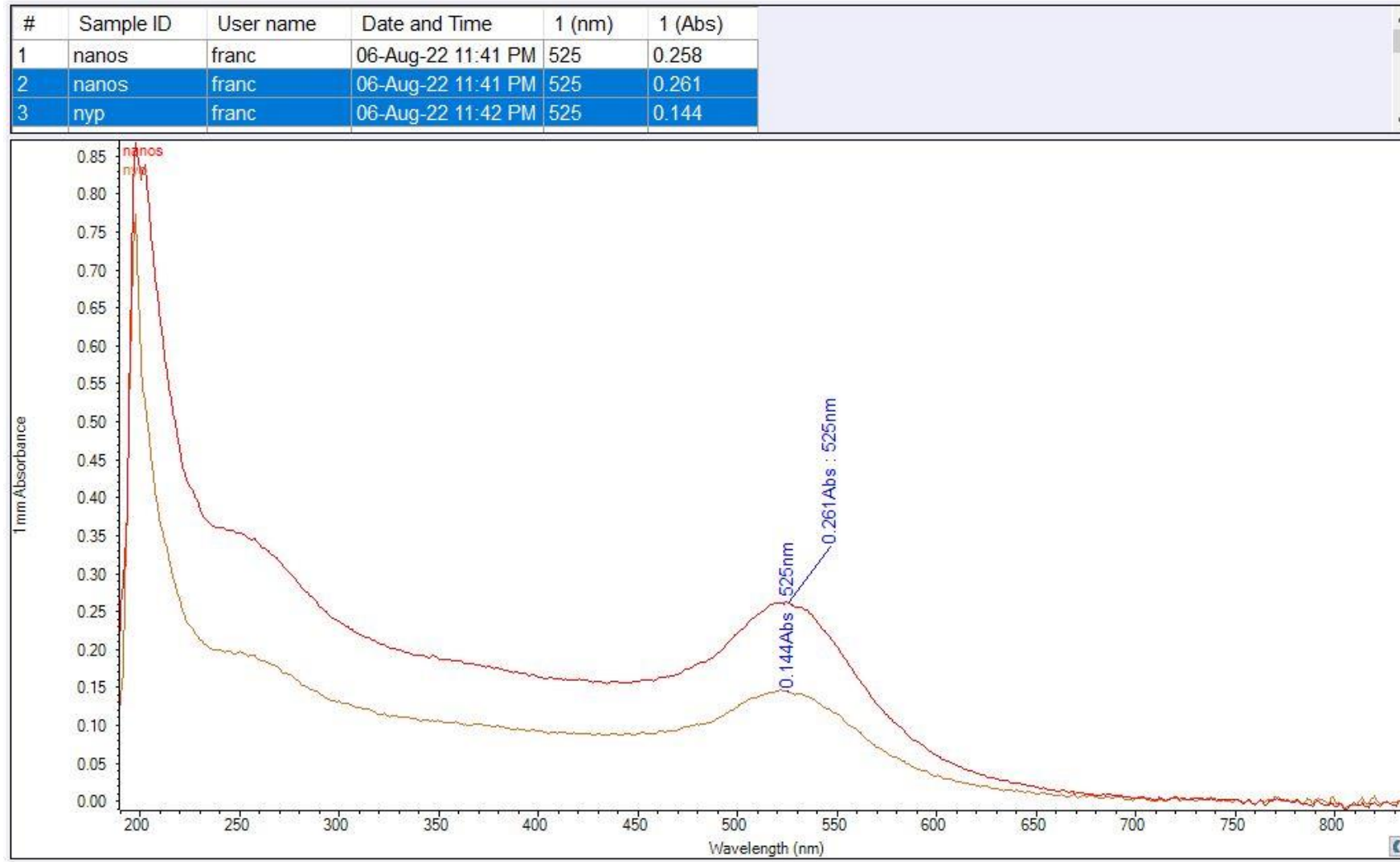
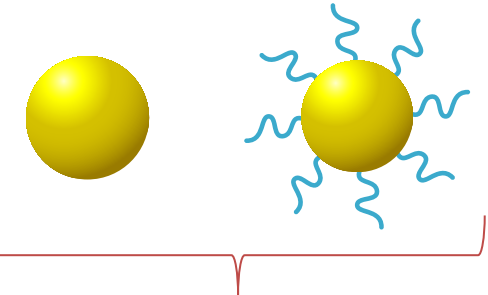


Figura 8. Espectrofotometría de Au-NP funcionalizadas.

