



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

TEMA: “Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria*, asociados con la enfermedad del pie negro en la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), con genes que expresan proteínas verde (GFP) o roja (tdTomato) fluorescentes.”

AUTOR: SAMPEDRO LEMA, ÁLVARO XAVIER

DIRECTOR: FLORES FLOR, FRANCISCO JAVIER PhD.

SANGOLQUÍ

2019



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* DE HONGOS DE LOS GÉNEROS *Dactylonectria* E *Ilyonectria*, ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD DEL PIE NEGRO EN LA MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth), CON GENES QUE EXPRESAN PROTEÍNAS VERDE (GFP) O ROJA (tdTOMATO) FLUORESCENTES”, realizado por el señor **Sampedro Lema Álvaro Xavier**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 18 de enero de 2019.



Francisco Flores Flor, Ph.D.
DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Sampedro Lema Álvaro Xavier, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria*, asociados con la enfermedad del pie negro en la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), con genes que expresan proteínas verde (GFP) o roja (tdTomato) fluorescentes” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 18 de enero de 2019.

ÁLVARO XAVIER SAMPEDRO LEMA

C.C.:172207424-0.....



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **Sampedro Lema Álvaro Xavier** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria*, asociados con la enfermedad del pie negro en la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), con genes que expresan proteínas verde (GFP) o roja (tdTomato) fluorescentes” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.**

Sangolquí, 18 de enero de 2019.

ÁLVARO XAVIER SAMPEDRO LEMA

C.C.: 172207424-0

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme permitido llegar a un momento tan importante en mi vida y en mi formación como persona y profesional.

A mi madre Carmen, por ser el apoyo de mi vida y la persona que dio todo su amor y esfuerzo incondicional para que pudiera seguir una carrera profesional, y por creer en mí a pesar de todas las caídas que he tenido, nunca se rindió y ahora puedo decir que lo hemos conseguido mami.

A mis dos padres, Neptalí y Fabián, que me han apoyado tanto económicamente como moralmente siempre tratando de motivarme con la intención de que sea un profesional y una persona muy educada con buenos valores, que no dejaron que me falte nada durante mi vida y mis estudios.

A mi hermano Jimmy, que siempre me ha cuidado y se ha preocupado por mí a su modo, con la finalidad de que pueda ser una persona responsable y ha entendido todo mi esfuerzo para culminar esta carrera.

A mis hermanas Karen y Mabel, que nunca ha dejado de darle alegría a mi vida siendo como son y siempre con mucho y cariño y respeto para mí.

A Grace, el amor de mi vida, que ha sido muy importante es esta etapa de mi vida, por apoyarme incondicionalmente, darme su paciencia, comprensión y amor en los momentos difíciles de mi vida y no darse por vencida.

“Cuando quieran algo, confíen en Dios y recurran a la Virgen, mi Madrecita, y no desconfíen, ya que mi Madrecita los ayudará en todos los apuros”.

San José de Cupertino

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por ser la luz, la guía y protección durante toda mi vida y siempre proveerme la fuerza y sabiduría para cumplir retos y dificultades que he tenido en el transcurso de mi vida, por la familia que tengo y nunca dejarme solo, por poner personas en mi camino que me brindan su apoyo y comprensión.

A mi familia, Carmen, Fabián, Jimmy, Karen y Mabel por estar siempre conmigo, compartiendo las alegrías y tristezas, pero siempre juntos, por motivarme en los tiempos más difíciles, por preocuparse por mí y darme los mejores consejos, por ser el ejemplo de mi vida y brindarme todo el amor del mundo.

A mi padre, Neptalí por siempre preocuparse de mí, por su amor y apoyo incondicional, por sus buenos consejos para prepararme para el mundo real, y darme las oportunidades de conocer muchos otros lugares del mundo.

A Francisco Javier Flores Flor, Ph.D. por darme la oportunidad y la confianza de realizar este proyecto bajo su tutela, por el apoyo, dedicación, conocimiento y compromiso puesto en este trabajo y el aporte que ha generado en mi crecimiento profesional.

Al Ing. William Viera por brindarme la oportunidad de desarrollar parte de este trabajo en el INIAP y otorgarme el financiamiento para poder desarrollarlo, Al Sr. Manuel Pozo por su comprensión y guía para realizar cultivos y cuidarlos además de la oportunidad brindada para adquirir más destreza en el campo.

A profesores que me generaron más gusto por esta carrera: Alma Koch, Rafael Vargas, Tatiana Páez, Thelvia Ramos, Marcelo Grijalva, Freddy Proaño, Rodrigo Ávalos, Patricia Jiménez, Luis Cumbal que gracias a sus enseñanzas han guiado como profesional y han sido buenos mentores durante mi formación.

A mis compañeros del laboratorio Kathy, Karlita, Belén, Francisco, Eduardo, Camila, Cristina, Fiama, con quienes he conseguido apoyo en mi trabajo, y sobre todo a Jessica que entre risas y apuros ha sido una persona muy importante en este trabajo que ofrece su apoyo incondicional y amistad, a Joselin que hemos cursado gran parte de la carrera juntos y ha dado su apoyo en muchas situaciones.

A los amigos Andrés, David, Anahí, Esteban, Susana, Sun, Priscila, Erika, Gabriela, Jessica, Geovanny, por compartir grandes momentos que nos ha dado la vida durante la universidad, y estar presentes cuando se los necesita.

Agradezco infinitamente a todas las personas importantes en mi vida

Con cariño

ÁLVARO XAVIER SAMPEDRO LEMA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
LISTADO DE FIGURAS	x
LISTADO DE TABLAS	xi
LISTADO DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del Problema	1
1.2. Justificación del Problema	3
1.3. Objetivos de la Investigación	6
1.3.1. Objetivo General	6
1.3.2. Objetivos Específicos	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	7
2.1. Mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i>)	7
2.1.1. Origen y distribución	7
2.1.2. Variedades	7
2.1.3. Condiciones Climáticas	8
2.1.4. Importancia económica	9
2.2. Enfermedad de pie negro	10
2.2.1. Agentes Causales	10
2.2.2. Sintomatología	11
2.3. Transformación genética de hongos	12
2.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
2.4.1. Características	12
2.4.2. Mecanismo de acción	13

2.5.	Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> (AMT)	16
2.5.1.	Vectores co-integrados y binarios	16
2.5.2.	Factores que influyen en la transformación	17
2.5.3.	Retos y ventajas de AMT	18
2.6.	Mínima Concentración Inhibitoria (MCI)	19
2.7.	Hipótesis	20
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS		21
3.1.	Revisión Bibliográfica	21
3.2.	Mantenimiento de los hongos	21
3.3.	Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI).....	22
3.4.	Mantenimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
3.5.	Confirmación de los genes GFP y tdTomato por PCR.....	23
3.6.	Transformación del hongo.....	25
3.7.	Selección de transformantes	26
3.8.	Cálculo de la frecuencia de transformación	27
3.9.	Análisis Estadístico.....	27
3.9.1.	Diseño Experimental	27
3.9.2.	Unidad Experimental.....	28
3.9.3.	Análisis.....	28
CAPÍTULO IV: RESULTADOS		29
4.1.	Crecimiento de los hongos	29
4.2.	Caracterización microscópica de los hongos.....	29
4.3.	Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI).....	30
4.4.	Crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
4.5.	Caracterización microscópica de la bacteria	32
4.6.	Confirmación de los genes GFP y tdTomato por PCR.....	33
4.7.	Co-cultivo de los hongos y la bacteria.....	33
4.8.	Selección de los hongos transformados	35
4.9.	Eficiencia de transformación de los hongos	35
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN		36
5.1.	Caracterización macro y microscópica de los hongos.....	36
5.2.	Determinación de la mínima concentración inhibitoria (MCI)	36
5.3.	Caracterización macroscópica y microscópica de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
5.4.	Confirmación de los genes de fluorescencia	38

5.5. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AMT).....	39
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	44
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	45
CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA	46

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 Distribución de las zonas más productoras de mora del Ecuador	9
Figura 2 Síntomas del pie negro causados por <i>Cylindrocarpon destructans</i> var.	11
Figura 3 Estructura química de alguna opinas necesarias para <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . 13	
Figura 4 Esquema de un sistema de vectores binarios para <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
Figura 5 Proceso de infección de las células vegetales por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
Figura 6 Representación esquemática de vectores co-integrados y binarios	17
Figura 7 Pasos básicos para la transformación mediada por <i>Agrobacterium</i>	18
Figura 8 Cepario de hongos, Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.	21
Figura 9 Crecimiento fúngico de 15 días de los géneros <i>Dactylonectria</i> e <i>Ilyonectria</i>	29
Figura 10 Macro, microconidias y clamidosporas a 60X, barra representada 20µm.....	30
Figura 11 Crecimiento fúngico a diferentes concentraciones de Higromicina B.	31
Figura 12 Cultivo de <i>A. tumefaciens</i> en caldo peptona y medio sólido AMM.	32
Figura 13 Tinción Gram de la cepa bacteriana AGL1 de <i>A. tumefaciens</i> (100X).	32
Figura 14 Gel de electroforesis de los genes GFP y tdTom bajo luz UV.	33
Figura 15 Traspaso de co-cultivo al medio de selección.	34
Figura 16 Hongo transformado (<i>Penicillium</i> sp.) bajo luz UV	35

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 <i>Variedades de mora en el Ecuador</i>	7
Tabla 2 <i>Exigencias climáticas para el cultivo de mora</i>	8
Tabla 3 <i>Condiciones de PCR para el gen GFP y tdTomato</i>	24
Tabla 4 <i>Concentración micelial de los hongos a ser transformados</i>	34
Tabla 5 <i>Concentración de esporas de los hongos a ser transformados</i>	34

LISTADO DE ABREVIATURAS

MCI	Mínima concentración inhibitoria
UFC	Unidades formadores de colonias
AMT	Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
T-DNA	ADN de transferencia
AS	Acetosyringona
pH	Potencial hidrógeno
°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
PDA	Agar papa dextrosa
AMM	Medio mínimo de <i>Agrobacterium</i>
IMM	Medio mínimo de inducción
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
OD	Densidad óptica
ET	Eficiencia de transformación

RESUMEN

El pie negro es una enfermedad fúngica que afecta a la mora de castilla (*Rubus glaucus*), produciendo marchitez y pudrición de la raíz y el tallo. Los hongos causantes pertenecen a los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria*, conocidos por su nombre anamorfo *Cylindrocarpon*. Al no haber reportes que expliquen la interacción entre estos patógeno y la planta, el presente estudio realizó ensayos de mínima concentración inhibitoria (MCI) para determinar la sensibilidad que poseen las cepas de cuatro especies de los géneros *Ilyonectria* y *Dactylonectria* a la Higromicina B, antibiótico utilizado en la selección de organismos transformados. Se midió el diámetro de crecimiento a concentraciones del antibiótico de 0, 5, 15, 30 y 50 µg/mL, durante cinco días. Para la transformación se utilizaron esporas y micelio como material de inicio a concentraciones promedio de $3,75 \times 10^6$ y $4,47 \times 10^6$ UFC/mL respectivamente y una concentración de *A. tumefaciens* de 2×10^7 células/mL. Se utilizaron dos temperaturas de co-cultivo 20 y 28°C y la concentración de 50 µg/mL de higromicina descrita en algunas publicaciones para la selección de hongos transformados en medio YPS. Se llegó a determinar que el MCI de los hongos es de 30 µg/mL del antibiótico. Durante el proceso de AMT no se pudo obtener un hongo transformado que sea del interés de este estudio, por ello se puede afirmar que los hongos presentan resistencia a ser transformados, dejando así la posibilidad de probar otro método de transformación genética.