- Au-NP funcionalizadas
- Au-NP funcionalizadas y diluidas en PBS y agua DEPC



Máximo de absorbancia en:
525 nm

- Au-NP
- Au-NP funcionalizadas



Figura 8. Hibridación de las Au-NP con ADN a concentración de 25 ng/μL luego de 25 minutos

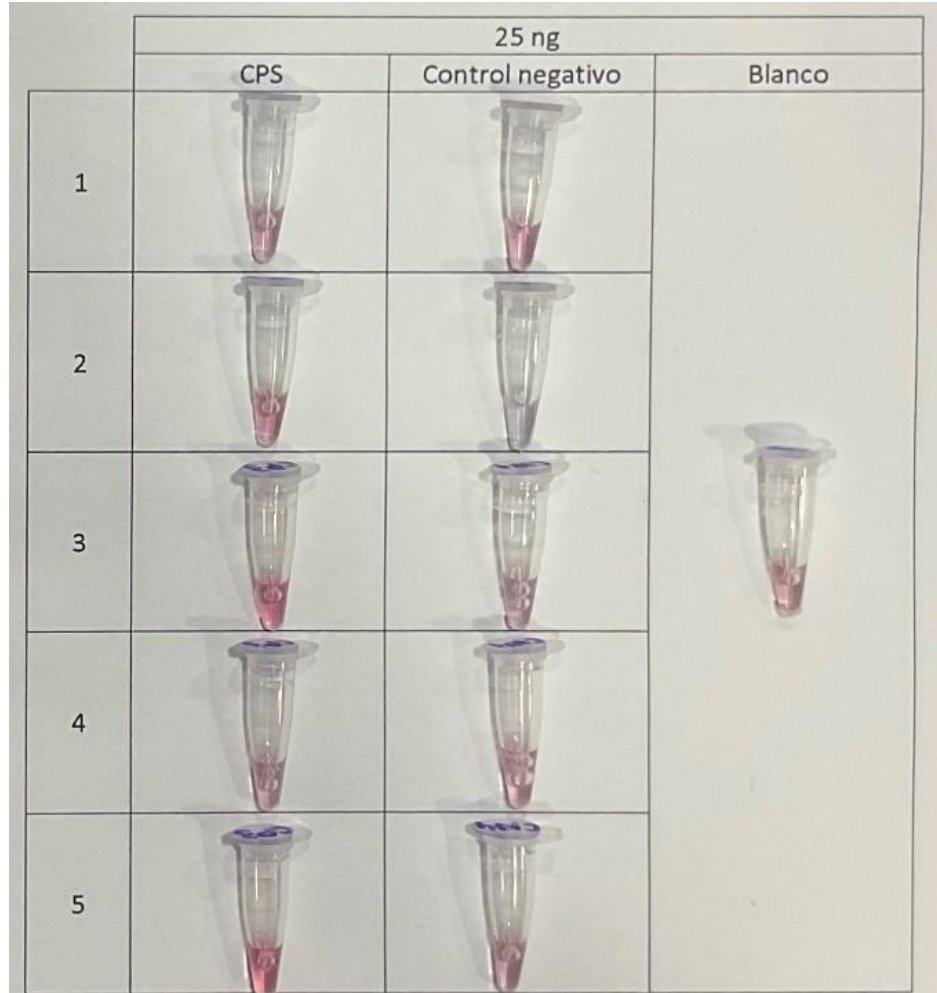


Figura 9. Hibridación de las Au-NP con ADN a concentración de 50 ng/μL luego de 25 minutos

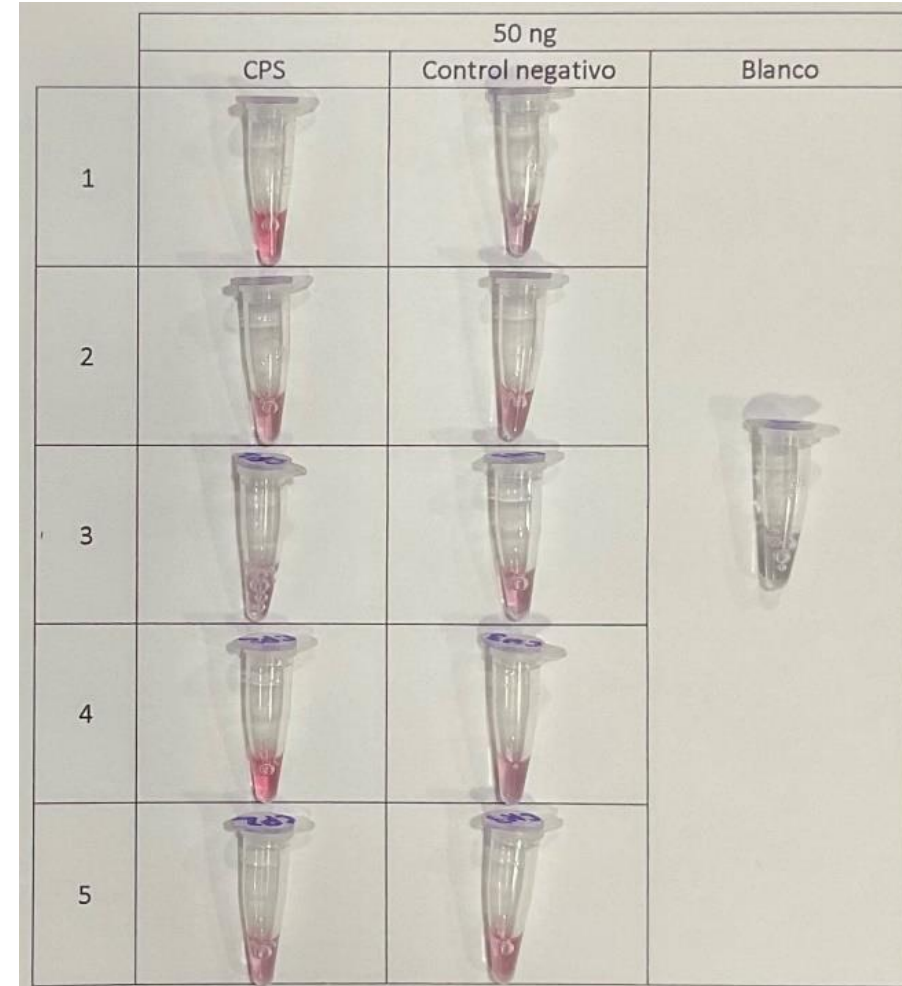


Figura 10. Hibridación de las Au-NP con ADN a concentración de 100 ng/μL luego de 25 minutos