PALABRAS CLAVE:

- *Agrobacterium tumefaciens*
- *D. torresensis*
- *Ilyonectria*
- MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA

ABSTRACT

The black foot is a fungal disease that affects the blackberry (*Rubus glaucus*), causing wilting and rotting of the root and stem. The fungi belong to the genera *Dactylonectria* and *Ilyonectria*, known by their anamorph name: *Cylindrocarpon*. In the absence of reports explaining the interaction between these pathogens and the plant, the present study carried out tests of minimum inhibitory concentration (MCI) to determine the sensitivity of the strains of four species of the genera *Ilyonectria* and *Dactylonectria* towards Hyromycin B, antibiotic used in the selection of transformed organisms. The growth diameter was measured at antibiotic concentrations of 0, 5, 15, 30 and 50 µg/mL, for five days. For the transformation of spores and mycelium were used as starting material at average concentrations of 3.75×10^6 and 4.47×10^6 CFU/mL, respectively, and a concentration of *A. tumefaciens* of 2×10^7 cells/mL, two co-culture temperatures 20 and 28°C were used, the concentration of 50 µg/mL of hygromycin described in some publications was used for the selection of fungi transformed in YPS medium. It was determined that the MCI of the fungi is 30 µg/ mL of the antibiotic. During the AMT process, it was not possible to obtain a transformed fungus that is of interest in this study, so it can be said that the fungi of these genera have a resistance to be transformed, thus leaving the possibility of testing another method of genetic transformation.

KEY WORDS:

- *Agrobacterium tumefaciens*
- *D. torresensis*
- *Ilyonectria*
- MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del Problema

En el Ecuador el cultivo de la mora de castilla alcanza una producción total de 10283 toneladas por año. Existe un porcentaje significativo del 40% de pérdidas debido a la fruta de mala calidad, como consecuencia de diversos factores como: mal manejo agronómico, control inadecuado de plagas y enfermedades en las plantaciones, así como falta de plantas mejoradas con alta productividad, resistentes o tolerantes a plagas y enfermedades, sin espinas y buena calidad de frutos (Delgado, 2012).

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) es una planta silvestre originaria de zonas tropicales; en el Ecuador esta planta es una parte importante del mercado debido a la comercialización de sus frutos. Aunque la producción se ha visto afectada por una serie de problemas fitosanitarios como pudrición del fruto causado por *Botrytis cinérea*, el mildiu veloso y polvoso causados por *Peronospora* sp. y *Oidium* spp. y problemas de marchitez producidos por *Verticillium* sp., *C. destructans*, *Fusarium oxisporum* (MAGAP, 2013).

Las enfermedades como la marchitez y pudrición de la raíz en plantas de mora causado por hongos también han sido un factor importante que afecta directamente el rendimiento y la producción, en Alemania se ha determinado que los hongos que causan estos síntomas de marchitez y pudrición influyen directamente en la producción de otras plantas silvestres como fresas y frambuesas. La enfermedad se conoce como pie negro, el cual puede ser causado por diferentes hongos patógenos como: *Verticillium dahliae*, *Phytophthora fragariae*, *P. cactorum*, *Pythium* spp, *Fusarium* spp, *Cylindrocarpon* spp y *Gnomoniopsis fructicola*, entre otros.

Aunque las especies de hongos que causan mayor severidad de la enfermedad son *Dactylonectria torresensis* junto con otras especies del género *Ilyonectria*, más conocidos por su nombre anamorfo *Cylindrocarpon* (Weber & Entrop, 2017).

En el año 2000 se inició el Programa Nacional de Fruticultura del INIAP encargado de la investigación en frutales nativos del Ecuador con el fin de encontrar mejoras genéticas para hallar especies resistentes a enfermedades como es el caso del pie negro que afecta a la mora. En la actualidad, se ha llegado a determinar a varias especies de hongos asociadas con la sintomatología del pie negro, pero nada se conoce sobre la interacción que existe entre el patógeno y la planta hospedera, según INIAP (2018). Informe de Fruticultura. Recuperado de: <http://www.iniap.gob.ec/pruebav3/fruticultura/#>

Varios estudios se han dedicado a la transformación de hongos para que expresen proteínas fluorescentes como GFP (Green Fluorescent Protein). La expresión de esta proteína se utiliza para observar la interacción a nivel celular del patógeno con el hospedero (Caasi, Walker, Marek, Enis, & Mitchell, 2009). Por ejemplo, se ha implementado métodos similares para facilitar la observación de *Magnaporthe grisea* y la interacción del patógeno en la raíz de las plantas de arroz, con la finalidad de ayudar a explicar cómo funciona el crecimiento del hongo patógeno y el proceso infectivo que posee (Zhang, Wu, Wang, Li, & Xu, 2014).

Se ha utilizado en *Fusarium oxysporum* el proceso de transformación genética con el objetivo de conocer más acerca de su mecanismo de patogenicidad debido a que la enfermedad del marchitamiento vascular que produce está bastante diseminada y es muy destructiva. A futuro se podrían explicar esta y más enfermedades causadas por hongos gracias a la inserción de genes de fluorescencia facilitando el entendimiento de su comportamiento (Mullins *et al.*, 2001).

Los estudios de transformación genética de hongos padecen de ciertas deficiencias como la falta de detalles en los protocolos utilizados, aunque al tener una vasta diversidad de hongos y la complejidad de su pared celular ha requerido que se optimicen diferentes metodologías de transformación para cada especie. Gracias a estos inconvenientes se ha obtenido protocolos mejorados para cada especie transformada (Michielse, Hooykaas, van den Hondel, & Ram, 2008).

1.2. Justificación del Problema

Cuando la mora sufre de la enfermedad del pie negro, se puede observar marchitamiento en la parte aérea de la planta (Iturralde, 2017). Originalmente el causante de canchales, pudrición de raíz y decaimiento de la madera fue identificado como *Cylindrocarpon* spp, género anamorfo que contiene a varios teleomorfos causantes del pie negro en diversos cultivos. La enfermedad de pie negro de la mora de castilla causada por hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* puede considerarse, desde el punto de vista económico, una de las enfermedades más peligrosa para la mora de castilla debido a que influye directamente en el rendimiento y producción de los pequeños agricultores (Naranjo, Taco, & López, 2016).

Se ha realizado aislados que demuestran que las raíces de plantas con síntomas de pie negro como plantas asintomáticas pueden estar colonizadas por hongos de los géneros *Ilyonectria* y *Dactylonectria* (Carlucci, Lops, Mostert, Halleen, & Raimondo, 2017). Agustí-Brisach *et al.*, (2015) mencionan que un factor podría ser la presencia de heridas en la raíz de la planta para desarrollar síntomas tempranos de la enfermedad. Sin embargo, se conoce muy poco aún del mecanismo de infección u otros factores que afecten la interacción entre la planta y el hongo a nivel celular.

Hasta la fecha se sabe que los hongos causantes de la enfermedad del pie negro producen daños en los tejidos vasculares de la planta (Cedeño, Carrero, Quintero, Pino, & Espinoza, 2004). Pero la información de la forma en que se realiza la infección de los hongos patógenos en la planta aún es limitada. Es por eso que una de las maneras para realizar una evaluación de la interacción es mediante la técnica de transformación de hongos en las especies de *Dactylonectria* e *Ilyonectria* con genes de la proteína verde (GFP) o roja (tdTomato) fluorescentes que permitirá analizar a futuro, tanto la biología y ecología del hongo como la interacción con su hospedero (Lorang *et al.*, 2001).

Carlucci *et al.*, (2017) han demostrado que los hongos anamorfos de *Cylindrocarpon* spp no solo se encuentran en el tallo o raíces de plantas asintomáticas, sino también en el suelo, aunque son mucho más difíciles de observar. La utilización de la expresión de proteínas fluorescentes en los hongos transformados tiene una gran ventaja en el estudio y entendimiento de la enfermedad mediante una visualización directa de la infección de la planta *in situ*.

En el departamento de Entomología y Patología Vegetal de la Universidad de Oklahoma las proteínas fluorescentes han sido utilizadas exitosamente para estudiar las interacciones patógeno-hospedero. Esta técnica ayudó a determinar en pasto que los estolones también son rutas alternas para la infección por hongos y no necesariamente se realiza con estructuras especializadas a pesar de que siguen siendo menos eficientes que la infección por raíz (Caasi, Walker, Marek, Enis, & Mitchell, 2009).

En hongos, la proteína GFP ha facilitado investigaciones citológicas en desarrollo, pruebas de patogenicidad y progresiones de la enfermedad (Chen, Hsiang, & Goodwin, 2002). La utilización de estos microorganismos transformados habilita la identificación de sitios de infección que no se hubieran podido reconocer. Es por ello que aplicar estos genes como

proteínas fluorescentes indicadoras puede ampliar mucho más la comprensión referente a la enfermedad del pie negro y otras relacionadas con hongos.

La implementación del *Agrobacterium tumefaciens* como una herramienta de transformación ha revolucionado los enfoques para comprender las funciones de los genes de una gran cantidad de hongos. La transformación mediada por esta bacteria se ha convertido en una de las tecnologías más innovadoras en la investigación de hongos que se ha desarrollado en los últimos 20 años. La transformación mediada por *Agrobacterium* (AMT) ha trazado un camino en el desarrollo de nuevas especies para actuar como un modelo de estudio en las interacciones fitopatológicas (Idnurm *et al.*, 2017).

La presente investigación utilizará la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa AGL1, modificada genéticamente y obtenida de los laboratorios de Patologías Vegetales de la Universidad de Oklahoma, y los hongos causantes de la enfermedad de pie negro aislados e identificados por Iturralde (2017) en el INIAP. En este proyecto se propone la transformación de los hongos causantes de la enfermedad del pie negro de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* con los genes de fluorescencia verde (GFP) y rojo (tdTomato) mediando por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

1.3. Objetivos de la Investigación

1.3.1. Objetivo General

Transformar mediante *Agrobacterium tumefaciens* hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria*, asociados con la enfermedad del pie negro de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), con genes que expresan la proteína verde (GFP) o rojo (TdTomato) fluorescentes.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar la mínima concentración inhibitoria (MCI) de higromicina B como agente de selección en la transformación de las especies *Dactylonectria* e *Ilyonectria*.
- Transformar hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 conteniendo plásmidos pOHT-SGFP o pBHt2-tdTom.
- Observar la colonización de los hongos transformados en la raíz de plantas de mora de castilla.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Mora de Castilla (*Rubus glaucus*)

2.1.1. Origen y distribución

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) se encuentra en las zonas frías de Europa, en zonas aledañas a la cordillera de los Andes, y lugares como Centroamérica y México, excepto en las zonas desérticas. La mora es una planta dicotiledónea, perteneciente al orden Rosales, familia Rosácea, género *Rubus* (Cárdenas, 2013). Esta planta es de vegetación perenne, arbustiva semi-erecta, conformada por diversos tallos que pueden alcanzar una longitud de tres metros.

2.1.2. Variedades

Según Cárdenas (2013) en el año de 1840 se iniciaron trabajos para obtener variedades de *Rubus* en las zonas templadas. En el Ecuador las variedades cultivadas son las que se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1

Variedades de mora en el Ecuador

Variedades	Características
Mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>)	La mora de castilla es la de mayor importancia comercial y la más cultivada en Ecuador, en regiones comprendidas entre los 1200 a 3000 m.s.n.m.
Mora variedad brazos (<i>Rubus</i> sp.)	Fue desarrollada en 1959 por genetistas de Texas, es la más productiva y adaptable. Esta variedad se ha adaptado en Ecuador

CONTINÚA

Mora negra (<i>Rubus bogotensis</i>)	Ideal para alturas entre 1700 a 3200 m.s.n.m., sus frutos son racimos muy apretados y con poco jugo.
Mora de páramo o de gato (<i>Rubus giganteus</i>)	Los frutos son huecos y de granos grandes aproximadamente de 7 cm, cultivada en altitudes de 2600 a 3400 m.s.n.m.
Mora pequeña (<i>Rubus magalococus</i>)	Variedad rústica de frutos pequeños, cultivada hasta los 2700 m.s.n.m.
Mora grande (<i>Rubus nubigenus</i>)	Variedad de frutos grandes y se cultiva desde los 2600 a 3100 m.s.n.m.

Fuente: Modificado de Delgado (2012)

2.1.3. Condiciones Climáticas

Delgado (2012) menciona que la mora se adapta a una gran variedad de altitudes. Sus mejores resultados en cultivos han sido entre 1800 y 2400 m.s.n.m.; una vez sobrepasada esta altura, se corre peligro de heladas que podrían terminar quemando el tallo. Se pueden cultivar a temperaturas entre los 6 y 22°C (Andrade, 2012). Las exigencias climáticas del cultivo están en la Tabla 2.