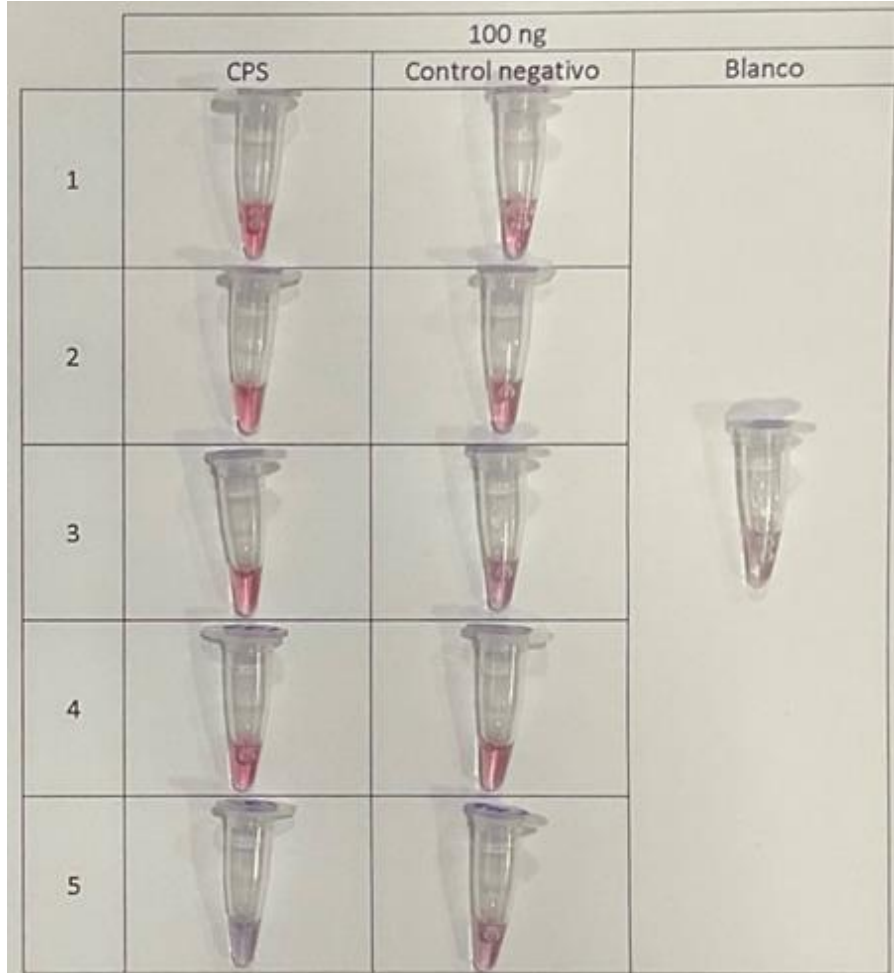


Figura 10. Hibridación de las Au-NP con ADN a concentración de 200 ng/μL luego de 25 minutos