Tabla 2
Exigencias climáticas para el cultivo de mora

Exigencias climáticas	Descripción
Altitud	La altitud óptima va desde los 1800 a 2400 m.s.n.m.; en alturas mayores el peligro de quema de tallos a causa de las heladas está presente.
Temperatura y humedad relativa	Se desarrolla en temperaturas entre los 8 y 22 °C, pero la óptima ronda entre los 12-14 °C y una humedad ambiental entre los 70 y 80%.
Vientos	Requiere zonas libres de vientos fuertes.
Luminosidad	Las óptimas varían de tres a cuatro horas por día.
Precipitación	Las lluvias no deben sobrepasar los 1200 y 2500 mm anuales

Fuente: Modificado de Delgado, (2012).

2.1.4. Importancia económica

La mora (*Rubus glaucus*) desde hace tres décadas ha adquirido gran importancia a nivel comercial debido a los precios que alcanza en los mercados, su gran aceptación en la agroindustria y el incremento del consumo en fresco. Delgado (2012) menciona que en el Ecuador la mora registra una expansión constante, lo que hace suponer que sus expectativas a un futuro son excelentes y podría llegar a convertirse en una alternativa para diversificar las exportaciones. Las zonas productoras del Ecuador son las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi (Figura 1). Tungurahua es la provincia productora de mora con un total del 70% de la producción ecuatoriana (Cárdenas, 2013). En los últimos años, esta planta ha tenido alzas en el mercado nacional e internacional, por lo que es importante conocer sus debilidades biológicas para fortalecer el sector comercial del producto (Naranjo, Taco, & López, 2016).



Figura 1 Distribución de las zonas más productoras de mora del Ecuador

Fuente: INEC (2000) citado por Cárdenas (2013).

2.2. Enfermedad de pie negro

2.2.1. Agentes Causales

Las especies de *Cylindrocarpon* son comunes y se pueden encontrar como habitantes del suelo, también en plantas muertas o como colonizadores de raíces o patógenos. Se han caracterizado como patógenos débiles en varios tipos de plantas herbáceas o en plantas leñosas (Brayford, 1993). Hace algunos años una drástica reducción en las tasas de supervivencia de los viñedos injertados en los viveros, así como en los viñedos jóvenes ocurrió en la provincia de Western Cape de Sudáfrica. El bajo promedio de estos viñedos jóvenes pudo ser atribuido a diversos factores que incluyen enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus, pestes de insectos y nematodos, o factores abióticos y deficiencias nutricionales (Fourie, Halleen, & Crous, 2005).

Algunas de estas especies han sido descritas como agentes de podredumbre de raíces en varias plantas hospederas y causantes de la enfermedad del pie negro de vides. La primera vez que se reportó a *C. destructans* en vides fue en Francia en 1961; desde ese momento se han encontrado varios reportes que demuestran diversas especies de *Cylindrocarpon sp* aisladas de vides jóvenes o con pudrimiento basal de la raíz (Halleen *et al.*, 2006). A pesar de que se ha demostrado que los hongos de esta especie causan la enfermedad el pie negro, aún no se tiene claro cómo y dónde ocurren las infecciones. Muy poca información está disponible con respecto a la etiología y epidemiología de los hongos involucrados en la enfermedad del pie negro (Hallen, Schroers, Groenewald, & Crous, 2004). En diversos estudios se ha demostrado que el nombre genérico de *Cylindrocarpon* contiene un sin número de anamorfos, entre los cuales se encuentran los hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* con una vasta cantidad de

especies que son patógenos y causantes de la enfermedad del pie negro (Ferrer, Abad, & Armengol, 2015).

2.2.2. Sintomatología

Los síntomas de la enfermedad (Figura 2) son marchitez en las hojas, puntas y bordes necrosados y más sensibles. Ciertas plantas como la vid presentan clorosis en las hojas, a veces las yemas o incluso la planta no llega a germinar, todo esto ocurre cuando los daños son en la raíz y cuello de la planta, donde se comienza a propagar el mal (Alaniz, 2008).

En las plantas muertas de mora se ha observado que la raíz y la corona son afectadas por la enfermedad del pie negro debido a la presencia de grietas transversales en las raíces y desprendimiento del córtex con facilidad, revelando rayas de color marrón claro, marrón oscuro y negro en los tejidos vasculares. En la parte interna de la corona de plantas moribundas también se ha observado rayas negras que se complementan con el color blanco amarillento de los tejidos sanos circundantes, y las plantas muertas presentan hueca la parte central de la corona (Cedeño, Carrero, Quintero, Pino, & Espinoza, 2004).



Figura 2 Síntomas del pie negro causados por *Cylindrocarpon destructans* var.

Fuente: (Cedeño, Carrero, Quintero, Pino, & Espinoza, 2004)

2.3. Transformación genética de hongos

Los hongos existen ampliamente en diversos tipos de ambientes, como el suelo, desperdicios biológicos y plantas. En la naturaleza ellos juegan un rol fundamental en procesos de degradación; en la agricultura muchos son utilizados tanto para el control de plagas como de enfermedades en plantas y en la medicina son utilizados para el tratamiento de enfermedades, como la penicilina de *Penicillium chrysogenum* (Li, Tang, Lin, & Cai, 2017), ya que poseen una gran capacidad de producción de proteínas y metabolitos secundarios. Los hongos son una contribución económica importante, por lo que estudios en este campo de su información genética podría convertir a la micología en una nueva era de investigación.

2.4. *Agrobacterium tumefaciens*

2.4.1. Características

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo y motilidad por flagelos proyectados en todas las direcciones. Pertenece a la clase de α -Proteobacterium y tiene la capacidad de transformar genéticamente las plantas, hongos e incluso, células humanas. El género *Agrobacterium* pertenece a la familia Rhizobiaceae y también está cercanamente relacionada al género *Rhizobium*, cuyos miembros también forman asociaciones íntimas con las plantas para fijar el nitrógeno atmosférico (Idnurm *et al.*, 2017).

La forma silvestre de *Agrobacterium* lleva dos tipos de genes para transformación, los primeros son los oncogenes y los otros son los encargados de la biosíntesis de opinas (Figura 3) que promueven la enfermedad conocida como agalla de la corona, la cual consiste en un

crecimiento continuo debido a la ausencia de control en el ciclo celular de las células (Solis-Ramos *et al.*, 2010).

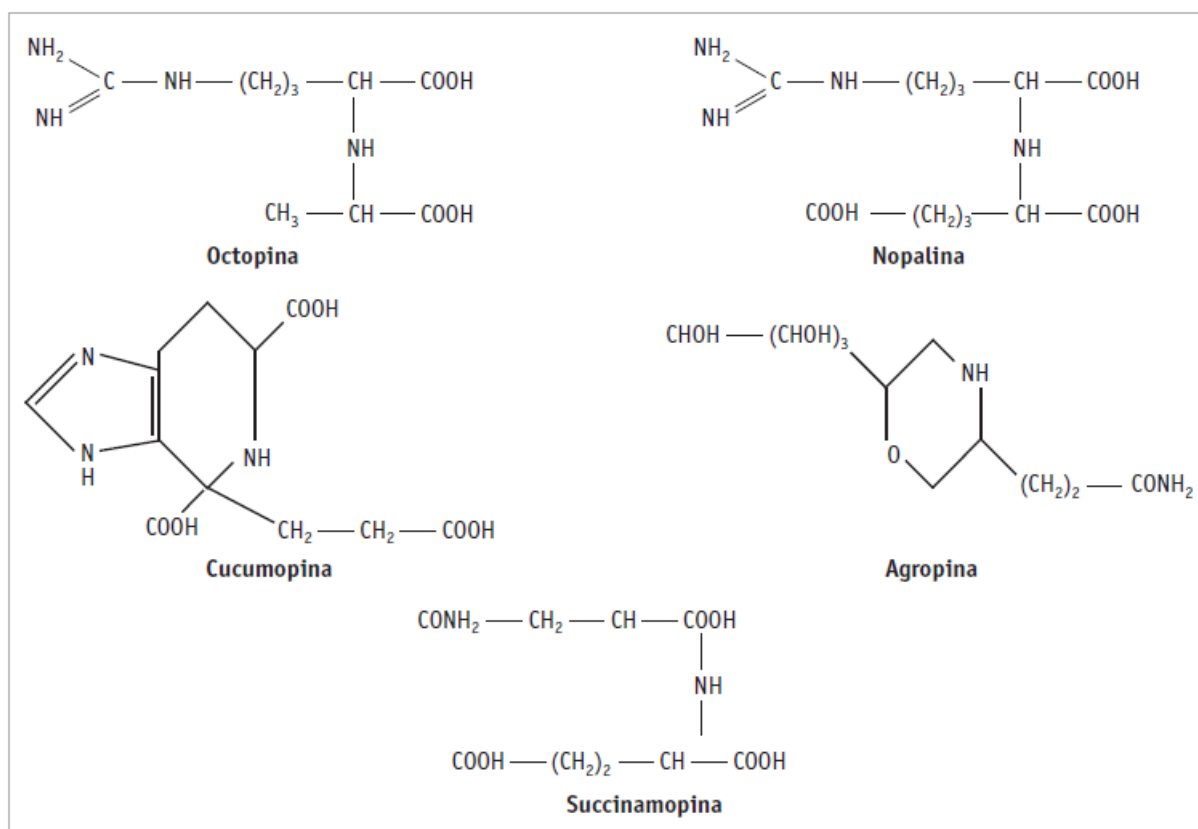


Figura 3 Estructura química de alguna opinas necesarias para *Agrobacterium tumefaciens*.

Fuente: (Rodríguez, Chi, Acereto, & Echeverría, 2004)

2.4.2. Mecanismo de acción

Agrobacterium ha sido reconocido como un agente bacteriano capaz de producir el desarrollo de tumores y agallas en plantas e inclusive podría causar la muerte en plantas infectadas; ataca principalmente a dicotiledóneas y algunas gimnospermas (Rodríguez, Chi, Acereto, & Echeverría, 2004).

Esta bacteria posee plásmidos grandes (plásmido Ti) que son los responsables de su oncogenicidad. Cuando se libera un segmento del plásmido, se obtiene T-DNA, el cual se encuentra integrado de forma estable en la planta. Además de este plásmido Ti, también existe una región llamada *vir*, esencial para la inducción de los tumores, Figura 4 (Hoekema, Hirsch, Hooykaas, & Schilperoort, 1983).

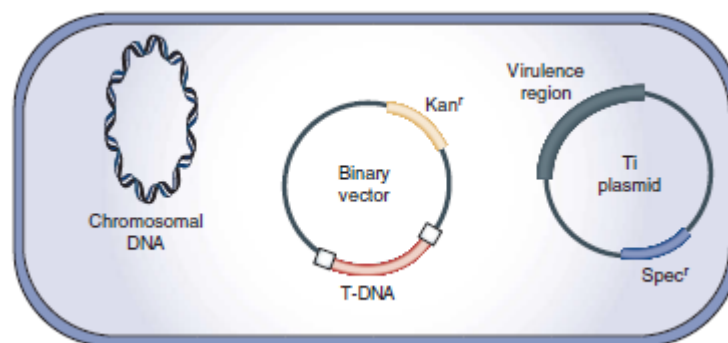


Figura 4 Esquema de un sistema de vectores binarios para *Agrobacterium tumefaciens*

Fuente: (Michielse, Hooykaas, van den Hondel, & Ram, 2008)

Agrobacterium tumefaciens se une a la célula huésped donde se ha producido una herida, este proceso toma ventajas de algunos de los receptores de la célula huésped y proteínas como ChvA, ChvB, PscA, Attl. Entre los receptores de la célula huésped se encuentran la proteína vitronectina, la proteína de unión a ricadhesina, la síntesis de celulosa (CSLA9) y otras proteínas. Las proteínas interactúan con la proteína VirB2 de *Agrobacterium*. El proceso de infección inicia con la activación de los genes de virulencia (*vir genes*) desde el plásmido Ti (plásmido inductor de tumores) con la ayuda de las señales celulares que provienen de la célula huésped, incluidas sustancias fenólicas (por ejemplo, Acetosyringona AS), azúcares y cambios en el pH (Solis-Ramos *et al.*, 2010).

Agrobacterium envuelve una metodología genética microbiana compleja encargada de insertar los genes de interés dentro del DNA de transferencia (T-DNA), que es reconocido como una región en el plásmido Ti. Para que se dé la transferencia, se necesita de la presencia de elementos como las secuencias repetidas de borde (25bp) del T-DNA que flanquean al T-DNA en orientación directa y trazan la región que será procesada del plásmido además de la presencia de los genes de virulencia y genes (como *chv*) localizados en el cromosoma bacteriano (Lee & Gelvin, 2008).

El proceso de infección (Figura 5), en general, comienza cuando la planta empieza a secretar compuestos fenólicos que favorecen la transducción de señales inductoras de la expresión de los genes de virulencia (*virA* y *virG*). La activación de *virA* inicia la fosforilación y activación de la proteína del *virG*; al ser activada, se une a la secuencia de *vir box* que se encuentra antes de cada operón de los genes *vir*, lo que permite una mayor expresión de todos estos genes. Para el procesamiento del T-DNA, se unen los *virD1* y *virD2* a las secuencias de borde del T-DNA y luego la proteína de *virD2* se une covalentemente a 5' permitiendo que salga de la bacteria para insertarse en la célula de la planta, y más tarde al núcleo (Lee & Gelvin, 2008).

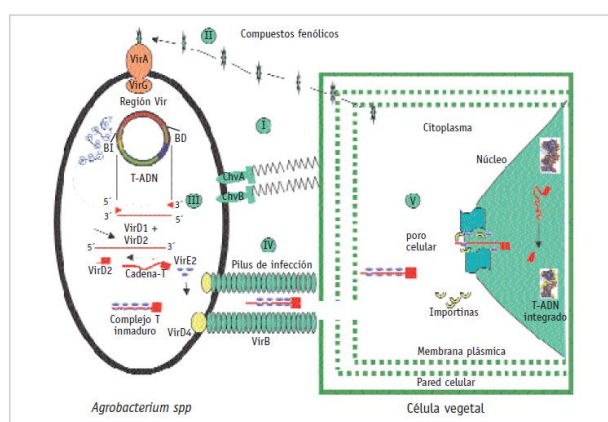


Figura 5 Proceso de infección de las células vegetales por *Agrobacterium tumefaciens*.

Fuente: (Rodríguez, Chi, Acereto, & Echeverría, 2004)

2.5. Transformación mediada por *Agrobacterium* (AMT)

El método de AMT ha demostrado ser más estable y eficiente que los métodos de transformación convencional desde la primera publicación de transformación en hongos. La primera vez que se aplicó el método fue para transformar *S. cerevisiae*. Un plásmido que lleva el gen de resistencia a la higromicina se ha utilizado para transformar especies como *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma reesei*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus giganteus* y *Fusarium oxisporum*. Los pasos básicos dependen de la especie del hongo que se desee transformar (Li, Tang, Lin, & Cai, 2017).

2.5.1. Vectores co-integrados y binarios

Los vectores co-integrados son construidos por el entrecruzamiento de las regiones homólogas que poseen dos plásmidos (Figura 6); es decir, se da una recombinación entre un plásmido Ti desarmado que contiene la secuencia izquierda y otro vector más pequeño con el gen de interés flanqueado por la secuencia de la derecha junto con una región homóloga a la secuencia de la izquierda. Los vectores binarios son muy utilizados en la transformación de plantas y tienen una extensa variedad. Dentro de *Agrobacterium* existen dos vectores, uno para el T-DNA y el otro para la región con los genes de virulencia, lo que facilita la manipulación de técnicas *in vitro* (Valderrama, Arango, & Afanador, 2005).

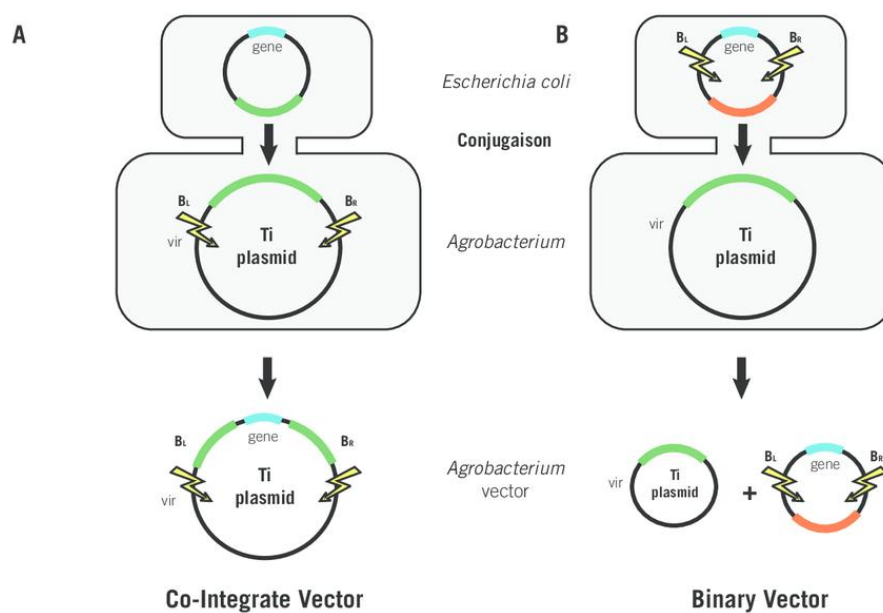


Figura 6 Representación esquemática de vectores co-integrados y binarios

Fuente: (Sangwan, Ochatt, Nava-Saucedo, & Sangwan, 2012)

2.5.2. Factores que influyen en la transformación

Diversos factores afectan la eficiencia de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, incluyendo el tipo de cepa del hongo y del material de trabajo (protoplastos, esporas, hifas y tejido), la concentración de acetosyringona, radio hongo/*Agrobacterium*, y las condiciones para el co-cultivo. Los pasos elementales que se deben seguir durante la transformación del hongo son (Figura 7): realizar los cultivos del hongo y de *Agrobacterium* en los medios adecuados; inducir con acetosyringona en el medio de cultivo para activar los genes de virulencia; co-cultivar la bacteria y el hongo en medio de inducción y posteriormente transferir el cultivo a un medio selectivo y cultivarlo para ver el número de transformantes obtenidos durante el procedimiento (Groot, Bundock, Hooykaas, & Beijersbergen, 1998).

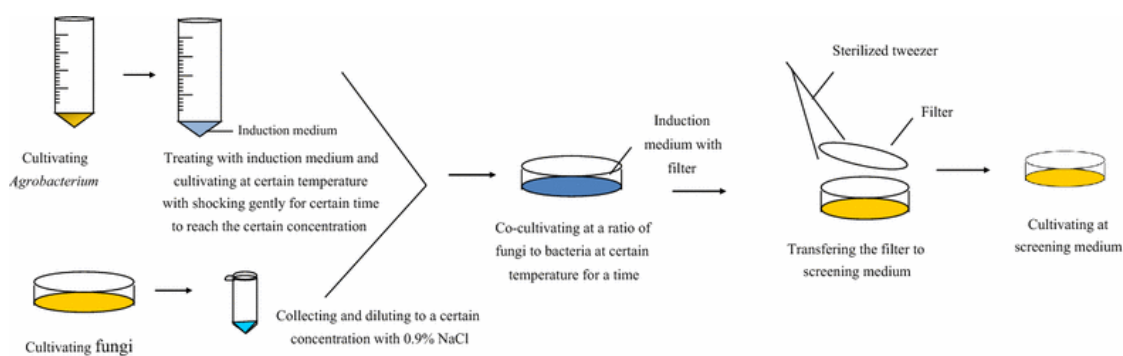


Figura 7 Pasos básicos para la transformación mediada por *Agrobacterium*

Fuente: (Li, Tang, Lin, & Cai, 2017)

2.5.3. Retos y ventajas de AMT

Una de las desventajas iniciales de la transformación de hongos con *Agrobacterium* fue la inflexibilidad existente con los sistemas de vectores. Algunos de los vectores de esta bacteria eran muy complicados de manejar, con sitios de restricción limitados para la clonación convencional y, habiendo sido desarrollados inicialmente en plantas fueron prefabricados con casetes de selección y elementos reguladores específicamente para la transformación en esta especie. Afortunadamente, luego se encontró que algunos vectores para plantas también tenían vectores pequeños con regiones de T-DNA vacías que se podían manipular fácilmente. Otro limitante para los primeros vectores eran el tamaño del DNA que podía ser insertado, lo que significaba una restricción técnica por complementación de genes grandes. Así que una solución a este problema fue el desarrollo del sistema BIBAC, el cual permitía la modificación de cualquier cromosoma artificial bacteriano (BAC) con una sección grande del DNA del hongo para contener las secuencias de borde izquierda y derecha, lo que habilitaría la transformación del hongo directamente (Idnurm *et al.*, 2017).

Las ventajas que presenta este método con respecto a otros es que se elimina la necesidad de remover la pared celular del hongo con el fin de obtener protoplastos; aunque el protoplasto es un método establecido en algunas especies, en otras es difícil su obtención y es poco probable realizarlo con éxito. Los hongos poseen un conjunto de células de todo tipo que difieren entre especies y cambian en distintas etapas durante su crecimiento y desarrollo. Estas diferencias probablemente explican la facilidad y éxito de obtener protoplastos en algunas especies, además de que también existe dificultad para obtener enzimas adecuadas para degradar la pared celular. Una segunda ventaja significativa es que el T-DNA se integra de forma aleatoria en el genoma, y AMT es susceptible a ser utilizada en enfoques genéticos inversos para la eliminación o alteración de genes específicos (Idnurm *et al.*, 2017). Una clara ventaja clave que tiene AMT es que se pueden utilizar distintos materiales de partida tales como conidiosporas, micelio, etc. Esta técnica no está recomendada para la obtención de cepas de alta producción de proteínas porque ocurre una integración de una sola copia de T-DNA; en cambio para tener altos niveles de expresión, generalmente se requiere de múltiples copias del gen, lo que puede ser forzado mediante la introducción de una molécula grande de T-DNA conteniendo múltiples copias del gen o cambiando las condiciones y/o el marcador de selección (Michielse, Hooykaas, van den Hondel, & Ram, 2008).

2.6. Mínima Concentración Inhibitoria (MCI)

Cuando se realizan procedimientos de transformación es muy importante tener en cuenta que se debe disponer de un proceso de selección de eliminación del organismo o tejido no transformado. Una forma de realizarlo es exponerlos progresivamente a compuestos como los antibióticos, que inhiben su desarrollo normal, mientras que los organismos que si están

transformados no sufren ninguna alteración ante la presencia del antimicrobiano (Cruz, Acosta, Rodriguez, Leiva, & Alvarado, 2001).

La concentración mínima inhibitoria (MCI) es considerada una prueba ‘gold standard’ para determinar la susceptibilidad que tienen los organismos a los antimicrobianos y es utilizada para juzgar todos los otros métodos de pruebas de susceptibilidad (Andrews, 2001).

2.7. Hipótesis

Las especies de hongos de *Dactylonectria* e *Ilyonectria* se pueden transformar con los genes de la proteína verde (GFP) o roja (tdTomato) fluorescente por el método de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Revisión Bibliográfica

En este proyecto de titulación se investigó sobre protocolos para la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* aplicada en hongos patógenos, las características de los hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* causantes de la enfermedad del pie negro y se indagó información para medir la mínima concentración inhibitoria (MCI) respecto al antibiótico de selección empleado.

3.2. Mantenimiento de los hongos

Las especies de hongos *Dactylonectria torresensis*, *Ilyonectria robusta*, *I. venezuelensis*, e *I. vredenhoekensis* se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE (Figura 8), aisladas e identificadas en estudios anteriores relacionados a la marchitez de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en colaboración del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).



Figura 8 Cepario de hongos, Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

El cepario fue elaborado durante el proyecto de titulación de Iturralde (2017), “Estandarización de una metodología de inoculación de *Ilyonectria* sp, agente causal de la marchitez en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*)”. Los hongos se recuperaron y se cultivaron en cajas Petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar) con Cloranfenicol a 100 ppm para evitar la contaminación de un amplio espectro de bacterias. Al hongo se lo mantuvo incubado durante 15 días en el medio, a temperatura ambiente (~25 °C) y luego fue sub-cultivado.

3.3. Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI)

Para determinar la MCI de Higromicina B, se probó un aislado de cada especie empleando el método de dilución en agar en medio de cultivo YPS (Extracto de levadura, peptona y glucosa) con ciertas modificaciones al protocolo propuesto por Cruz *et al.*, (2001).

La solución stock del antibiótico se preparó a una concentración de 50 mg/mL en agua destilada y se esterilizó con filtros millipore de 0,22 µm. Se emplearon concentraciones crecientes de 5, 15, 30 y 50 µg/mL en el medio de cultivo. Se añadió el antibiótico después de autoclavado el medio de cultivo colocando los volúmenes correctos para obtener las concentraciones deseadas.

$$C_{stock} = \frac{\text{peso del antibiotico}(ug)}{\text{volumen del diluyente (mL)}} * 1000 = (\text{respuesta}) \left(\frac{mg}{mL} \right)$$

C_{stock} : Concentración de la solución stock

Se tomó con la ayuda de un asa estéril una porción del medio original (PDA) con crecimiento del hongo para colocarlo en el centro de la caja Petri y evaluar el posterior crecimiento del hongo en el medio de cultivo a diferentes concentraciones. Se utilizaron tres

cajas por cada concentración de Higromicina B. Además, se empleó medio de cultivo YPS libre de antibiótico como control. Luego se incubaron a temperatura ambiente (~28 °C) durante siete días. Se realizaron evaluaciones cada 24 horas para verificar el crecimiento del hongo. Se tomaron los datos de crecimiento midiendo del diámetro miceliar alrededor de los puntos de inoculación. La concentración de Higromicina B a la cual se inhibió completamente el crecimiento se determinó como la MCI.

3.4. Mantenimiento de *Agrobacterium tumefaciens*

Las cepas AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* se modificaron genéticamente para formar el plásmido binario pOHT-sGFP y se construyó mediante pCAMBIA1300 diseñado con el promotor CaMV35S y el gen *hph* (resistencia a la higromicina). El proceso se realizó mediante la utilización de sitios de restricción que facilitaron el ingreso de estos genes. El otro plásmido, pBHt2-tdTom, fue construido por clonación de un promotor *ToxA* sintetizado comercialmente y el gen tdTomato (Caasi, Walker, Marek, Enis, & Mitchell, 2009). Estos *Agrobacterium* se obtuvieron del Departamento de Entomología y Patogenicidad Vegetal de la Universidad Estatal de Oklahoma. Las cepas se mantuvieron en medio mínimo de *Agrobacterium* (AMM) suplementado con Carbenicilina 50 µg/ml y Kanamicina 50 µg/ml para el mantenimiento del plásmido en las cepas diseñadas con pOHT-sGFP (contiene el gen verde fluorescente) y pBHt2-tdTom (contiene el gen rojo fluorescente).

3.5. Confirmación de los genes GFP y tdTomato por PCR

Se realizó la confirmación de la presencia de los genes de fluorescencia verde (GFP) y rojo (tdTom) mediante una colony - PCR a partir de una muestra de las cajas Petri con el cultivo

de *Agrobacterium tumefaciens* con los respectivos plásmidos. Para ello se utilizó los primers específicos del gen de fluorescencia GFP 5'-GTGAGCAAGGGCGAGGAGCT-3' y 5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCA-3', o los primers específicos para el gen de fluorescencia tdTomato 5-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG-3' y 5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'. Para la amplificación de los genes se tomó en cuenta el número de pares de bases de cada gen con el fin de establecer las condiciones de PCR.

Se tomó con un palillo estéril directamente del medio una colonia de *Agrobacterium* y se la colocó en tubos eppendorf de tapa rosca de 1,5 ml con un volumen de 1 ml de agua destilada estéril. Se calentó en el termobloque a 95°C durante 5 min para romper las colonias y liberar el DNA al exterior y se tomó 3µL del agua con el DNA (Bergkessel & Guthrie, 2013). Para la ejecución de la PCR se realizó una master mix.

Los primers se diluyeron del original para obtener una concentración de 10 µM por cada uno. El tamaño de cada gen es importante para desarrollar las condiciones de PCR, el gen GFP y el gen tdTomato tienen un tamaño de 717 y 1431 pares de bases (pb) respectivamente y las condiciones para ellos son las siguientes (Tabla 3):

Tabla 3
Condiciones de PCR para el gen GFP y tdTomato

	Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión Final	Conservación
Temperatura °C	95	95	49	72	72	4-18
Tiempo	2 min	20 seg	30 seg	GFP: 60 seg tdTom: 1 min 25 seg	5 min	20 min

3.6. Transformación del hongo

Los hongos cultivados en medio PDA bajo condiciones óptimas en cinco días fueron utilizados para el proceso de transformación. Se usó un sacabocados estéril para sacar un pedazo de agar de 6 mm de diámetro del borde externo del crecimiento del hongo y se lo almacenó en tubos de 1,5 mL con tapa rosca. Se añadió 1 mL de medio líquido IMM y dos beads de vidrio de 3mm para realizar el bead-beating. Para la obtención de esporas de los hongos, se utilizó medio PDA con crecimiento del hongo de aproximadamente entre 5 a 25 días. Se colocó una solución de agua estéril sobre el crecimiento, se lo raspó con un portaobjetos autoclavado, se filtró el contenido y se recogió el líquido en tubos falcon. Una vez realizado el bead-beating y obtenidas las esporas, se tomó una alícuota de micelio de 50 μ L y se la vertió en una caja Petri con medio PDA de 9 cm para estimar el número de unidades formadoras de colonias (UFC's) por mililitro. La concentración de esporas se determinó con una Cámara de Neubauer. Los fragmentos de micelio y esporas viables se utilizaron para la transformación por *Agrobacterium*.

Una vez cultivada *Agrobacterium* en medio AMM se la trasladó a 5 mL de medio líquido de AMM en tubos falcon, se la incubó durante 2 a 3 d a 28°C en agitación de 150 rpm, o hasta obtener turbidez. Posteriormente se realizó una dilución de 1/10 del cultivo y se midió su densidad óptica con el espectrofotómetro a 600 nanómetros, se ajustó esta densidad a 0,2 con medio líquido IMM (suplementado con Acetosyringona 0,2M), y se dejó incubar a 28°C durante toda la noche. Al siguiente día se volvió a realizar la dilución 1/10 con medio líquido IMM y se ajustó la densidad óptica a 0,2. La relación entre la densidad óptica y la concentración se indica en la siguiente formula:

$$OD_{600} = 1.0 = 1 * 10^8 \frac{\text{células}}{\text{mL}}$$

Fuente: (Guo, Zhang, Meng, & Jiang, 2012)

Por lo tanto:

$$OD_{600} = 0.2 = 0.2 * 10^8 \frac{\text{células}}{\text{mL}}$$

OD: Densidad óptica (Guo, Zhang, Meng, & Jiang, 2012).

Se realizó una mezcla de las dos suspensiones de *Agrobacterium* inducida y del hongo 1:1 (volumen:volumen) en un microtubo estéril, con un volumen de 100 µL de *Agrobacterium* y 100 µL de la suspensión del hongo. Se cultivó aproximadamente 200 µL de esta mezcla sobre la superficie de una membrana de nitrocelulosa estéril que se colocó dentro de las cajas Petri con medio IMM suplementado con Carbenicilina 50 µg/mL, Kanamicina a 50 µg/mL y Acetosyringona 200µM. Se co-incubó a 20°C entre 48 a 72 h hasta que aparecieron colonias.

3.7. Selección de transformantes

Las membranas de nitrocelulosa fueron transferidas a medio YPS suplementado con Higromicina B a 50 µg/ml, Cefotaxima a 200 µg/ml y Timentina a 100 µg/ml, colocando la membrana volteada hacia la superficie donde se cultivó el hongo y el *Agrobacterium*. Se incubó a temperatura ambiental o en una incubadora oscura hasta que se formen colonias durante 3-14 d. Una vez obtenidos los hongos transformados, se los sub-cultivó tres veces en medio selectivo con Higromicina B, luego se sub-cultivó en medio no selectivo para determinar la estabilidad de la transformación y finalmente se volvió a cultivar en medio selectivo.

3.8. Cálculo de la frecuencia de transformación

Para determinar el número obtenido de transformantes se empleó el uso de luz UV o microscopía de fluorescencia sobre el medio de selección para observar la expresión de los genes de fluorescencia sobre las colonias transformadas. Se puede emplear la siguiente fórmula para determinar la eficiencia de transformación:

$$ET = \frac{\text{promedio de colonias transformadas obtenidas}}{\text{concentración total del material utilizado}} * 100$$

ET: Eficiencia de transformación

3.9. Análisis Estadístico

3.9.1. Diseño Experimental

Para este trabajo se tomó todos los aislados del género *Dactylonectria* e *Ilyonectria*, haciendo un total de cuatro aislados de hongos diferentes como grupo experimental. Se evaluó el crecimiento de los hongos a diferentes concentraciones del antibiótico higromicina B a 5, 15, 30 y 50µg/mL y el medio sin atibiótico como control negativo. Cada uno de los ensayos se repitió tres veces. El diámetro de crecimiento se midió cada 24 h durante cinco días para determinar el MCI de los hongos con este antibiótico. Adicionalmente se calculó la eficiencia de las transformación a través de AMT utilizando como variables independientes al micelio y esporas de los hongos.

3.9.2. Unidad Experimental

Los tratamientos para determinar la MCI contaron con 60 unidades experimentales (cada porción de medio con hongo utilizado para medir su crecimiento)

Para la transformación se contó con ocho unidades experimentales (cuatro pedazos de micelio y cuatro soluciones con esporas)

3.9.3. Análisis

El análisis para determinar la MCI se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia del 95% (los datos indicados son el promedio de las repeticiones realizadas con su desviación estándar) donde se analizaron los diferentes tratamientos para las diferentes especies, al igual que la variación del crecimiento de los hongos utilizando el software estadístico INFOSTAT. Las tablas de los análisis son mostradas en anexos.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Crecimiento de los hongos

Los hongos de las especies *Dactylonectria* e *Ilyonectria* obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología, realizado por Iturralde (2017), se aislaron y crecieron en medio PDA a temperatura ambiente (~25°C) durante un periodo de cinco días para la obtención de micelio. Para conseguir esporas se utilizaron cultivos entre 5 y 25 días. Las colonias de los hongos produjeron oscurecimiento del medio a su alrededor, mostraron bordes irregulares, crecimiento radial y aspecto seco. La coloración de las colonias varió desde tonalidades amarillas hasta el color marrón (Figura 9).

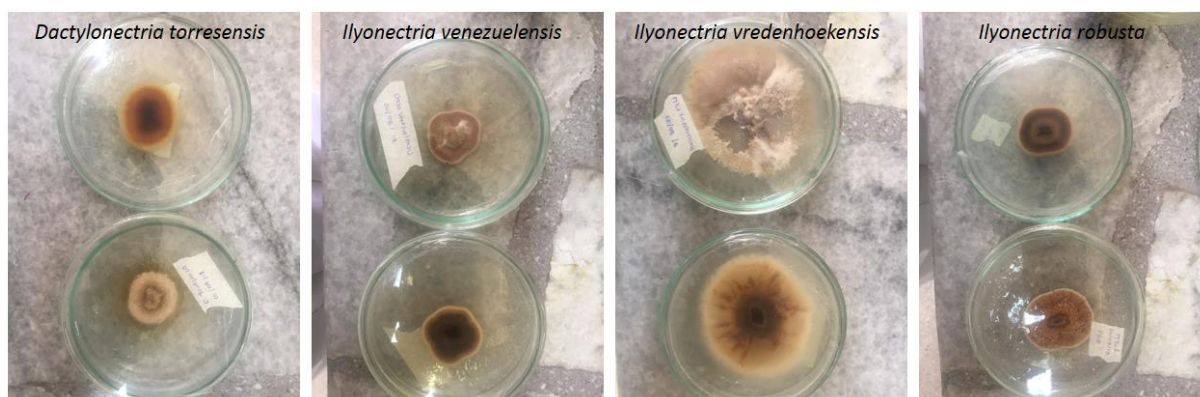


Figura 9 Crecimiento fúngico de 15 días de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria*.

4.2. Caracterización microscópica de los hongos

Mediante la tinción con azul de lactofenol se observaron las características microscópicas de las especies de *Dactylonectria* e *Ilyonectria* donde apreciaron macroconidias, microconidias y clamidosporas (Figura 10).

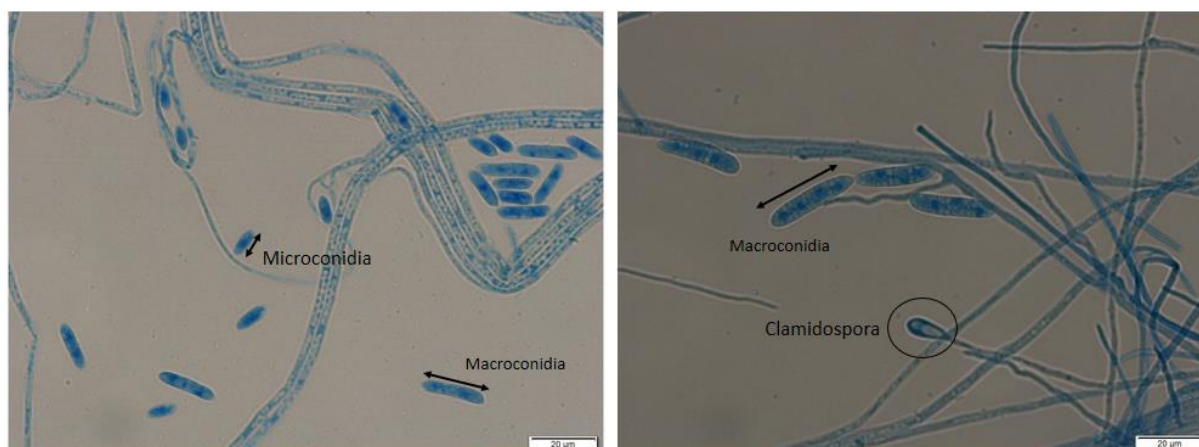


Figura 10 Macro, microconidias y clamidosporas a 60X, barra representada 20µm.

Fotografía tomada por: Jessica Sánchez

4.3. Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI)

Para la determinación de la MCI se utilizó el medio de crecimiento YPS con diferentes concentraciones del antibiótico de selección Higromicina B de 5, 15, 30, 50 µg/mL; con tres repeticiones de cada una de las especies para cada uno de los diferentes tratamientos.

El crecimiento se desarrolló normalmente en el medio YPS control en todas las especies de hongos, el medio YPS 5 y 15 µg/mL muestra que aún existe crecimiento de los hongos, aunque más lento, en cambio en los medios YPS 30 y 50 µg/mL se pudo apreciar con el pasar de los días que los hongos tienen sensibilidad al antibiótico por lo que no mostraron crecimiento (Figura 11).

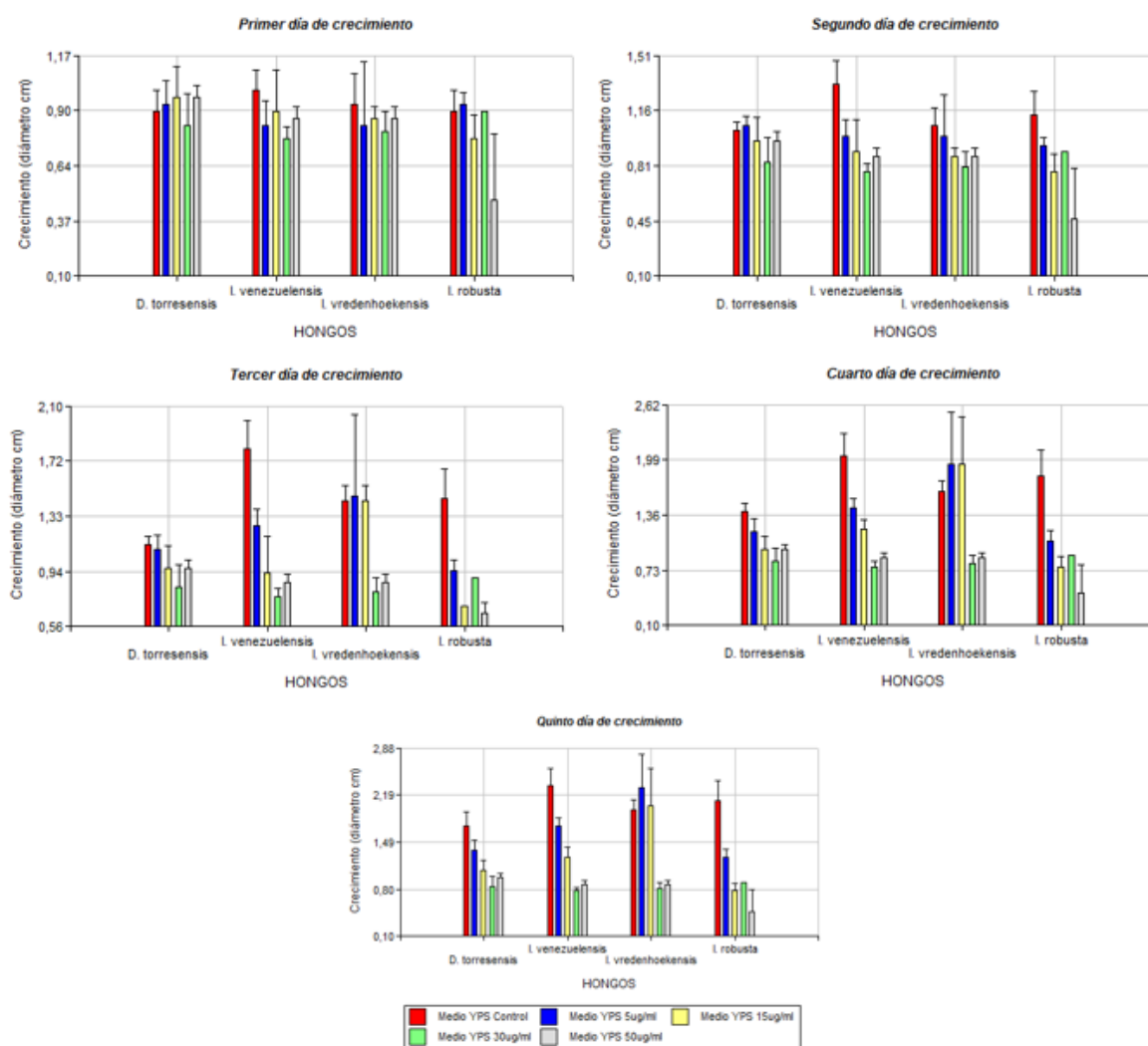


Figura 11 Crecimiento fúngico a diferentes concentraciones de Higromicina B.

4.4. Crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* fue donada por el departamento de Entomología y Patologías Vegetales de la Universidad de Oklahoma esta cepa se reactivó en medio caldo peptona a 28°C en agitación durante una semana y posteriormente cultivada en medio AMM suplementado con los antibióticos necesarios para la conservación del plásmido. El cultivo se realizó a temperatura ambiente (~25 – 28 °C) durante tres días.

El crecimiento de AGL1 en medio AMM fueron de color blanco hueso, con bordes irregulares y consistencia cremosa (Figura 12).

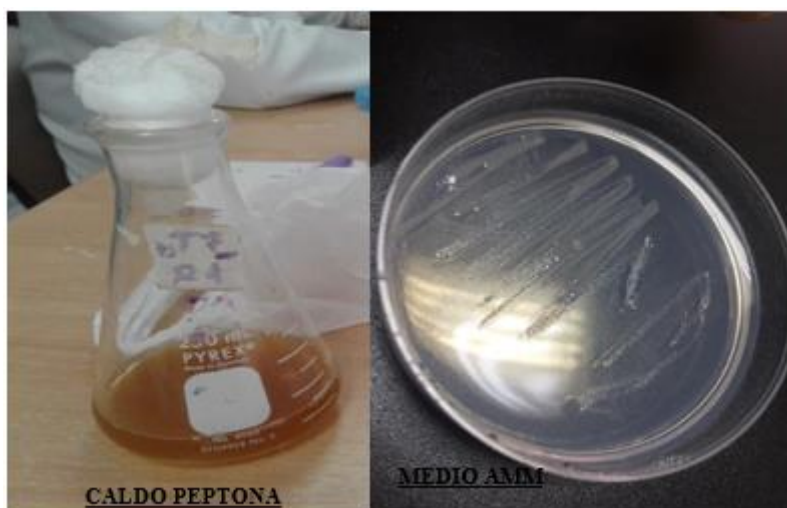


Figura 12 Cultivo de *A. tumefaciens* en caldo peptona y medio sólido AMM.

4.5. Caracterización microscópica de la bacteria

Se empleó la tinción Gram para determinar las características microscópicas del cultivo de *A. tumefaciens*. La bacteria presentó forma de bacilo, de tipo Gram negativo (Figura 13).

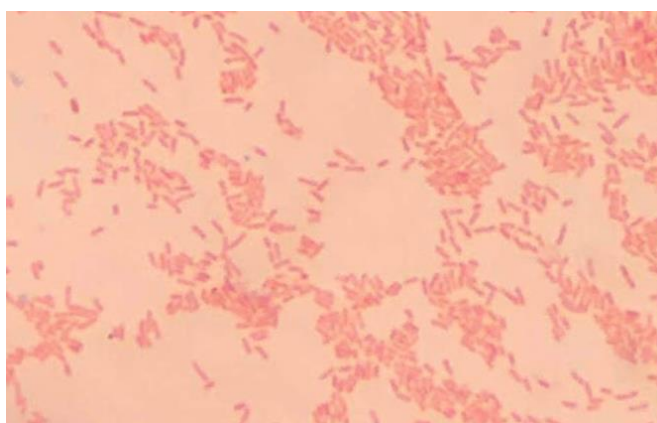


Figura 13 Tinción Gram de la cepa bacteriana AGL1 de *A. tumefaciens* (100X).

4.6. Confirmación de los genes GFP y tdTomato por PCR

El procedimiento se realizó mediante una colony – PCR, por la cual se obtiene el DNA directamente de las colonias bacterianas sin la necesidad de realizar un procedimiento de extracción. Se corrió una electroforesis donde se confirmó la amplificación y presencia de los genes de interés con base en el tamaño de la banda obtenida (Figura 14).

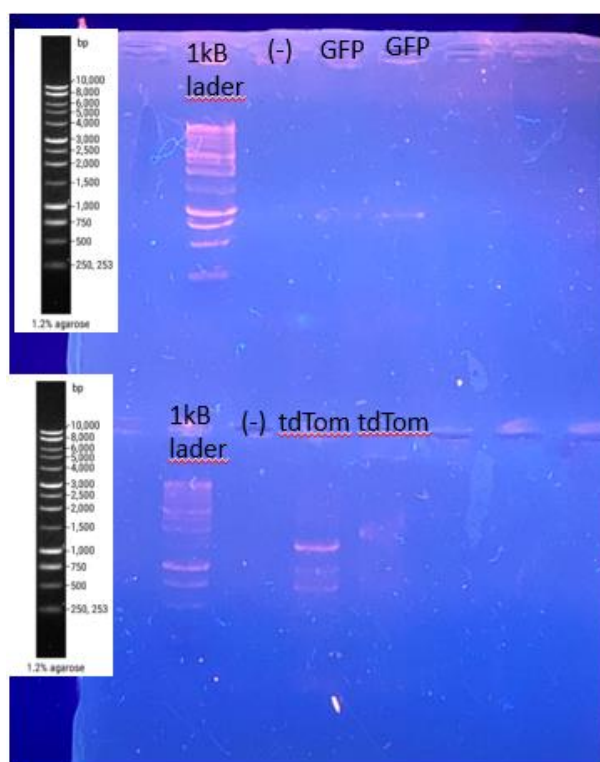


Figura 14 Gel de electroforesis de los genes GFP y tdTom bajo luz UV.

4.7. Co-cultivo de los hongos y la bacteria

Los co-cultivos en medio IMM se realizaron con las concentraciones de los hongos obtenidos a partir de los procesos de bead-beating en el caso de micelio (Tabla 4) y raspado del medio de cultivo en el caso de esporas (Tabla 5).

Tabla 4*Concentración miceliar de los hongos a ser transformados.*

HONGOS	CONCENTRACIÓN MICELIAR (UFC/mL)
<i>D. torresensis</i>	$6 * 10^4$
<i>I. venezuelensis</i>	$1,1 * 10^7$
<i>I. vredenhoekensis</i>	$4,8 * 10^6$
<i>I. robusta</i>	$2 * 10^6$

Tabla 5*Concentración de esporas de los hongos a ser transformados.*

HONGOS	CONCENTRACIÓN DE ESPORAS (UFC/mL)
<i>D. torresensis</i>	$1,6 * 10^5$
<i>I. venezuelensis</i>	$1,277 * 10^6$
<i>I. vredenhoekensis</i>	$8,35 * 10^6$
<i>I. robusta</i>	$5,23 * 10^6$

La concentración utilizada para *Agrobacterium* en el co-cultivo fue determinada a través de espectrofotometría de los medios a una densidad óptica de 600nm.

La concentración final de *Agrobacterium tumefaciens* a ser utilizada en el co-cultivo fue de $2*10^7$ células/mL. Este valor fue determinado mediante una relación entre los valores previamente medidos por Guo *et al.*, (2012) para esta OD. Después de 48h de co-cultivo a temperatura ambiente empezaron a aparecer colonias en la membrana (Figura 15).

**Figura 15** *Traspaso de co-cultivo al medio de selección.*

4.8. Selección de los hongos transformados

El medio de selección YPS suplementado con los respectivos antibióticos para la selección de transformados no presentó crecimiento o formación de colonias de las cuatro cepas de hongos durante un periodo de cultivo de 15 días a 20°C y 28°C.

A pesar de esto, se obtuvo otra especie de hongo transformado que no pertenecía a ninguno de los hongos utilizados en este trabajo (Figura 16).



Figura 16 Hongo transformado (Penicillium sp.) bajo luz UV.

4.9. Eficiencia de transformación de los hongos

La eficiencia de transformación para cada una de las cuatro cepas de hongos fue nula, a pesar de haber sido realizada bajo diferentes temperaturas (20 y 28 °C) de co-cultivo con la intención de aumentar la probabilidad de obtener transformados.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

5.1. Caracterización macro y microscópica de los hongos.

Los hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* utilizados en el presente trabajo como candidatos a transformación genética concordaron con la descripción morfológica reportada por Ferrer (2015) en la cual menciona que sus colonias presentan micelio algodonoso de aspecto variable con tonalidades que van desde blanco, crema, amarillo, naranja hasta marrón. Los hongos fueron cultivados en medio sólido PDA (papa dextrosa agar).

Los hongos *Dactylonectria* e *Ilyonectria* están caracterizados como géneros anamorfos semejantes a *Cylindrocarpon* y están directamente asociados como la causa de la enfermedad del pie negro. Todavía no se ha encontrado reportes de que puedan llegar a ser patógenos para los humanos o animales, solo han sido descritos como patógenos de plantas leñosas (Lombard, Bezuidenhout, & Crous, 2013). La descripción microscópica de los hongos indica la presencia de clamidosporas con forma de un globo marrón, macro y microconidias de forma ovalada y alargada llegando a presentar hasta septos, igual descripción dada por Iturralde (2017).

5.2. Determinación de la mínima concentración inhibitoria (MCI)

Para llegar a obtener un organismo modificado genéticamente es importante que se cumplan algunas condiciones: primero, se debe tener un método de regeneración que permita volver a obtener el microorganismo a partir de una o pocas células; segundo, se debe poseer un protocolo que ayude a la inserción de material genético foráneo en las células de interés; tercero, el cual debe estar acompañado de un sistema de selección eficiente para lograr diferenciar las

células que han sido transformadas o que contienen el o los genes de interés (Kairúz Hernández-Díaz *et al.*, 2013).

Al momento de establecer una tecnología que permita la transformación genética es recomendable desarrollar un método para seleccionar las células transformadas de las no transformadas, ya que la probabilidad de obtener células transformadas sin la utilización de marcadores de selección es baja (Chong-Pérez *et al.*, 2008).

Al realizar una evaluación de los cultivos se observó que, en un tiempo de cinco días, ninguno de los cultivos de hongos dio indicio de crecimiento a la concentración de 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$, por lo que se determinó la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ como la MCI. Las concentraciones de 5 y 15 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina permitieron el crecimiento de los hongos silvestres (solo se disminuyó su tasa de crecimiento) por lo que fueron descartadas para ser utilizadas en el proceso de selección de los transformados.

El test de Kruskal-Wallis ($p=0,05$) realizado durante el primer y segundo día de crecimiento indicó que no existe diferencias en el crecimiento inicial en los cultivos de todos los hongos, excepto para YPS con Higromisina B a 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$ donde no se tuvo crecimiento de los hongos (Anexo 6 y 7). El test realizado durante el tercer, cuarto y quinto día muestra un valor p menor a 0,05 indicando que hay una diferencia en el crecimiento de los hongos para los medios control, 5 y 15 $\mu\text{g/mL}$, debido a que cada género de hongo tiene su propia tasa de crecimiento, y aunque sea similar durante los primeros días la diferencia se puede calcular realizando una toma de datos con el pasar del tiempo (Anexo 8, 9 y 10).

Otros autores como Caasi *et al.*, (2009) mencionan el uso de la concentración de higromicina B a 50 $\mu\text{g/mL}$ para la selección de transformados, incluso en otros estudios de transformación se ha llegado a utilizar concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ como Groot *et al.*, (1998).

Aun así, Michielse *et al.*, (2008) indica que la concentración del agente de selección debe ser determinado empíricamente para cada una de las nuevas especies que se desea transformar.

5.3. Caracterización macroscópica y microscópica de *Agrobacterium tumefaciens*

Las colonias de *A. tumefaciens* AGL1 que crecieron en medio AMM fueron de aspecto cremoso y color blanco hueso, morfología congruente con la descripción de Alippi *et al.*, (2011), quienes detallaron más características morfológicas de esta bacteria al ser cultivada en distintos medios de cultivo con el objetivo de realizar un diagnóstico de las cepas patogénicas. Microscópicamente se confirmó que la cepa con la que se estaba trabajando era un bacilo Gram negativo.

5.4. Confirmación de los genes de fluorescencia

La utilización de una colony - PCR es una técnica rápida utilizada regularmente para determinar la presencia o ausencia de insertos de DNA en las construcciones de plásmidos de cultivos celulares bacterianos, líneas celulares y cultivos de levaduras, debido a que a temperaturas altas se produce la liberación de los plásmidos de la célula (Walch, Knapp, Rainer, & Peintner, 2016). Por eso esta técnica era conveniente usarla para realizar la confirmación de los genes de fluorescencia en los plásmidos dentro de la cepa de *A. tumefaciens*.

El resultado obtenido de la colony - PCR fue la amplificación de las bandas de los respectivos genes de fluorescencia, los cuales son utilizados como genes marcadores en biología molecular. Para GFP, la banda estimada fue alrededor de los 700 bp en la visualización con el marcador molecular de 1kb, y el gen tdTomato presentó una banda aproximada a los 1400 bp identificadas visualmente, lo que concuerda con el tamaño del gen que tiene un tamaño

de 1431 bp, por lo que se concluyó que los plásmidos en la bacteria de *A. tumefaciens* contienen estos genes de interés para utilizarlos en el proceso de transformación.

5.5. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (AMT)

AMT ha sido utilizada ampliamente en los avances genéticos para la generación de librerías de diferentes cepas gracias al proceso aleatorio de inserción de genes que posee este mecanismo, además se le ha dado usos alternativos a esta herramienta como es en la genética reversa lo que ha implicado la generación de mutantes con la supresión de genes y interrupciones, o habilitando genes funcionales para estudiar el rol que poseen (Idnurm *et al.*, 2017).

Gracias al descubrimiento de diseño de vectores utilizados para la transformación genética en plantas mediante el uso de AMT, no solo se ha permitido la inserción de nuevos genes y los elementos reguladores para que T-DNA pueda genera plantas de importancia agronómica, sino que también se ha llevado a áreas como la micología, en donde se ha transformado algunos hongos como: *Aspergillus niger*, *Fusarium venantum*, *Trichoderma reesei*, entre otros, e incluso hasta células humanas. Esto se ha realizado con la finalidad de generar estudios moleculares como el marcaje de genes (Valderrama, Arango, & Afanador, 2005).

Para el desarrollo de AMT en este estudio se llevó a cabo una secuencia de pasos que no dieron resultados favorables para la transformación de los hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* a pesar de que los protocolos se fueron corrigiendo bibliográficamente. Según Michielse *et al.*, (2008), los principales factores por los que no se pueden obtener células de hongo transformadas son la utilización de un material fúngico inapropiado, una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* inadecuada, el uso de membranas

inadecuadas, un ratio de mezcla desproporcionada entre el hongo y *Agrobacterium*, o condiciones sub óptimas de co-cultivo.

Los hongos causantes del pie negro tienen un crecimiento lento en medio PDA de alrededor de 25 días para cubrir completamente la caja Petri de 90 mm de diámetro (Ferrer, Abad, & Armengol, 2015). Debido a que el protocolo de transformación requería la utilización de cultivos jóvenes en crecimiento activo se optó por utilizar material fúngico de cinco días de crecimiento para emplearlo como material de entrada, lo cual no presentó resultados favorables. Otros autores, como Michielse *et al.*, (2008); Nyilasi *et al.*, (2005); y Caasi *et al.*, (2009), utilizaban crecimientos más jóvenes, de alrededor de cinco días para el proceso de transformación, lo cual conllevó en este trabajo a la utilización de material de cinco días para la transformación en el caso de micelio.

Michielse *et al.*, (2008) describen en su publicación un protocolo para la utilización de esporas en el proceso de transformación. Otros autores, como Li, Tang, Lin, & Cai (2017), mencionan que el material para empezar la AMT puede ser protoplastos, esporas, micelio y tejido del hongo. Por lo que también se realizó la extracción de esporas del cultivo de los hongos para agregar al método de transformación a ser ejecutado. Para la obtención de esporas se utilizan cultivos de una a tres semanas de edad (Lombard, Bezuidenhout, & Crous, 2013).

El método de AMT puede ser utilizado con la generación de protoplastos a partir de los hongos como material inicial para comenzar el proceso de transformación, esto se ha realizado en estudios de Groot *et al.*, (1998); Nyilasi *et al.*, (2008); sin embargo, como menciona Idnurm *et al.*, (2017), una de las ventajas que tiene el método de AMT es que se puede eliminar la necesidad de remover la pared celular para la obtención de protoplastos, además de que la obtención de protoplastos es un método que ya ha sido establecido específicamente para determinadas especies. Para otras especies, no han sido aún ampliamente estudiadas a

profundidad como el caso de los hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* y puede convertirse en un proceso difícil y de éxito variable, además de que los hongos presentan una gran variedad de paredes celulares y difieren en cada uno de los estadios del crecimiento y desarrollo. Incluso este proceso no está apoyado ya que existe un grado de dificultad al obtener la enzima adecuada para degradar el tipo de pared celular según sea el caso.

Durante el trabajo realizado se pudo notar una resistencia del hongo a la AMT que pudo deberse al poco conocimiento de la estructura interna del micelio para estos géneros que no han sido reportados todavía por otros autores, aunque Flores, Marek, Anderson, Mitchell, & Walker, (2015) mencionan que una de las razones por las que sus hongos de estudio no pudieron ser transformados fue debido a que el micelio de la especie era más melanizado que su control positivo.

Caasi *et al.*, (2009) realizó la transformación exitosa del hongo con la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*, al igual que Zhong *et al.*, (2007) y Nyilasi *et al.*, (2005). Li *et al.*, (2017) menciona otro tipo de cepas que pueden ser más eficientes dependiendo del hongo que se quiera transformar, entre ellas, LBA1100 y EHA105 que podrían ser modificadas y utilizadas para la transformación de los géneros de hongos objeto de este estudio.

Michielse *et al.*, (2008) menciona que el uso de membranas puede ser un factor importante a la hora de obtener transformados y sugiere otros tipos como: papel filtro, hojas de celofan o filtros PVDF. Sin embargo, Groot *et al.*, (1998) que han utilizado membranas de nitrocelulosa, como se ha empleado en este estudio, no mencionan el efecto de este u otro material en la eficiencia de transformación, es decir que estos materiales solo sirven de soporte para co-cultivar y luego poder realizar la selección de las células transformadas.

Prácticamente la AMT es ejecutada en la fase de co-cultivo del hongo con el *Agrobacterium* que contiene un plásmido Ti modificado con los genes de interés. La mayoría de los protocolos difieren poco entre una y otra especie de hongos, aunque si se quiere llegar a obtener una transformación exitosa, se necesita de la optimización de varios factores como la calidad y la cantidad del inóculo del hongo o incluso la duración y temperatura del co-cultivo (Papp *et al.*, 2010). En la AMT es muy importante llegar a un balance entre el crecimiento de la bacteria y el hongo; por lo tanto, las condiciones de co-cultivo, especialmente la duración y la temperatura son importantes.

Las condiciones aplicadas para el co-cultivo en este estudio fueron a temperatura ambiente y a 20°C aproximadamente, teniendo una duración de dos a cuatro días, hasta apreciar colonias para realizar la transferencia de los cultivos. Ninguna tuvo éxito. Michielse *et al.*, (2008) menciona que este paso es muy crítico ya que el número de transformados depende de esta fase, y expresa que las temperaturas van desde los 20 a 28°C y los periodos de incubación son entre 16 y 96 h. Aún así, las temperaturas más bajas son beneficiosas para que *A. tumefaciens* pueda transferir su T-DNA.

Otro factor importante que afecta directamente es la adición de Acetosyringona durante el periodo de co-cultivo, debido a que este compuesto fenólico es el inductor de los genes de virulencia de *Agrobacterium*, necesarios para la transferencia de T-DNA. Los estudios de Hooykaas & Beijersbergen (1994) corroboran la importancia de este compuesto para el proceso de transferencia y además indican el mecanismo de activación de los genes que interviene en el procesos de transformación.

Los hongos transformados con los genes de fluorescencia han sido ampliamente estudiados para el entendimiento de enfermedades vegetales como menciona Caasi *et al.*, (2009) debido a que permiten la visualización directa de la infección *in situ* de la planta, con la

utilización de las proteínas fluorescentes como GFP como el reportero más frecuente al momento de observar patógenos en plantas. Este podría facilitar las investigaciones citológicas durante el desarrollo, patogenicidad y progresión de las enfermedades vegetales.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

La mínima concentración inhibitoria de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* es 30µg/mL de higromicina B referente para futuras investigaciones en transformación.

Dactylonectria e *Ilyonectria* presentaron resistencia (100%) a la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Se comprobó que el método de transformación ejecutado funcionó, ya que se transformó *Penicillium* sp. paralelamente al trabajo.

Se rechazó la hipótesis planteada durante la ejecución de este trabajo

El tercer objetivo no pudo ser completado por ser dependiente del segundo

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Utilizar cepas diferentes de *Agrobacterium tumefaciens* para volver a ensayar el proceso de transformación de los hongos por AMT.

Controlar los tiempos y temperaturas de co-cultivo al momento de realizar un proceso de transformación mediado por *Agrobacterium* ya que es un paso crítico muy importante de sobrellevar en el ensayo.

Utilizar una especie cercana a los hongos utilizados en este estudio que ya haya sido reportada como transformada para optar por la opción de convertirla en un control positivo para el proceso de AMT, además de utilizar mayor número de hongos pertenecientes a *Cylindrocarpon* para aumentar las probabilidades de obtener transformados.

CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA

- Agustí-Brisach, C., González-Domínguez, E., Pérez-Sierra, A., & Leon, M. (2015). *Characterization of Cylindrodendrum, Dactylonectria and Ilyonectria isolates associated with loquat decline in Spain, with description of Cylindrodendrumalicantium sp. nov.* Valencia-España: Eur J Plant Pathol.
- Alaniz, S. (2008). *Caracterización y control de Cylindrocarpon spp. agente causal del pie negro de la vid.* Universidad Politécnica de Valencia: Tesis Doctoral.
- Alippi, A., López, A., & Balatti, P. (2011). *Métodos para la detección de Agrobacterium a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua.* Buenos Aires: Revista argentina de microbiología.
- Andrade, C. (2012). *Evaluación del efecto de la aplicación de trichoderma harzianum y trichoderma viride para el control de marchitez en mora de castilla (Rubus glaucus Benth).* Riobamba - Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Andrews, J. (2001). *Determination of minimum inhibitory concentrations.* Birmingham: Journal of Antimicrobial Chemotherapy.
- Bergkessel, M., & Guthrie, C. (2013). *Colony PCR.* San Francisco: Laboratory Methods in Enzymology: DNA.
- Brayford, D. (1993). *Cylindrocarpon.* In: *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi.* St. Paul - USA: APS Press.
- Caasi, O., Walker, N., Marek, S., Enis, J., & Mitchell, T. (2009). *Infection and Colonization of Turf-Type Bermudagrass by Ophiosphaerella herpotricha Expressing Green or Red Fluorescent Proteins.* Stillwater - Oklahoma: Ecology and Epidemiology.
- Cárdenas, Y. (2013). *Evaluación agronómica y fenología de dos clones de mora sin espinas (rubus glaucus benth) para determinar su potencial comercial.* Tumbaco - Ecuador: Universidad Central del Ecuador.
- Carlucci, A., Lops, F., Mostert, L., Halleen, F., & Raimondo, M. (2017). *Occurrence fungi causing black foot on young grapevines and nursery rootstock plants in Italy.* Apulia - Italia: Phytopathologia Mediterranea.
- Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, K., Pino, H., & Espinoza, W. (2004). *Cylindrocarpon destructans var. destructans and Neonectria discophora var. rubi associated with black foot rot on blackberry (rubus glaucus benth.) in Merida, Venezuela.* Caracas: Interciencia.
- Chen, N., Hsiang, T., & Goodwin, P. (2002). *Use of green fluorescent protein to quantify the growth of Colletotrichum during infection of tobacco.* Ontario - Canada: Journal of Microbiological Methods.

- Chong-Pérez, B., Pérez-Alonso, N., Occeguera, Z., Capote, A., Pérez, A., & Jiménez, E. (2008). *Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Geneticina G418 en el proceso de formación de callos de Digitalis purpurea L.* Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Cruz, M., Acosta, M., Rodríguez, E., Leiva, M., & Alvarado, Y. (2001). *Determinación de la mínima concentración inhibitoria (MCI) de Higromicina B para su utilización como agente de selección en la transformación de Mycosphaerella fijiensis*. Cuba.
- Delgado, F. (2012). *Manejo orgánico del cultivo de mora (Rubus sp.)*. Cuenca - Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Ferrer, M., Abad, P., & Armengol, J. (2015). *Identificación de anamorfos de tipo Cylindrocarpon procedentes de viveros forestales en España*. Valencia: Universitat Politècnica de València.
- Flores, F., Marek, S., Anderson, J., Mitchell, T., & Walker, N. (2015). *Infection and Colonization of Several Bermudagrasses by Ophiosphaerella korrae*. Oklahoma: Phytopathology.
- Fourie, P., Halleen, F., & Crous, P. (2005). *Black foot disease of grapevine: Summary of research in South Africa*. Paices Bajos: WineLand.
- Groot, M., Bundock, P., Hooykaas, P., & Beijersbergen, A. (1998). *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi*. Nat Biotechnol. doi:10.1038/nbt0998-839
- Guo, M., Zhang, Y., Meng, Z., & Jiang, J. (2012). *Optimization of factors affecting Agrobacterium-mediated transformation of Micro-Tom tomatoes*. Shenyang - China: Genetics and Molecular Research. doi:10.4238/2012.March.16.4
- Halleen, F., Schroers, H., Groenewald, J., Rego, C., Oliveira, H., & Crous, P. (2006). *Neonectria liriodendri sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines*. Portugal: Stud Mycol.
- Hallen, F., Schroers, H., Groenewald, J., & Crous, P. (2004). *Novel species of Cylindrocarpon (Neonectria) and Campylocarpon gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (Vitis spp.)*. Sudafrica: Studies in Mycology.
- Hoekema, A., Hirsch, P., Hooykaas, P., & Schilperoort, R. (1983). *A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid*. Nature. doi:https://doi.org/10.1038/303179a0
- Hooykaas, P., & Beijersbergen, A. (1994). *The virulence system of Agrobacterium tumefaciens*. Phytopathol.
- Idnurm, A., Bailey, A., Cairns, T., Elliott, C., Foster, G., Ianiri, G., & Jeon, J. (2017). *A silver bullet in a golden age of functional genomics: the impact of Agrobacterium - mediated transformation of fungi*. Melbourne - Australia: Fungal Biology and Biotechnology.

- INIAP. (2018). *Fruticultura*. Recuperado del informe de fruticultura. Obtenido de <http://www.iniap.gob.ec/pruebav3/fruticultura/#>
- Iturralde, P. (2017). *Estandarización de una metodología de inoculación de Ilyonectria sp., agente causal de la marchitez en plantas de mora de castilla (Rubus glaucus)*. Sangolqui.
- Kairúz Hernández-Díaz, E., Perez Alonso, N., Pérez, A., Pérez, A., Jimenez, E., & Chong-Pérez, B. (2013). *Minimal lethal concentration of hygromycin B in calli induction and shoot multiplication process of Digitalis purpurea L.* Cuba: ResearchGate.
- Lee, L., & Gelvin, S. (2008). *T-DNA Binary Vectors and Systems*. Indiana: Plant Physiology.
- Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017). *Methods for genetic transformation of filamentous fungi*. Fuzhou - China: Microbial Cell Factories. doi:10.1186/s12934-017-0785-7
- Lombard, L., Bezuidenhout, C., & Crous, P. (2013). *Ilyonectria black foot rot associated with Proteaceae*. The Netherlands: Australasian Plant Pathology. doi:10.1007/s13313-012-0188-5
- Lorang, J. M., Tuori, R. P., Martinez, J. P., Sawyer, T. L., Redman, R. S., Rollins, J. A., . . . Ciuffetti, L. M. (2001). *Green fluorescent protein is lighting up fungal biology*. Applied and environmental microbiology.
- MAGAP. (2013). *La mora de castilla*. Quito - Ecuador.
- Michielse, C., Hooykaas, P., van den Hondel, C., & Ram, A. (2008). *Agrobacterium-mediated transformation of the filamentous fungus Aspergillus awamori*. Amsterdam: Nature. doi:10.1038/nprot.2008.154
- Mullins, E., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D., & Kang, S. (2001). *Agrobacterium-Mediated Transformation of Fusarium oxysporum: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer*. The American Phytopathological Society. doi:<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.2.173>
- Naranjo, P., Taco, C., & López, O. (2016). *Cadenas integrales productivas para producción*. Guaranda - Bolívar: Revista Ciencia UNEMI.
- Nyilasi, I., Acs, K., Papp, T., & Vágvölgyi, C. (2005). *Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Mucor circinelloides*. Hungaria: Folia Microbiol.
- Nyilasi, I., Papp, T., Csernetics, A., & Vágvölgyi, C. (2008). *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the zygomycete fungus Backusella lamprospora*. Hungaria: Journal of Basic Microbiology.
- Papp, T., Csernetics, A., Nyilasi, I., Ábrók, M., & Vágvölgyi, C. (2010). *Genetic transformation of zygomycetes fungi*. Springer.
- Rodriguez, L., Chi, B., Acereto, P., & Echeverria, S. (2004). *La bacteria Agrobacterium tumefaciens como herramienta biotecnológica*. Yucatán: ResearchGate.

- Sangwan, R., Ochatt, S., Nava-Saucedo, J., & Sangwan, B. (2012). *T-DNA insertion mutagenesis*. Plant Mutation Breeding and Biotechnology.
- Solis-Ramos, L., González-Estrada, T., Rodríguez-Zapata, L., Ku-Gonzales, A., Castaño, E., & La Serna, D. (2010). *47 The mechanism infection of Agrobacterium tumefaciens The Mechanism Infection of Agrobacterium tumefaciens*. . Costa Rica: ResearchGate.
- Valderrama, F., Arango, I., & Afanador, K. (2005). *Transformación de plantas mediada por Agrobacterium: "Ingeniería genética natural aplicada"*. Medellín: Agron.
- Walch, G., Knapp, M., Rainer, G., & Peintner, U. (2016). *Colony-PCR Is a Rapid Method for DNA Amplification of Hyphomycetes*. Austria: Journal of Fungi.
- Weber, R., & Entrop, A. (2017). *Dactylonectria torresensis as the main component of the black root rot complex of strawberries and raspberries in northern Germany*. Deutschland: Springer - Verlag GmbH.
- Zhang, H., Wu, Z., Wang, C., Li, Y., & Xu, J. (2014). *Germination and infectivity of microconidia in the rice blast fungus Magnaporthe oryzae*. Indiana - USA: Nature Communications.
- Zhong, Y., Wang, T., & Jiang, Q. (2007). *Agrobacterium-mediated transformation (AMT) of Trichoderma reesei as an efficient tool for random insertional mutagenesis*. Republic of China: Fungal Gene Biol.