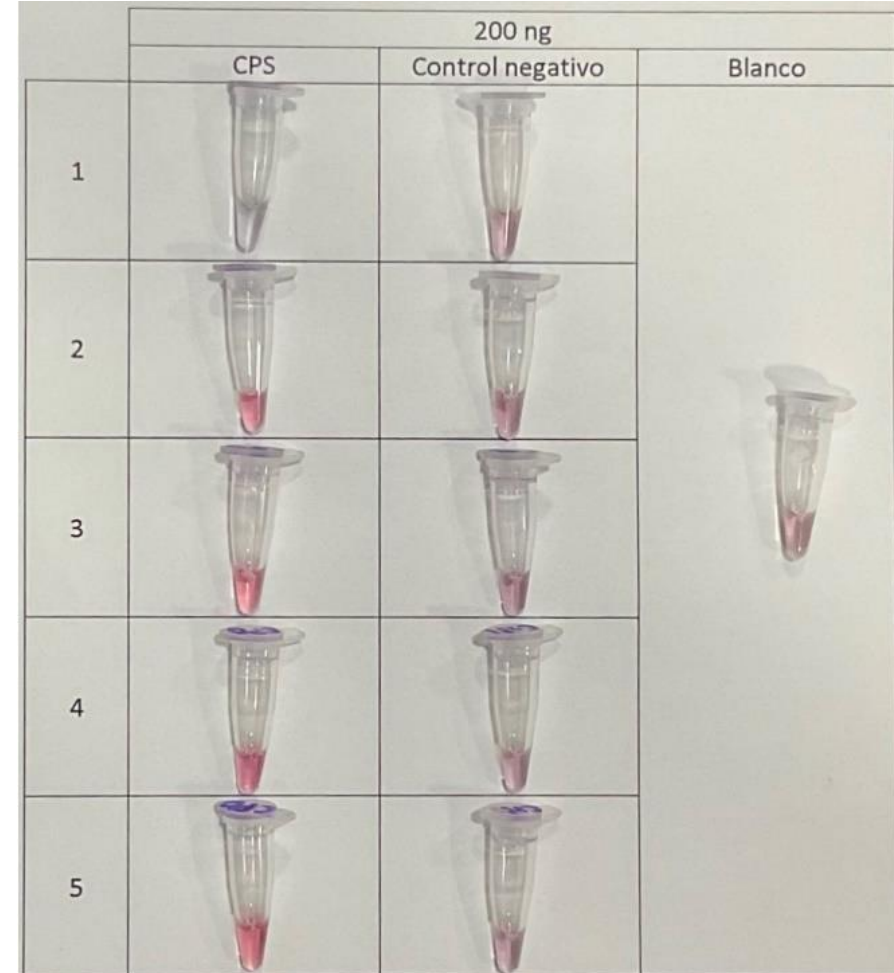


Tabla 4. Análisis ANOVA multifactorial.

Factor	F	valor-p
Concentración de ADN	4.14	0.0083
Organismo	50.28	<0.0001
Tiempo	15.46	<0.0001

Tabla 4. Prueba de Duncan para el factor organismo.

Organismo	Medias	Grupos
CN	0.09	A
CPS	0.13	B

Tabla 4. Prueba de Duncan para los factores organismo y tiempo.

Organismo	Tiempo	Medias	Grupos
CN	25	0.07	A
CN	10	0.08	A
CPS	25	0.11	B
CN	0	0.11	B
CPS	10	0.12	C
CPS	0	0.14	C



Rango de tiempo óptimo
Entre 10 y 25 minutos



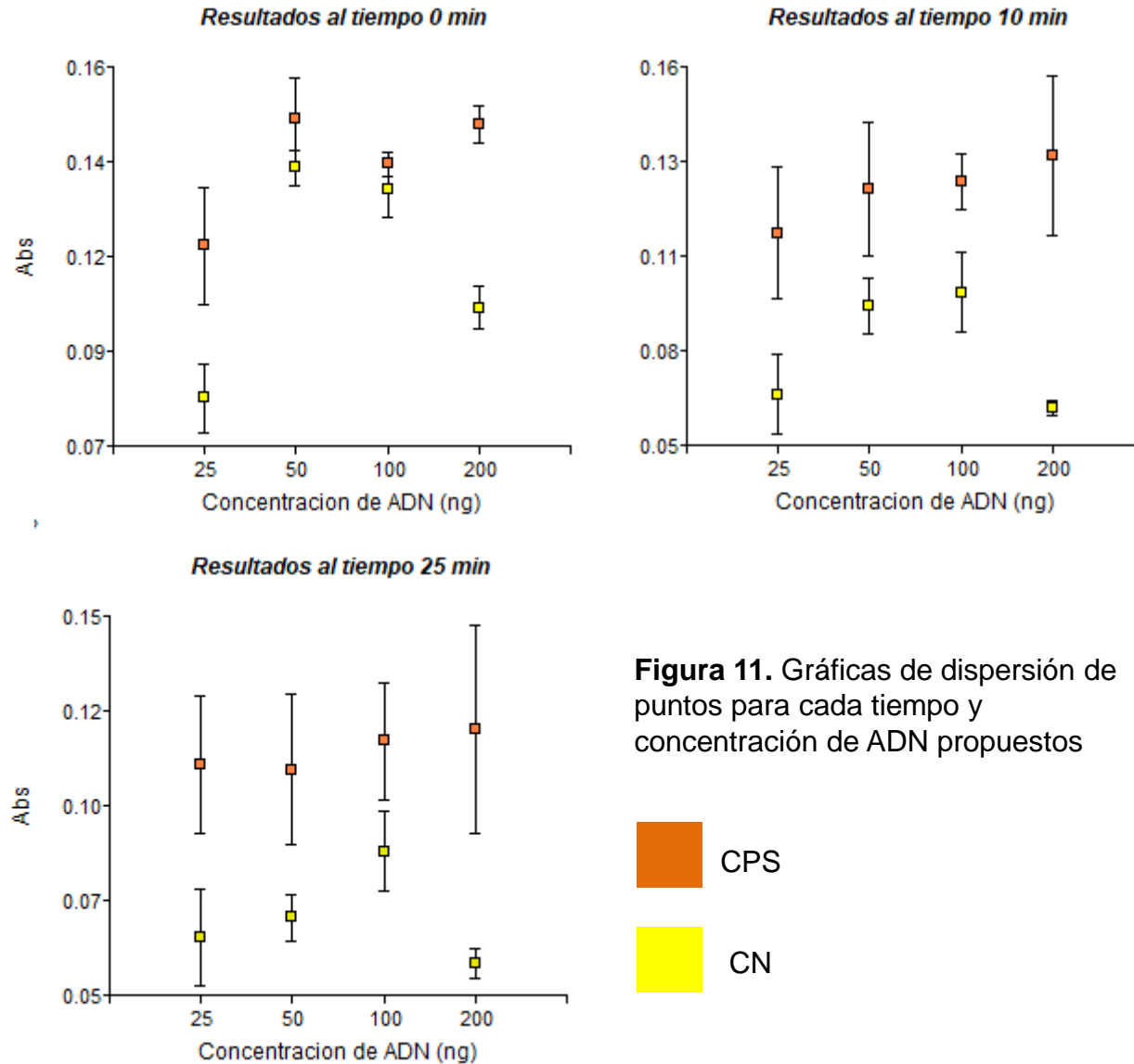
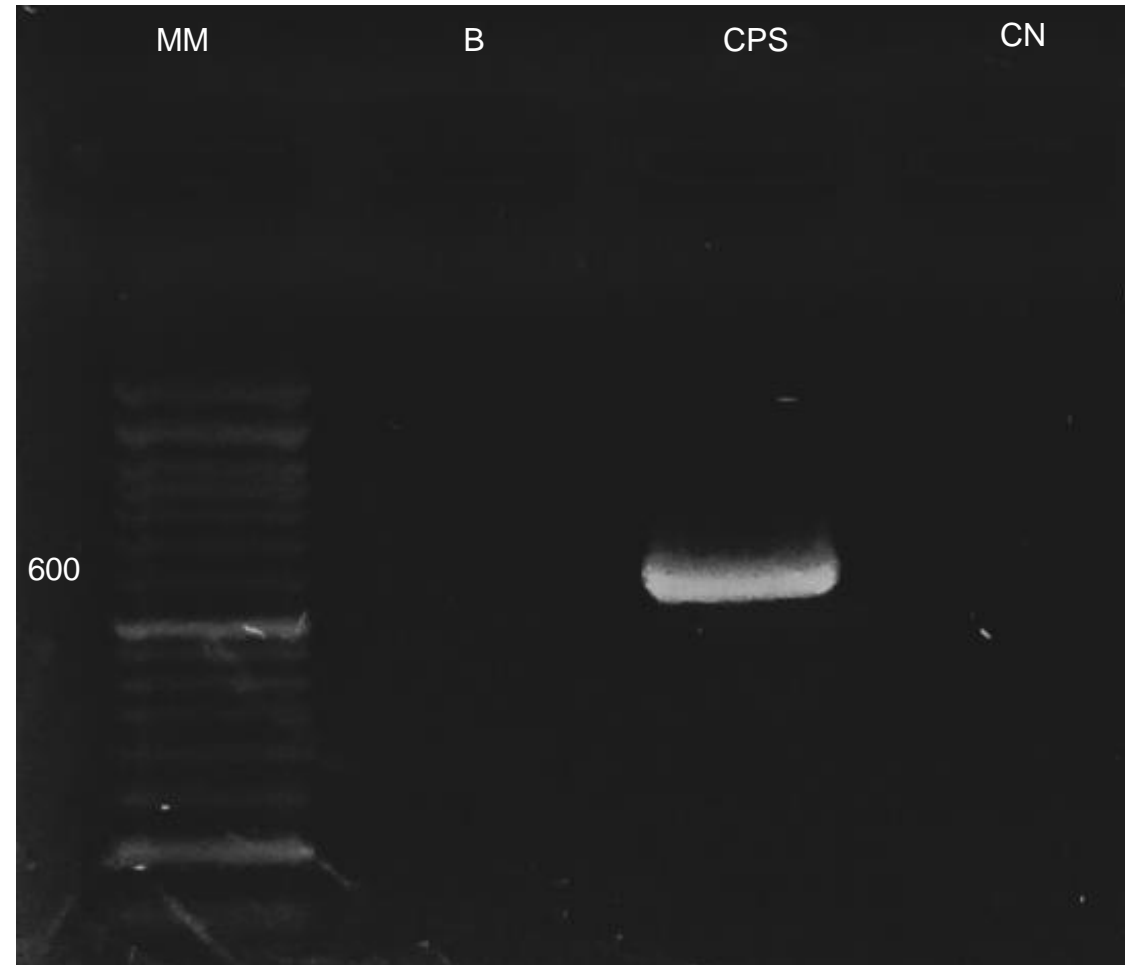


Tabla 4. Sensibilidad y especificidad de la prueba a cada concentración de ADN y tiempo propuestos. Punto de corte o cut-off: 0.127

	Concentración de ADN (ng/μL)	Tiempo (min)		
		0	10	25
Sensibilidad	25	40%	40%	40%
	50	80%	40%	40%
	100	100%	80%	60%
	200	100%	80%	80%
	25	100%	100%	100%
Especificidad	50	20%	100%	100%
	100	40%	80%	100%
	200	100%	100%	100%

Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplicones obtenidos a partir de la PCR *tms2*





Se sintetizó un constructo de 802 pb que contenía 13 conjuntos de cebadores específicos para distintos fitopatógenos, incluyendo tres pares de cebadores específicos para *A. tumefaciens* dirigidos a los genes *tms2*, *ipt* y *virD2*. El control positivo sintético fue estable estructuralmente, porque contenía un porcentaje de CG de 50.09% y 51% con y sin el plásmido pMG-Amp, respectivamente.



Se sintetizó nanopartículas de oro de un tamaño de 20 nm aproximadamente que mostraron un máximo de absorbancia a la longitud de onda de 525 nm en el espectro UV-Vis.



Se funcionalizó las Au-NP con el oligonucleótido *tms2R2* que demostró tener un 100% de identidad para especies del género *Agrobacterium* que están relacionadas con la enfermedad de la agalla de la corona y la raíz pilosa, además, las Au-NP funcionalizadas no mostraron un desplazamiento de la curva.





Se estandarizó la prueba de Au-NP funcionalizadas con un volumen total de 41.5 μL siendo 25 μL de Au-NP, 9 μL de PBS, 1 μL de ADN y 6.5 μL de HCl 0.1 N, con un intervalo de tiempo óptimo entre 10 y 25 minutos.



Se estableció que el nanosensor desarrollado posee una sensibilidad del 80% y una especificidad del 100% a la concentración de 100 ng/ μL de ADN en un rango de tiempo de entre 10 y 25 minutos.



En base a los datos obtenidos en este estudio no se rechazó la hipótesis de investigación planteada.





El ADN utilizado como control positivo en este estudio garantizó la sensibilidad y especificidad de la prueba, sin embargo, el nanosensor no fue probado en condiciones de campo o con ADN total proveniente de tumores o de suelo, por lo que, se recomienda realizar análisis en dichas condiciones para verificar si se cumplen los porcentajes planteados en este estudio.



Los resultados demostraron que existe un intervalo de tiempo óptimo entre los 10 y 25 minutos, se recomienda realizar repeticiones considerando tiempos dentro del rango propuesto para obtener un tiempo puntual.



Se recomienda ampliar la variedad de controles negativos con especies más cercanas genéticamente a *A. tumefaciens* como bacterias del género *Rhizobium*





Francisco Flores, PhD
Tutor del proyecto
Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE – Ecuador

Francisco Garrido, Ing.
IDgen – Quito, Ecuador

Vanessa Gaona, Ing.
IDgen – Quito, Ecuador

FAMILIA Y AMIGOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA