



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

Garrido Rivera, Sofía

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

23 de agosto del 2022



SGarrido Biotec ESPE Tesis 2022.txt

Scanned on: 13:23 August 15, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	69
Words with Minor Changes	2
Paraphrased Words	265
Omitted Words	0



Firmado electrónicamente por:
**FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR**



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Desarrollo de un nanosensor para la detección del agente causal de la agalla de corona (*Agrobacterium tumefaciens*) en plantas de rosa (*Rosa spp.*)”** fue realizado por la señorita **Garrido Rivera, Sofía**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 23 de agosto de 2022



Flores Flor, Francisco Javier PhD.

C. C. 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Garrido Rivera, Sofía**, con cédula de ciudadanía No. 100328216-5, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Desarrollo de un nanosensor para la detección del agente causal de la agalla de corona (*Agrobacterium tumefaciens*) en plantas de rosa (*Rosa spp.*)”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 23 de agosto de 2022

.....
Sofía Garrido

Garrido Rivera, Sofía.

C. C. 100328216-5



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Garrido Rivera, Sofía**, con cédula de ciudadanía No. 100328216-5, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: “**Desarrollo de un nanosensor para la detección del agente causal de la agalla de corona (*Agrobacterium tumefaciens*) en plantas de rosa (*Rosa spp.*)**” en el repositorio institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 23 de agosto de 2022

.....*Sofía Garrido*.....

Garrido Rivera, Sofía.

C. C. 100328216-5

Dedicatoria

A mis padres, Teresa y Francisco por su amor infinito, apoyo incondicional y enseñanzas.

Gracias por guiarme, escucharme y creer en mí, sin ustedes no sería quien soy ahora.

A mis hermanos, Francisco y Johan, por ser mis mejores amigos, confidentes y compañeros de aventuras. Gracias por ser y estar, por todos sus consejos y amor. Aquí estaré siempre para
ustedes.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco al Dr. Francisco Flores, docente investigador del Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por ser un excelente tutor, maestro y persona, gracias por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

Gracias a Francisco Garrido, mi hermano y técnico del Laboratorio de Biología Molecular IDgen por todas tus enseñanzas y consejos. Gracias por estar presente cada vez que lo necesite.

A mi familia, Tere, Pancho, Francisco y Johan por ser mi guía y por enseñarme a perseverar y brillar a pesar de los obstáculos porque siempre se puede encontrar una solución a los problemas. Mi entera admiración y gratitud hacia ustedes.

A Josue, mi compañero de locuras, gracias por creer en mí, por motivarme y por estar presente en los momentos difíciles. Por todo tu amor y apoyo, por seguir creciendo y caminando juntos y por todo lo que queremos recorrer.

A mis amigxs, Diana, Joss, Marco, Mishu, Alessandro y Poul, gracias por su bonita y reconfortante amistad, por permanecer a pesar del tiempo y por ayudarme a crecer, les tengo siempre en mi corazón.

Índice de contenido

Carátula.....	1
Informe de análisis de Copyleaks.....	2
Certificación docente	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenido.....	8
Listado de tablas.....	11
Listado de figuras.....	11
Listado de abreviaturas	12
Resumen.....	13
Abstract	14
Capítulo 1: Introducción.....	15
Planteamiento de problema	15
Justificación del problema.....	16
Objetivos.....	16
<i>Objetivo general</i>	16
<i>Objetivos específicos</i>	17

Hipótesis.....	17
Capítulo 2: Marco Teórico	18
Cultivo de rosas.....	18
<i>Origen, descripción y genética</i>	18
<i>Importancia económica en el Ecuador</i>	19
Enfermedad de la agalla de la corona.....	19
<i>Síntomas</i>	19
<i>Agente causal</i>	20
<i>Métodos de manejo y control</i>	21
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
<i>Taxonomía</i>	21
<i>Mecanismo y genética de infección y tumorigénesis</i>	22
<i>Métodos de detección microbiológicos y bioquímicos</i>	25
<i>Métodos de identificación molecular</i>	27
Nanosensores	29
<i>Características y propiedades de las nanopartículas de oro</i>	29
<i>Aplicación de los nanosensores en agroecosistemas</i>	30
Capítulo 3: Metodología.....	31
Aislamiento bacteriano y sitios de muestreo	31
Extracción de ADN de cultivos bacterianos.....	32
Identificación molecular.....	33

	10
Desarrollo del control positivo sintético multiobjetivo.....	34
Evaluación de la estabilidad de CPS.....	35
Preparación de células competentes.....	35
Transformación bacteriana mediante shock térmico	35
Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro.....	36
Funcionalización de nanopartículas	37
Hibridación de las Au-NP con ADN	37
Validez de la prueba y análisis estadístico.....	38
Capítulo 4: Resultados	39
Aislamiento bacteriano e identificación molecular.....	39
Selección de cebadores.....	41
Desarrollo del CPS.....	41
Clonación del CPS y extracción de ADN.....	43
Síntesis y funcionalización de Au-NP	44
Hibridación de las Au-NP con el ADN	45
Análisis estadístico.....	48
Comparación con el método gold estándar	52
Capítulo 5: Discusión	53
Capítulo 6: Conclusiones.....	56
Capítulo 7: Recomendaciones	57
Referencias.....	58

Apéndices	68
-----------------	----

Listado de tablas

Tabla 1 Preparación de los medios utilizados.	32
Tabla 2 Condiciones de PCR utilizadas.....	34
Tabla 3 Análisis ANOVA multifactorial.....	48
Tabla 4 Prueba de Duncan para el factor organismo.....	49
Tabla 5 Prueba de Duncan para los factores organismo y tiempo.	49
Tabla 6 Sensibilidad y especificidad de la prueba.....	51

Listado de figuras

Figura 1 Aislados bacterianos en medio AT.....	39
Figura 2 Tinción Gram de aislados bacterianos.....	40
Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los amplicones 16S.....	40
Figura 4 Representación gráfica del plásmido CPS pMG-Amp.....	42
Figura 5 PCR in silico usando como ADN plantilla el plásmido CPS pMG-Amp y conjuntos de cebadores específicos para <i>A. tumefaciens</i>	43
Figura 6 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplicones obtenidos a partir de la PCR de colonias del CPS.	44
Figura 7 Bacterias transformadas luego de 48h de cultivo.....	44
Figura 8 Espectrofotometría de Au-NP funcionalizadas.	45
Figura 9 Hibridación de las Au-NP con ADN a concentración de 25 ng/ μ L luego de 25 minutos.	46

Figura 10 Hibridación de las Au-NP con ADN a concentración de 50 ng/μL luego de 25 minutos.....	47
Figura 11 Hibridación de las Au-NP con ADN a concentración de 100 ng/μL luego de 25 minutos.....	47
Figura 12 Hibridación de las Au-NP con ADN a concentración de 200 ng/μL luego de 25 minutos.....	48
Figura 13 Gráficas de dispersión de puntos para cada tiempo y concentración de ADN propuestos	50
Figura 14 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplicones obtenidos a partir de la PCR <i>tms2</i>	52

Listado de abreviaturas

ADE: agua destilada estéril

CPS: control positivo sintético

NP: nanopartículas

Au-NP: nanopartículas de oro

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

DEPC: agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato

SDS: dodecil sulfato de sodio

PBS: solución salina tamponada con fosfato

OD: densidad óptica

Resumen

Las rosas constituyen uno de los productos de exportación más importantes del sector económico ecuatoriano. Pese a las condiciones agroclimáticas favorables para su cultivo, los rosales enfrentan problemas relacionados con infección por fitopatógenos. La enfermedad de la agalla de la corona es una de ellas y es ocasionada por *Agrobacterium tumefaciens*, un bacilo gramnegativo que se caracteriza por introducir un segmento de ADN al material genético de la planta e inducir tumores. La inexistencia de métodos sencillos, rápidos, sensibles y específicos para su detección impiden el diagnóstico temprano. El presente proyecto de investigación tiene como objetivo desarrollar un nanosensor para la detección del agente causal de la agalla de corona (*Agrobacterium tumefaciens*) en plantas de rosa (*Rosa* spp.). Primero se obtuvo un control positivo sintético (CPS) que contenía tres pares de cebadores dirigidos a los genes *tms2*, *ipt* y *virD2*; se sintetizaron nanopartículas de oro mediante el método de reducción con citrato y posteriormente se funcionalizaron con el cebador *tms2R2* y se realizaron pruebas a distintas concentraciones de ADN del CPS y del control negativo (25, 50, 100 y 200 ng/μL). Se obtuvo un punto de corte o cut-off de la prueba a 0.127. Se obtuvieron porcentajes de sensibilidad y especificidad del 80% y 100%, respectivamente, a partir de 100 ng/μL de ADN, luego de la adición de 6.5 μL de HCl 0.1 N y a un intervalo de tiempo de 10 a 25 minutos. Se recomienda realizar pruebas con ADN extraído de tumores y de suelo contaminado.

Palabras Clave: Fitopatología, nanosensores, validez interna

Abstract

Roses are one of the most important export products in the Ecuadorian economic sector. Despite favourable agro-climatic conditions for their cultivation, roses face problems related to infection by phytopathogens. Crown gall disease is one of them and is caused by *Agrobacterium tumefaciens*, a gram-negative bacillus that is characterized by introducing a DNA segment into the genetic material of the plant and inducing tumors. The lack of simple, rapid, sensitive, and specific methods for its detection prevents early diagnosis. The present research project aims to develop a nanosensor for the detection of the causal agent of crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*) in rose (*Rosa* spp.) plants. First, a synthetic positive control (SPC) containing three pairs of primers targeting the *tms2*, *ipt* and *virD2* genes was obtained; gold nanoparticles were synthesized using the citrate reduction method and subsequently functionalized with the *tms2R2* primer and tested at different concentrations of DNA from the SPC and the negative control (25, 50, 100 and 200 ng/ μ L). A cut-off point of the test was obtained at 0.127. Sensitivity and specificity percentages of 80% and 100%, respectively, were obtained from 100 ng/ μ L of DNA, after the addition of 6.5 μ L of 0.1 N HCl and at a time interval of 10 to 25 minutes. Testing with DNA extracted from tumours and contaminated soil is recommended.

Key words: Phytopathology, nanosensors and internal validity

Capítulo 1: Introducción

Planteamiento de problema

Las rosas (*Rosa* spp. L.) pertenecientes a la familia *Rosaceae* comprenden alrededor de 150 a 200 especies y 35.000 híbridos de plantas cosmopolitas y subcosmopolitas distribuidas en zonas templadas y subtropicales (Fougère-Danezan et al., 2015; Janick & Hummer, 2009). Durante más de 2000 años, han sido cultivadas en virtud de su valor cultural, económico, ornamental y farmacéutico (Fougère-Danezan et al., 2015). A pesar de su origen asiático, estas plantas se han distribuido mundialmente y Ecuador no es la excepción, de hecho, debido a las condiciones agroclimáticas, el Ecuador figura como el tercer país exportador de flores a nivel mundial, siendo las rosas el principal producto de exportación con una representación del 71% del sector florícola entre enero y octubre del 2021 y que se refleja en un aporte porcentual significativo al PIB agrícola anual (Expoflores, 2020; Expoflores 2021).

A pesar de las benéficas condiciones de suelo, situación geográfica, clima y disponibilidad de recursos naturales, la floricultura enfrenta importantes desafíos como enfermedades provocadas por fitopatógenos, que, de no ser detectadas a tiempo pueden desembocar en pérdidas de recursos y producción y consecuentemente en pérdidas económicas. Uno de los problemas que aquejan a los rosales es la enfermedad de la agalla de la corona, provocada por la infección de *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria del suelo que afecta a plantas eudicotiledóneas y que se caracteriza por introducir una región de ADN (ADN-T) del plásmido Ti en el ADN nuclear de las plantas hospederas, modulando la división celular y la inducción de tumores (Chandrasekaran et al., 2019; Mashiguchi et al., 2019).

Justificación del problema

En Ecuador, las florícolas han hallado la forma de controlar las infecciones provocadas por *Agrobacterium tumefaciens* mediante la aplicación de soluciones químicas en las plantas afectadas, sin embargo, a pesar de que dichos métodos resultan relativamente efectivos, solo pueden ser aplicados cuando los tumores son visualmente evidentes (Alvarado, 2022).

La falta de tecnificación de la agricultura ecuatoriana limita el diagnóstico de la enfermedad de la agalla de la corona a métodos convencionales como el aislamiento en medios selectivos y semi-selectivos o pruebas bioquímicas que si bien pueden detectar al patógeno no siempre funcionan y representan inversión de tiempo y dinero. Además, se ha reportado la dificultad de detección de *Agrobacterium tumefaciens* debido a la baja cantidad de bacterias presentes en los tumores de rosa y a la presencia de otras especies del género *Pseudomonas* que también son capaces de metabolizar opinas (Cubero et al., 1999; Tandapilco, 2020).

Esto implica una necesidad urgente para desarrollar pruebas sensibles, rápidas y de bajo costo. En este sentido, los biosensores basados en nanopartículas funcionalizadas con oligonucleótidos han demostrado ser herramientas versátiles para la detección de fitopatógenos (Sharma et al., 2021; Spanos et al., 2021). Por lo que, este proyecto contribuirá con una estrategia útil para la detección y el control de la enfermedad de la agalla de la corona, aportando conocimiento aplicable a otros fitopatógenos.

Objetivos

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.

Hipótesis

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

Capítulo 2: Marco Teórico

Cultivo de rosas

Origen, descripción y genética

El género *Rosa* está constituido por 150 a 200 especies, siendo más de la mitad poliplodes (Fougère-Danezan et al., 2015; Raymond et al., 2018). La extensa evolución de las rosas está entrelazada con procesos de hibridación interespecífica, introgresión y poliploidización y se conoce que únicamente entre 8 a 20 especies de rosas han contribuido en la formación de los 35.000 cultivares híbridos actuales, mismos que poseen rasgos extensamente diversos (Fougère-Danezan et al., 2015; Just & Bendahmane, 2020). Un estudio realizado por Fougère-Danezan y colaboradores, (2015) sugiere que el género *Rosa* probablemente evolucionó en Asia y el oeste de América del Norte durante el Eoceno, sin embargo, la mayoría de las especies actuales del continente americano son el resultado de una recolonización a partir de Asia. Los procesos de hibridación han facilitado la herencia de genes relacionados con el aroma a partir de especies europeas y chinas hacia las especies modernas; los principales compuestos relacionados con esta característica son terpenoides, fenilpropanoides y derivados de ácidos grasos (Just & Bendahmane, 2020).

Las rosas son plantas arbustivas, leñosas y perennes que han sido utilizadas y domesticadas a lo largo del tiempo con fines ornamentales, farmacéuticos, cosméticos y de fragancia, además, se ha planteado que pueden ser el modelo ideal para diversos estudios biológicos en plantas leñosas, esto debido a su genoma nuclear pequeño (504 Mb) constituido únicamente por siete cromosomas, su fertilidad cruzada y facilidad de micropropagación (Fougère-Danezan et al., 2015; Just & Bendahmane, 2020).

Importancia económica en el Ecuador

Las rosas poseen una amplia diversidad de colores y fragancia, características que les aportan un alto valor comercial en el mercado. En el Ecuador, la floricultura es considerada como uno de los principales sectores estratégicos del país, de hecho, las flores ocupan el quinto lugar en el ranking de productos de exportación no petroleros; anualmente aportan en un 10% al PIB agrícola, generando alrededor de 827 millones de dólares en divisas y representando un 0.82% del PIB total (Expoflores, 2020).

Las rosas ecuatorianas son mundialmente valoradas por su calidad, aroma, variedad e intensidad de colores; en base a los datos tabulados por Expoflores, (2021) los principales destinos de exportación son Estados Unidos, Rusia, Canadá y la Unión Europea. De acuerdo con la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua-EPAC, para el año 2021, un total de 6.052 hectáreas fueron destinadas al cultivo y producción de rosas lo que demuestra una representación del 81.08% del total de flores cultivadas (INEC, 2022). Según la Corporación Financiera Nacional (CFN) para el año 2020 el 73% de las florícolas estarían ubicadas en la provincia de Pichincha, seguido por un 12% en Cotopaxi, 4% en Carchi, 4% en Imbabura, 3% en Guayas y 4% en otras provincias.

Enfermedad de la agalla de la corona

Síntomas

La agalla de la corona es el nombre que se da a la enfermedad vegetal omnipresente caracterizada por el crecimiento anormal de tumores en la base del tallo o en las raíces de una amplia gama de especies eudicotiledóneas, con pocas excepciones en gimnospermas y monocotiledóneas; se ha descrito su presencia principalmente en plantas leñosas, árboles frutales y vides (Chandrasekaran et al., 2019; Kado, 2014). La naturaleza del agente causal de esta enfermedad se desconocía hasta antes de 1897, cuando Fridiano Cavara describió

detalladamente a los tumores formados en vides jóvenes y reportó el aislamiento de una bacteria que podría ser el fitopatógeno asociado a la formación de las agallas (Kado, 2014).

La infección no puede ser detectada hasta el apareamiento de los tumores, que son estructuras entre 1 a 10 cm de diámetro que se desarrollan en el tejido parenquimático de la planta y son el resultado de una rápida multiplicación celular (Alvarado, 2022). Inicialmente las agallas son bultos pálidos y blandos y con el transcurrir del tiempo se transforman en tejidos duros, irregulares y de color marrón (Kado, 2002).

Los tumores inhiben la función fisiológica del tejido infectado, principalmente cuando se trata de raíces, pero, raramente ocasionan la muerte de las plantas infectadas (Puławska et al., 2016). Cuando la infección se da en la edad temprana de plántulas o esquejes puede retrasar el crecimiento, provocar pérdida de vigor, reducción del follaje y estrés hídrico (Kado, 2002).

Agente causal

La enfermedad de la agalla de la corona ha sido asociada a bacterias del suelo gramnegativas pertenecientes a la familia Rhizobiaceae, varios estudios han demostrado que *Allorhizobium vitis* (anteriormente *Agrobacterium vitis*), *Agrobacterium rubi* y *Agrobacterium tumefaciens* son las responsables de inducir tumores mediante la transferencia del material genético presente en su plásmido inductor de tumores (pTi) (Bourras et al., 2015). *A. vitis* está restringida a la infección de las uvas (vid) y el kiwi y *A. rubi* a especies del género *Rubus*, mientras que, *A. tumefaciens* se ha reportado en una variada gama de hospedadores como son: la rosa, el crisantemo, flor de Jamaica, girasol, durazno, cereza, tomate, aguacate, entre otras (Barton et al., 2018; Chen et al., 2021; Cubero et al., 1999; Habbadi et al., 2020; C. Kado, 2002).

Métodos de manejo y control

La enfermedad de la agalla de la corona es detectada únicamente cuando los tumores son visibles, por tal motivo, se recomienda tomar medidas preventivas como por ejemplo desinfectar herramientas utilizadas en la poda, ya que se ha demostrado que las bacterias pueden moverse a través de los vasos del xilema; evitar la inducción de heridas en raíces; implementar programas de rotación de cultivos y abonos verdes que puedan disminuir la población de *A. tumefaciens* presente en el suelo o utilizar controles biológicos como *A. radiobacter* que produce un antibiótico análogo a la agrocinopina conocido como Agrocin-84 que impide la replicación del ADN e inhibe el crecimiento celular de *A. tumefaciens* (Cubero et al., 1999; C. Kado, 2002).

Además de los métodos de profilaxis, se han descrito métodos químicos y bactericidas para tratar los tumores, como son compuestos a base de creosota, soluciones a base de cobre, hipoclorito de sodio u ácido oxonílico, sin embargo, estos métodos requieren de mano de obra y pueden ser fuentes de contaminación (Alvarado, 2022; C. Kado, 2002).

Agrobacterium tumefaciens

Taxonomía

El estado taxonómico de las especies clasificadas dentro del género *Agrobacterium* se encuentra aún en discusión (Puławska et al., 2016). Smith y Townsend fueron los primeros en nombrar al agente causal de la agalla de la corona como *Bacterium tumefaciens*, posteriormente para 1909 Duggar cambió el nombre a *Pseudomonas tumefaciens*, seguido de *Polymonas tumefacines* por Lieske en 1928, y finalmente en 1942, Conn la denominó *Agrobacterium tumefaciens* (Kado, 2014). Inicialmente, todas las especies que provocaban la enfermedad de la agalla de la corona se agruparon dentro de *Agrobacterium tumefaciens*, sin embargo, cuando se reportó que la patogenicidad de las especies dependía del plásmido Ti y

que este puede transferirse de cepas patógenas a no patógenas, esta clasificación se invalidó (Mafakheri et al., 2019; Puławska et al., 2016). Consecuentemente, en base a una serie de análisis fisiológicos y bioquímicos, se clasificó las especies en tres biovares, pero, para 1981 *Agrobacterium* biovar 1 se elevó a nivel de especie como *Agrobacterium tumefaciens*, lo mismo sucedió con los biovares 2 y 3. En 2001 Young y colaboradores transfirieron especies del género *Agrobacterium* a *Rhizobium*, pero estudios posteriores validaron al grupo *Agrobacterium* dentro de la familia Rhizobiaceae; los recientes estudios han definido que existen ocho especies válidamente publicadas y 11 genomoespecies que conforman el complejo *Agrobacterium tumefaciens* (Mafakheri et al., 2019). En la actualidad, este complejo sigue experimentando reconsideraciones, de hecho, el estudio de Mafakheri et al., (2019) sugiere la existencia de dos nuevas genomoespecies denominadas G19 y G20.

Mecanismo y genética de infección y tumorigénesis

Los tejidos dañados o heridos propician las condiciones adecuadas para la entrada de *Agrobacterium tumefaciens* en su futura planta hospedera (Bourras et al., 2015). Cuando las plantas han sufrido una lesión exudan una serie de compuestos fenólicos (ej., catecol o acetosiringona) y monosacáridos que juntamente con un pH bajo incentivan la quimiotaxis de *A. tumefaciens* (Barton et al., 2018; Binns & Zhao, 2020; Lin et al., 2014). El reconocimiento de estos exudados es necesario en la activación de los genes de virulencia (*vir*) presentes en el plásmido Ti (Lin et al., 2014).

La quinasa multidominio VirA responde directamente en el caso de los fenoles o indirectamente cuando se trata de una alta concentración de azúcares, mismos que son capaces de unirse a la proteína periplasmática ChvE (codificada cromosómicamente) de manera dependiente al pH bajo, y finalmente esta unión es la que interactúa con VirA y la activa (Binns & Zhao, 2020; Bourras et al., 2015; Lin et al., 2014). Consecuentemente, VirA en su forma activa (fosforilada) transfiere su fosfato a la proteína citoplasmática VirG, que se unirá

a los elementos potenciadores *vir* en los promotores de los genes *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG* y *virH* regulando así su transcripción (Escobar & Dandekar, 2003; Lin et al., 2014). Las proteínas VirD1 y VirD2 facilitan la síntesis del ADN-T, un fragmento monocatenario que será transferido a la célula huésped y que será el responsable de la tumorigénesis. VirD2 se mantiene unido al ADN-T en el extremo 5' formando el complejo VirD2-T (Escobar & Dandekar, 2003).

Posterior a la quimiotaxis, los patógenos se adhieren a los tejidos del huésped para formar biopelículas, en el caso de *A. tumefaciens* se ha demostrado que la promoción de interacciones de superficie débiles y reversibles está dada por la codificación de pili tipo IVb (pili Ctp); esta asociación facilita la producción de exopolisacáridos y la maduración del biofilm, sin embargo, se ve afectada por variaciones en las condiciones ambientales como disponibilidad de oxígeno, pH bajo, limitación de fósforo o cationes divalentes (Barton et al., 2018).

Si bien en los procesos de infección el huésped activa mecanismos de defensa, algunos estudios han reportado la incapacidad de la mayoría de las plantas hospederas de generar una respuesta de hipersensibilidad (HR) frente a *A. tumefaciens* (Barton et al., 2018). La modificación en el dominio N-terminal de la flagelina de *Agrobacterium* spp. impide la inducción de respuestas inmunitarias innatas relacionadas con receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Barton et al., 2018; Gohlke & Deeken, 2014). *A. tumefaciens* tiene la capacidad de interferir con los sistemas inmunitarios del huésped, evitando la acumulación de H₂O₂, o desintoxicando a los inductores fenólicos (que activan el sistema VirA/VirG) a través de la expresión de la proteína VirH2.

Luego de la unión de *A. tumefaciens* y la expresión de los genes *vir*, VirD2-T junto con los efectores VirE2, VirE3, VirF y VirD5 son exportados hacia el citoplasma de la célula vegetal por el complejo proteico de secreción tipo IV, VirB/VirD4; una vez en el citoplasma las proteínas VirE2 rodean a VirD2-T formando el complejo T; VirE2 y VirD2 interactúan con las proteínas endógenas de la planta: TBP (proteína de unión a la caja TATA), CAK (cinasa activadora de la

cinasa dependiente de ciclina) y VIP1 (proteína 1), asegurando la orientación del complejo T hacia la cromatina (Escobar & Dandekar, 2003). La secuencia de ADN-T posee elementos promotores inusuales para una procariota, pero que aseguran la expresión adecuada de los genes de tumorigénesis, estos son: la señal de poliadenilación, la caja TATA y los motifs de la caja CAAT, además se han informado microhomologías entre los extremos del ADN-T y el sitio de inserción en el genoma huésped de la planta lo que sugiere que estas secuencias están involucradas en la integración del ADN-T (Bourras et al., 2015). La rotura de la doble cadena (DSB) es fundamental para la integración del ADN-T dentro del ADN vegetal; además, se ha propuesto que la recombinación homóloga (HR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ) podrían ser los mecanismos que faciliten dicho proceso (Bourras et al., 2015).

El T-DNA posee dos grupos oncogénicos clasificados en base a su función, aquellos involucrados en la codificación de enzimas que intervienen en la producción de fitohormonas y aquellos que direccionan el metabolismo vegetal hacia la producción de opioninas (Bourras et al., 2015). Los oncogenes del ADN-T, *iaaM*, *iaaH*, *ipt* y *6b (tm)* han sido descritos como los responsables de modificar los niveles endógenos de las auxinas como: el ácido indol-3-acético (IAA) y el ácido fenilacético (PAA) y citoquinas (Mashiguchi et al., 2019). Tanto las capacidades tumorigénicas como la transferencia conjugativa de plásmidos Ti han sido atribuidas a la detección de quorum sensing (QS) y al catabolismo del opionín; se han descrito alrededor de 20 tipos entre ellos: octopina, agropina, manopina, nopalina, agrocinoquinas, entre otras, cada una de estas opinas funcionan como fuente de energía, nutrientes y carbono para *A. tumefaciens* (Chandrasekaran et al., 2019; Escobar & Dandekar, 2003). Además, se ha informado que las opinas intervienen en la producción de la señal de QS, 3-oxo-octanoilhomoserina lactona (OC8HSL) la misma que aumenta la gravedad de los síntomas de la enfermedad de la agalla de la corona (Haudecoeur & Faure, 2010).

Métodos de detección microbiológicos y bioquímicos

El aislamiento bacteriano a través de la implementación de medio selectivos y semi-selectivos ha sido un método convencional históricamente usado. Para la detección de *Agrobacterium* spp. es necesario combinar medios selectivos, pruebas bioquímicas y pruebas de patogenicidad.

Medios selectivos y semi-selectivos.

De acuerdo con Brisbane & Kerr, (1983) el medio 1A es adecuado para el aislamiento e identificación de agrobacterias, esto debido principalmente a la presencia de: L(-) arabitól (fuente de carbono y nitrógeno) y de 200 mg/L de selenito de sodio pentahidratado $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ que actuaría como elemento tóxico para otras bacterias.

Por otra parte, se ha descrito la utilización del medio D1 propuesto por Kado & Heskett, (1970) y su adaptación, D1M, por Palumbo et al., (1998) que mantienen como principio la utilización de componentes activos como el cloruro de litio que afectan la permeabilidad de las membranas bacterianas.

De acuerdo con Morton & Fuqua, (2012) la selección de medios depende del objetivo que se persiga, así por ejemplo se puede utilizar el medio mínimo AT propuesto por Tempo et al., (1977) y sus variaciones: ATGN suplementado con glucosa al 0.5% y sulfato de amonio 15mM o ATO que utiliza octopina como fuente de carbono y nitrógeno, que brindan un medio no estresante con nutrientes esenciales pero que limita el crecimiento de mutantes auxotróficos. El caldo de inducción (medio IB) pretende imitar las condiciones inductoras de una planta hospedera permitiendo la activación de los genes *vir* (Winans et al., 1988). El medio Higg, por su parte, estimula el crecimiento de agrobacterias y facilita la formación de biopelículas (Poindexter, 1978).

Identificación morfológica.

Tanto la identificación microscópica como macroscópica permiten dilucidar si el aislamiento corresponde a la bacteria de interés, en el caso de *Agrobacterium tumefaciens* la morfología de las colonias está estrechamente relacionada con el medio utilizado. En cuanto a la identificación microscópica se ha descrito que *A. tumefaciens* se presenta como bacilos gramnegativos (Tandapilco, 2020)

Para el medio D1 se han reportado colonias brillantes que presentan coloración marrón amarillento a verde olivo con bordes enteros y más claros y superficie lisa (Kado & Heskett, 1970; Pei Min, 2014; Tandapilco, 2020). Para el medio AT se pueden seleccionar colonias blancas o amarillentas, brillantes, convexas, con bordes lisos y regulares (Tandapilco, 2020).

Pruebas bioquímicas.

Por lo general los medio selectivos y semi-selectivos no permiten la diferenciación entre especies, y este es el caso de *Agrobacterium*, pese a la conjugación relativamente efectiva de estos métodos, las pruebas bioquímicas suelen implicar una inversión elevada de tiempo y dinero. Se ha planteado una extensa serie de pruebas bioquímicas que permiten discernir los aislados bacterianos en base a sus características metabólicas.

Las principales pruebas estándar para *A. tumefaciens* se basan en su capacidad para crecer en NaCl al 2% a 37 °C y dar positivo a las pruebas de oxidasa y catalasa (Alippi et al., 2010; Ganjeh et al., 2021).

Pruebas de patogenicidad.

Una vez se haya realizado el aislamiento bacteriano y las pruebas bioquímicas respectivas, las capacidades de los aislados para infectar plantas y subsiguientemente formar tumores debe ser evaluada mediante una infección inducida en plantas modelo como *Solanum*

lycopersicum (tomate), *Helianthus annuus* (girasol) o en las raíces de *Daucus carota* (zanahoria) (Chandrasekaran et al., 2019; Mafakheri et al., 2019; Puławska et al., 2016).

Métodos de identificación molecular

Las pruebas microbiológicas son afectadas en relación con el tiempo, costos y disponibilidad de reactivos, por tal motivo, se han desarrollado sistemas de PCR dirigidos al agente causal de la agalla de la corona. Algunos de ellos se describen a continuación. Un gran porcentaje de los métodos moleculares desarrollados se dirigen a los genes del plásmido Ti, precisamente porque estos genes están relacionados con la tumorigénesis (Puławska & Sobiczewski, 2005).

Nesme y colaboradores (1990) diseñaron uno de los primeros sistemas de PCR, consiste en los cebadores FGP *tmr* 530 y FGP *tmr* 701' direccionados al reconocimiento del gen *tmr* que facilitan la detección de plásmidos de tipo nopalina y octopina y los cebadores FGP *vir* B₁₁₊₂₁ y FGP *vir* G15' diseñados para el reconocimiento de la región intercistronica entre los genes *virB* y *virG* de cepas con un plásmido Ti de tipo nopalina (Puławska & Sobiczewski, 2005).

Dong et al., (1992) diseñaron otro conjunto de cebadores dirigidos a la región *tmr*, sin embargo, sus resultados demostraron una gran dependencia entre la cepa analizada, la concentración del ADN y la sensibilidad.

El conjunto de cebadores VCF/VCR está enfocado en el reconocimiento de secuencias del operón *virC* presentes tanto en plásmidos Ti como en plásmidos Ri de bacterias formadoras de agallas y de la raíz pilosa, respectivamente (Sawada et al., 1995).

El método desarrollado por Haas et al., (1995) se basa en una PCR multiplex que hace uso de 2 pares de cebadores: un primer forward *virD2A* y un primer reverse ya sea *virD2E* o *virD2C* y el par *cyt* y *cyt'* que permiten la identificación de dos genes altamente conservados,

virD2 e *ipt*, que están involucrados en la integración del ADN-T y la intervención en la cascada de citoquinas, respectivamente.

La PCR semi-anidada diseñada por Puławska & Sobiczewski, (2005) utiliza dos pares de cebadores desarrollados para ser complementarios al gen *tms2 (iaaH)* ubicado dentro del T-DNA, los resultados demostraron la capacidad de detectar células de agrobacterias inductoras de tumores presentes en el suelo.

Puławska et al., (2006) propuso una PCR multiplex que utiliza un cebador forward universal *UFf* y cuatro cebadores reverse *B1Rr*, *B2R2*, *AvRr* y *ArRr* diseñados sobre la base de las secuencias del gen 23S rRNA, la investigación reportó que este sistema puede identificar y diferenciar a *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium vitis* y lo que antiguamente se conocía como *Agrobacterium* biovar 1.

Yang et al., (2011) desarrollaron 2 pares de cebadores ambos dirigidos a la región *tmr*, *Tmr560F*, *Tmr560R*, *Tmr236F* y *Tmr236*, sus resultados demostraron que este método es capaz de identificar cepas de *A. tumefaciens* aun cuando las plantas son asintomáticas, es decir, no presentan agallas; sin embargo, el método es útil únicamente cuando hay 100 copias de la secuencia plantilla.

Algunos estudios por su parte han centrado su método de detección en el reconocimiento del tipo de opina del pTi, así, los cebadores *RB-F* y *RB-R* y *OCS-F* y *OCS-R* facilitan el reconocimiento de plásmidos de tipo nopalina y octopina, respectivamente (Tan et al., 2003). El estudio de Chandrasekaran et al., (2019) realiza un aporte a este objetivo mediante el diseño de los cebadores *ACC-F* y *ACC-R* direccionados a la detección de plásmidos Ti de tipo agrocínopina.

Nanosensores

La nanotecnología ha surgido como una herramienta versátil y prometedora para dar respuesta a necesidades y problemas actuales. Los nanosensores responden a las propiedades de la nanoescala como una alta reactividad, mayor conductividad eléctrica, propiedades magnéticas únicas y una relación significativa entre superficie/volumen, estas características les otorgan la atención para el desarrollo de aplicaciones en distintas áreas (Swierczewska et al., 2012). Se puede definir a los nanosensores como materiales que operan en la nanoescala y que cuentan con un ligando capaz de unirse a un receptor único y que tienen la capacidad de generar o detectar una señal, lo que les otorga especificidad y sensibilidad (Swierczewska et al., 2012)

Características y propiedades de las nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (Au-NP) se han convertido en un objeto de estudio de gran interés por parte de la comunidad científica. El oro ha sido uno de los elementos más investigados; en concordancia con sus propiedades, las nanopartículas de oro son bastante estables, biocompatibles, y poseen baja toxicidad, además, tienen la capacidad de dispersar la luz, característica que les ha dado un alto valor para aplicaciones en el desarrollo de biosensores, bioimagen y diagnóstico y tratamiento de enfermedades mediante administración dirigida de fármacos (Fan et al., 2020).

A ciertas frecuencias en el rango de luz visible las nanopartículas de materiales nobles como las Au-NP exhiben el llamado fenómeno de SPR (resonancia plasmónica superficial). Las Au-NP indican una banda SPR de aproximadamente 520 nm en la región de luz visible, sin embargo, conforme incrementa el tamaño de las nanopartículas la SPR disminuye por lo que se absorben ondas de frecuencia más baja. Esta característica las convierte en un objeto de

interés en el desarrollo y diseño de biosensores colorimétricos pues es la responsable del cambio de color de rojo a azul de las Au-NP (Fan et al., 2020).

El interés en las nanopartículas de oro incluso ha permitido el desarrollo de métodos de síntesis “verdes” que aprovechan la capacidad biosintética de diferentes organismos en la producción de materiales inorgánicos bajo ciertas circunstancias (Fan et al., 2020; Panda & Deepa, 2011). Estos métodos permiten disminuir la huella contaminante provocada por los compuestos químicos usados en métodos convencionales.

Aplicación de los nanosensores en agroecosistemas

Las actuales demandas de la sociedad implican grandes desafíos en los agroecosistemas. Algunas prácticas agrícolas como el uso indiscriminado de compuestos persistentes como plaguicidas o agroquímicos se han convertido en algunas de las mayores fuentes de contaminación agrícola y de preocupación en cuanto al funcionamiento del suelo, biodiversidad y seguridad alimentaria (Sharma et al., 2021). Por otra parte, ha surgido la necesidad imperativa de detectar y tratar suelos con persistencia de metales pesados como cadmio, mercurio, cobre, zinc, níquel, plomo y cromo, mismos que afectan a los sistemas bióticos y a las acciones biológicas de estos (Sharma et al., 2021).

De acuerdo con Spanos et al., (2021) la introducción de la nanotecnología en los agroecosistemas se ha hecho cada vez más evidente, esto debido a que los nanomateriales son instrumentos que facilitan:

1. La reducción de agroquímicos mediante sistemas inteligentes de nanoentrega.
2. La identificación de contaminantes orgánicos e inorgánicos y fitopatógenos.
3. La detección de la deficiencia de nutrientes con alta precisión y sensibilidad.
4. Mejora en la protección de vegetales contra factores de estrés abiótico.

Capítulo 3: Metodología

Aislamiento bacteriano y sitios de muestreo

Se recolectaron cinco muestras de tejido tumorigénico maduro de plantas de rosa de una finca productora ubicada en El Quinche, Ecuador. Los tumores fueron tratados luego de 24h posteriores a la toma de muestras. Para la desinfección del material vegetal y el aislamiento bacteriano se siguió el protocolo descrito por Zuker, (2003). Las secciones de tallo con tumores fueron lavadas con agua corriente para eliminar la tierra, a continuación, se sumergió y agitó los tumores en hipoclorito de sodio al 0.5% durante 2 minutos y se procedió a hacer cuatro lavados con agua destilada estéril (ADE). Luego de la desinfección cada tumor fue cortado asépticamente en pequeños trozos de aproximadamente 5 mm. Los trozos se incubaron a 28 °C durante toda la noche en tubos Falcon con ADE. Se tomaron 100 µL de cada tubo Falcon y se sembraron en medio mínimo AT (Morton & Fuqua, 2012) y se incubó durante 24h a 28 °C.

Adicionalmente, se tomó una muestra de tejido tumorigénico joven de una plántula obtenida de la misma finca. El tumor se desinfectó y se trató como se describió anteriormente con la modificación de que los 100 µL de cada tubo Falcon se sembraron en medio D1 descrito por Kado & Heskett, (1970) y se incubaron durante 48h a 28 °C.

Luego del tiempo de incubación, los cultivos fueron sometidos a tinción Gram para comprobar la morfología microscópica de las bacterias. Aquellas colonias que correspondían a la morfología macroscópica y microscópica descrita tanto para *Agrobacterium* como para *Pseudomonas* fueron seleccionadas y sembradas nuevamente en cajas con medio D1 y AT, respectivamente. Las composiciones de cada medio se encuentran descritas en la **Tabla 1**.

Tabla 1*Preparación de los medios utilizados.*

Medio	Preparación*
Medio AT	Se prepararon las siguientes soluciones: 20X de solución tampón con 214g/L K_2HPO_4 (pH=7.0), 20X de solución de sales con 40 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 3.2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, y 0.024 g/L de $MnSO_4 \cdot H_2O$ y una solución 50X de hierro con 34.75 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Se tomaron 50 mL de solución tampón, 50 mL de solución de sales y 10 mL de una solución de glucosa 28 mM.
Medio D1	Se mezclaron 15.0 g de manitol, 5.0 g de $NaNO_3$, 6.0 g $LiCl$, 0.02 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0.1 g azul de bromotimol, 2.0 g de K_2HPO_4 y 0.2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Nota. Composición por cada litro de preparación

Extracción de ADN de cultivos bacterianos

La extracción de ADN fue basada en el protocolo de Berrendero et al., (2008). Luego de 24h de cultivo, se tomó aproximadamente 50 mg de colonias de los aislados bacterianos y se colocó en un tubo estéril de 1.5 mL con tres perlas de vidrio, 500 μ L de buffer de extracción y 2 μ L de β -mercaptoetanol. Se lisó las células mediante agitación vigorosa usando vórtex y se incubó a baño María durante 30 minutos a 60 °C. Se añadió 500 μ L de cloroformo (-20 °C) y se homogenizó. Se centrifugó a 14.500 xg durante 10 minutos; sin perturbar la interfaz se tomó aprox. 400 μ L del sobrenadante, se los colocó en un tubo estéril de 1.5 mL con 400 μ L de etanol absoluto frío, 150 μ L de acetato de sodio 3M y 300 μ L de etanol filtrado y se dejó a -20°C durante toda la noche. A continuación, se centrifugó a 14.500 xg durante 17 minutos y se

eliminó el sobrenadante, se realizaron 2 lavados con etanol filtrado y se dejó secar el pellet en la cámara de flujo laminar durante 15 a 20 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet de ADN en 25 µL de agua DEPC junto a 1 µL de RNAasa y se incubó durante 30 minutos a 37 °C.

Se verificó la calidad y concentración del ADN en el espectrofotómetro NanoDrop™ de Thermo Scientific Fischer ®.

Identificación molecular

Se realizó una PCR con los cebadores de la región *tms2*, *tms2F1* (5'-TTT CAG CTG CYA RGG CCA CAT CAG-3') y *tms2R2* (5'-TCG CCA TGG AAA CGC CGG AGT AGG-3') siguiendo el ciclo de PCR utilizado por Puławska & Sobiczewski, (2005). Además, se realizó una PCR multiplex con cebadores específicos para la región *virD2* del plásmido Ti: *virD2A* (5'-ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT-3'), y los cebadores antisentido *virD2C* (5'-TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA-3') y *virD2E* (5'-CCT GAC CCA AAC ATC TCG GCT GCC CA-3') juntamente con los cebadores para la región *ipt*: *cyt* (5'-GAT CG(G/C) GTC CAA TG(C/T) TGT-3') y *cyt'* (5'- GAT ATC CAT CGA TC(T/C) CTT-3') tal y como lo describe Haas et al., (1995) con algunas modificaciones; el número de ciclos se redujo de 40 a 35 tomando en cuenta las recomendaciones del inserto de GoTaq® Green Master Mix y el tiempo de cada etapa se disminuyó a 30 segundos. Las condiciones de PCR y los tamaños esperados de los productos de la amplificación se encuentran descritos en la **Tabla 2**. Finalizadas las PCR se corrió una electroforesis en un gel de agarosa a 85 V durante 35 minutos y se observó los productos amplificados utilizando un transiluminador.

Los ADN extraídos de los aislados bacterianos que cumplían con la morfología microscópica o que mostraron productos amplificados para las PCR anteriormente descritas fueron sometidos a una PCR 16S para su posterior secuenciación e identificación en la base de datos de GenBank.

Tabla 2

Condiciones de PCR utilizadas.

	PCR multiplex <i>virD2A/virD2C/cyt/cyt'</i>	PCR multiplex <i>virD2A/virD2E/cyt/cyt'</i>	PCR <i>tms2F1/tms2R2</i>
Desnaturalización inicial	94 °C, 5 min	94 °C, 5 min	94 °C, 5 min
Desnaturalización	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s	94 °C, 1 min
Annealing	50 °C, 30 s	50 °C, 30 s	63 °C, 1 min
Extensión	72 °C, 90 s	72 °C, 90 s	72 °C, 90 s
Extensión final	72 °C, 5 min	72 °C, 5 min	72 °C, 10 min
Número de ciclos	35	35	35
Tamaño esperado de amplicones	427 y 224 bp	427 y 338 bp	617 bp

Desarrollo del control positivo sintético multiobjetivo

El diseño y síntesis del control positivo sintético (CPS) se realizó en la plataforma de Benchling y se basó el protocolo propuesto por Caasi et al., (2013), sin embargo, se consideró el tamaño del producto de PCR esperado de cada región objetivo. Se seleccionaron secuencias de 13 conjuntos cebadores específicos dirigidos a distintos fitopatógenos incluido *Agrobacterium tumefaciens* (**Apéndice 1**). Para *A. tumefaciens* se escogieron tres regiones objetivo, por lo que los cebadores fueron: *virD2A* y *virD2C* de la región de virulencia *virD2* de pTi que dan como resultado un amplicón de 224 bp; los cebadores *cyt* y *cyt'* del oncogén *ipt* que dan como resultado un producto de 427 bp y los cebadores *tms2F1* y *tms2R2* de la región *tms2* que da un resultado de 671 bp. Los cebadores fueron probados en la herramienta Primer Blast del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Adicionalmente, se realizaron PCR *in silico* en el programa Serial Cloner para comprobar la especificidad de los cebadores en el CPS con y sin el plásmido.

Evaluación de la estabilidad de CPS

El CPS fue diseñado de manera tal que sea estable y no forme estructuras secundarias, para lo cual se analizó el porcentaje de citocina y guanina de la secuencia.

Preparación de células competentes

El inserto de CPS fue sintetizado por Macrogen. El CPS llegó introducido en el plásmido pMG-Amp por lo que, fue funcionalmente clonable.

Para la clonación del APC se procedió a producir células competentes de *Escherichia coli* TOP10 usando el protocolo de Hanahan et al., (1991) con algunas modificaciones. Se sembró 100 μ L de *E. coli* en medio LB líquido y se incubó durante toda la noche a 37°C y 150 rpm. Se ajustó la densidad óptica (OD) a un valor de 0.3. Se preparó buffer CCMB80 (pH=6.4). Se pre enfrió tubos estériles de 1.5 mL durante 10 minutos, y se transfirió 1.5 mL de cultivo bacteriano (OD= 0.3), se centrifugó a 13000xg durante 30 segundos y se removió el sobrenadante cuidadosamente. Se resuspendió el pellet con 1 mL de buffer CCMB80 y se incubó a -20 °C durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó nuevamente a 13000xg durante 30 segundos y se removió el sobrenadante. Finalmente, el pellet se resuspendió en 200 μ L de CCMB80 frío hasta su uso.

Transformación bacteriana mediante shock térmico

La transformación bacteriana se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hanahan et al., (1991), con algunas modificaciones descritas a continuación. Se colocó 50 μ L de células competentes en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles previamente enfriados, se agregó 2 μ L de ADN plasmídico y se incubó a -20 °C durante 30 minutos. Se realizó el shock térmico en baño María (previamente calentado a 42 °C) durante 30 segundos y se incubó a -20°C durante 5 minutos. Se añadió 950 μ L de medio SOC (pH=7.0) a temperatura ambiente y se incubó a 37°C

por 90 minutos en un agitador orbital a 250 rpm. Se centrifugó a 6800 xg por 3 minutos y se descartó cuidadosamente 900 μ L del sobrenadante. Consecuentemente, se resuspendió el pellet en los 100 μ L restantes y se sembró los 100 μ L en medio LB con ampicilina a una concentración de 200 ppm. Las cajas Petri se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Para comprobar el éxito del procedimiento se realizó una PCR de colonias, y luego de 24 horas más, se extrajo ADN de los cultivos bacterianos y se realizaron PCR con los pares de cebadores escogidos para *Agrobacterium tumefaciens*. Finalmente, luego de comprobar la inserción del plásmido se crioconservó las bacterias transformadas.

Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (20 nm) fueron sintetizadas usando el método de reducción del citrato (Hill & Mirkin, 2006; Khaledian et al., 2017). Se trataron todos los materiales a utilizarse con agua regia (HNO_3 : HCl, 3:1). Se llevó a hervir con agitación 20 mL de ácido cloroaúrico (HAuCl_4 ; 1mM), una vez se haya alcanzado el punto de ebullición se colocó 2 mL de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; 38.8 mM). Se mantuvo el calor hasta que la solución cambiara de color de amarillo pálido a negro y consecuentemente a rojo oscuro, luego se apagó el calor y se dejó en agitación hasta que la solución se enfriara a temperatura ambiente. Finalmente, las nanopartículas fueron almacenadas hasta su uso a temperatura ambiente en un frasco con papel aluminio protegiéndolas de la luz.

Para la caracterización las nanopartículas se midieron con el espectrofotómetro NanoDrop™ de Thermo Scientific Fischer®. Esperando obtener un máximo de absorbancia ($\lambda_{\text{máx}}$) a la longitud de onda de 525 nm con un ancho de pico de aproximadamente 50 nm.

Funcionalización de nanopartículas

La funcionalización de Au-NP se llevó a cabo siguiendo los protocolos descritos por Hill & Mirkin, (2006); Khaledian et al., (2017) y Padmavathy et al., (2012). Se tomó 2nmol del oligo tiolado *tms2* y se colocó en agitación durante 60 minutos junto con 100 μ L de TCEP 10mM disuelto en TE, a continuación, se agregaron 75 μ L de acetato de sodio 3M y 1 mL de etanol, se mezcló gentilmente y se incubó a -20 °C durante 20 minutos. Se centrifugó a 13.600 xg por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet en la cámara de flujo laminar durante 15 a 20 minutos.

A cada de oligonucleótido tiolado reducido se agregó 500 μ L de Au-NP preparado previamente y se incubó en un agitador orbital en oscuridad y durante toda la noche. Luego se agregó 49.5 μ L tampón fosfato (100 mM, pH 7), 5.6 μ L de solución tensioactiva de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 4.9 μ L de agua DEPC y se agitó orbitalmente durante 30 minutos más. Consecuentemente, se dividió en seis dosis la solución de sal (NaCl 2M en PBS 10mM, pH=7) y se colocaron 5 μ L en el transcurso de 48 h hasta alcanzar una concentración de NaCl de 0.3M, luego de la última adición de sal, se dejó equilibrar la solución a temperatura ambiente durante toda la noche. Se almacenó en recipientes herméticos, oscuros y a temperatura ambiente. Las AuNP-oligo funcionalizadas conservaron el color rojo oscuro, al igual que las AuNP no modificadas.

Hibridación de las Au-NP con ADN

Para la determinación del límite de detección de la prueba de Au-NP, se prepararon diluciones seriadas del ADN del CPS (25, 50, 100 y 200 ng/ μ L) con agua DEPC. Adicionalmente, como control blanco se utilizó 1 μ L de agua DEPC, y como control negativo diluciones seriadas de *Pseudomonas* sp. (25, 50, 100 y 200 ng/ μ L). En un tubo eppendorf de 0.5 mL se colocó 1 μ L de ADN o agua DEPC en el caso del control blanco, con 9 μ L de PBS

(10mM, pH=5) y se realizó el primer paso de desnaturalización durante 5 min a 94 °C. Se adicionaron 25 µL Au-NP funcionalizadas y se incubó la reacción a 65.7 °C durante 10 minutos minutos (Khaledian et al., 2017; Sattarahmady et al., 2015). Para establecer el volumen de ácido y el tiempo de mediciones se realizaron tres pruebas con todos los niveles de concentración de ADN.

Finalmente, se adicionó 6.5 µL de HCl 0.1 N y se registró la absorbancia obtenida a la longitud de onda de 525 nm inmediatamente luego de la adición de ácido, a los 10 y a los 25 minutos posteriores.

Se realizaron 5 repeticiones por cada concentración de ADN utilizado. Además, para establecer el cut-off o punto de corte de la prueba se tomaron en cuenta los valores obtenidos a partir de los blancos. Finalmente, se realizó una comparación con el método gold estándar (PCR) usando la concentración mínima de ADN (25 ng/µL) tanto del CPS como del control negativo.

Validez de la prueba y análisis estadístico

De un total de 44 experimentos se realizó un análisis ANOVA multifactorial y una prueba de Duncan para determinar la significancia de los tres factores utilizados: organismo, tiempo y concentración de ADN y la interacción entre dichos factores. Para determinar la sensibilidad y especificidad, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} ;$$

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP}$$

*Donde, VP= verdadero positivo, VN= verdadero negativo, FN= falso negativo, FP= falso positivo.

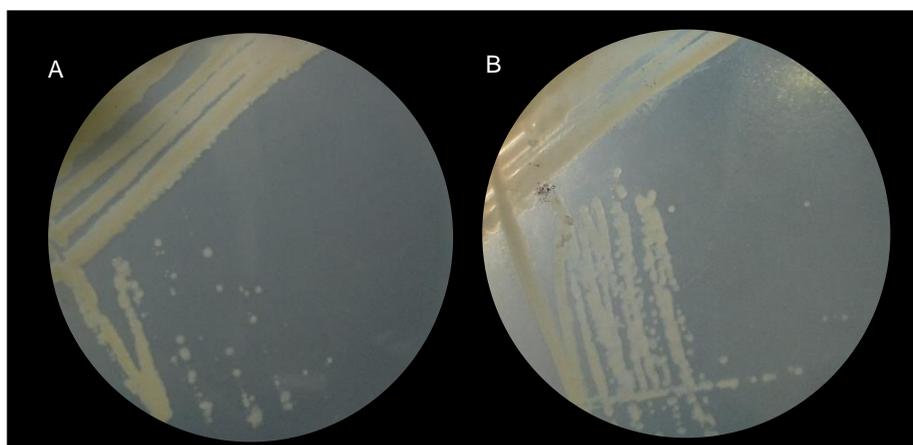
Capítulo 4: Resultados

Aislamiento bacteriano e identificación molecular

Las bacterias aisladas a partir de tumores maduros y medio AT fueron observables luego de 24 horas de cultivo, se reconocieron colonias blancas, cremosas, brillantes y con bordes redondeados y lisos (**Figura 1**). De un total de 10 cajas Petri, únicamente dos muestras codificadas como S1T1 y S2T2 mostraron tener colonias de bacilos gramnegativos luego de haber sido sometidas a tinción (**Figura 2**).

Figura 1

Aislados bacterianos en medio AT



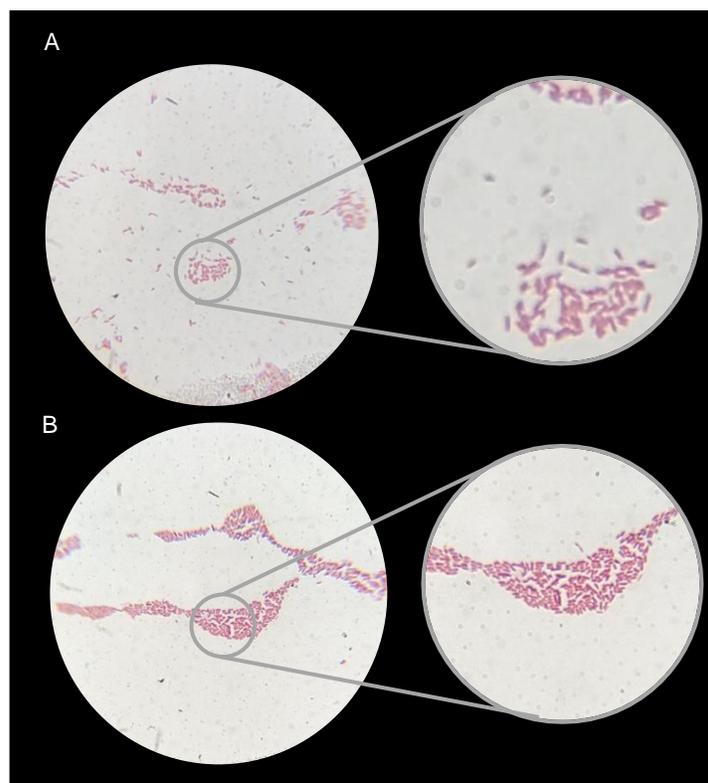
Nota. Morfología macroscópica de (A) muestra S1T1 y (B) muestra S2T2.

A partir de S1T1 y S2T2 no se obtuvieron productos de PCR para los genes *ipt*, *virD2* y *tms2*. Sin embargo, dichas muestras fueron sometidas a una PCR para el gen *16S*. Se obtuvieron amplicones de aproximadamente 1500 bp (**Figura 3**). Consecuentemente, el análisis de las secuencias en la base de datos de GenBank del NCBI reconoció a los aislados dentro del género *Pseudomonas*, sin embargo, no se logró identificar la especie (**Apéndice 2**).

El material genético de S1T1 y S2T2 fue usado como control negativo (CN) para la prueba de hibridación.

Figura 2

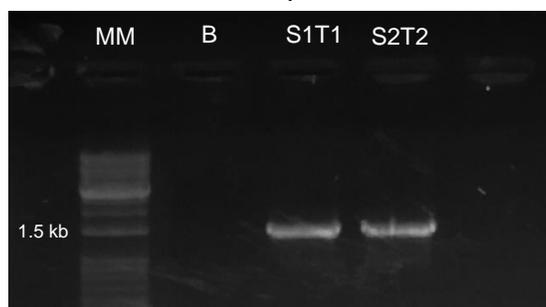
Tinción Gram de aislados bacterianos



Nota. Observación a 100x y con aceite de inmersión; (A) muestra S1T1 y (B) muestra S2T2.

Figura 3

Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los amplicones 16S



Nota. MM= marcador molecular 1kb Plus Opti-DNA Marker de abm® y B= control blanco.

Por otra parte, los aislados bacterianos provenientes del tejido tumorigénico joven y medio D1 mostraron presencia de colonias amarillentas, brillantes, con bordes lisos y redondeados, pero fueron descartados para posteriores análisis debido a que no cumplían con la morfología microscópica.

Selección de cebadores

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los conjuntos de cebadores en la herramienta Primer-Blast se encuentran resumidos en el **Apéndice 2**. Se tomó como criterios de evaluación el número de discordancias o mismatches y el género de los organismos. Se observó que los cebadores *virD2A/virD2C* no discriminan especies de otros géneros como *Rhizobium* o *Neorhizobium*.

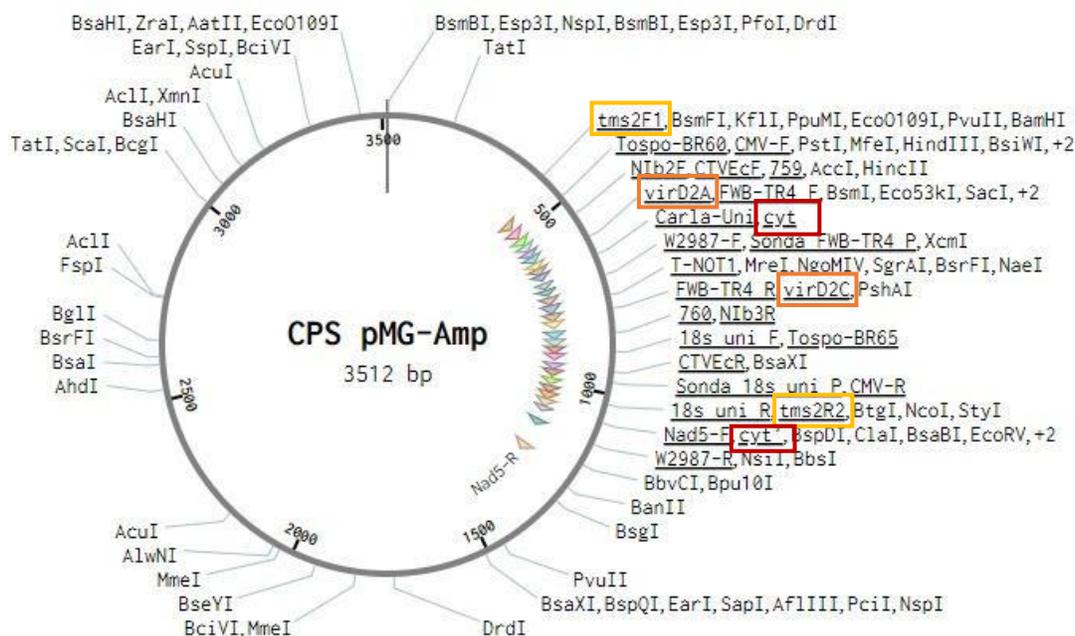
Sin embargo, al analizar el conjunto *tms2F1/tms2R2*, se observó que solo el cebador *tms2R2* tiene 100% de identidad con secuencias de *A. tumefaciens*. Con base en estos datos se estableció al cebador reverso *tms2R2* como el oligonucleótido propicio para la funcionalización de las Au-NP. Adicionalmente, en ningún caso se observó homología con especies del género *Pseudomonas*.

Desarrollo del CPS

La secuencia ensamblada del CPS con los 13 conjuntos de cebadores de interés dio como resultado un fragmento de ADN de 802 pb con un porcentaje de citosina-guanina (CG) de 51.00%, al ensamblar dicho fragmento con el plásmido pMG-Amp se obtuvo una estructura de 3512 pb (**Figura 4**) con un porcentaje de CG de 50.09%.

Figura 4

Representación gráfica del plásmido CPS pMG-Amp



Nota. Por colores se diferencian los conjuntos de cebadores para cada gen; amarillo para *tms2*, naranja para *virD2* y rojo para *ipt*

Las PCR *in silico* realizadas en el programa Serial Cloner demostraron que existía productos amplificados únicos para cada conjunto de cebadores. Así se obtuvieron fragmentos de 617 pb, 427 pb y 224 pb para los genes *tms2*, *ipt* y *virD2*, respectivamente (**Figura 5**).

Figura 5

PCR *in silico* usando como ADN plantilla el plásmido CPS pMG-Amp y conjuntos de cebadores específicos para *A. tumefaciens*

A

```

Oligos for PCR
TTTCAGCTGCTAGGGCCACATCAG
>Primer 2 : tms2R2 -- Size : 0 + 24 = 24 nt -- Tm initial/Tm final : 70.4 / 70.4
TCGCCATGGAACGCCGGAGTAGG
  
```

Select Target DNA: cps-pmg-amp.fasta 3512 nt
PCR fragment length: 617 nt

B

```

Oligos for PCR
GATCGGGTCCAATGCTGT
>Primer 2 : cyt' -- Size : 0 + 18 = 18 nt -- Tm initial/Tm final : 49.3 / 49.3
GATATCCATCGATCTCTT
  
```

Select Target DNA: cps-pmg-amp.fasta 3512 nt
PCR fragment length: 427 nt

C

```

Oligos for PCR
ATGCCCGATCGAGTCAAGT
>Primer 2 : virD2C -- Size : 0 + 24 = 24 nt -- Tm initial/Tm final : 63.5 / 63.5
TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA
  
```

Select Target DNA: cps-pmg-amp.fasta 3512 nt
PCR fragment length: 224 nt

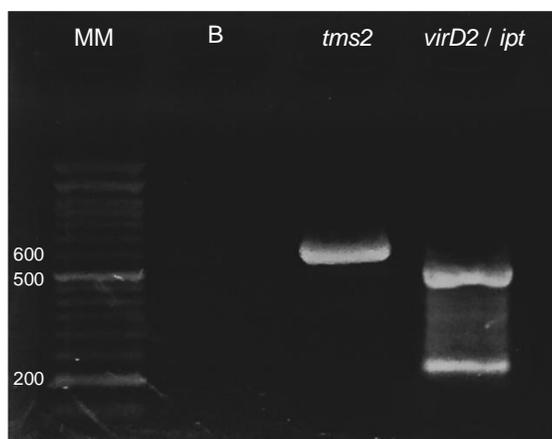
Nota. Conjuntos de cebadores utilizados (A) *tms2F1/tms2R2*, (B) *cyt/cyt'* y (C) *virD2A/virD2C*

Clonación del CPS y extracción de ADN

Las colonias transformadas fueron capaces de crecer en medio LB sólido enriquecido con ampicilina. Luego de 24h de cultivo se observaron pequeñas colonias convexas, de color blanco cremoso, con bordes lisos y redondeados. La PCR de colonias dio como resultado amplicones de los tamaños esperados (**Figura 6**). Luego de 48 horas de cultivo se observó un crecimiento considerable de las colonias bacterianas (**Figura 7**).

Figura 6

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



Nota. MM= marcador molecular 100 pb Opti-DNA Marker de abm ® y B= control blanco.

Figura 7

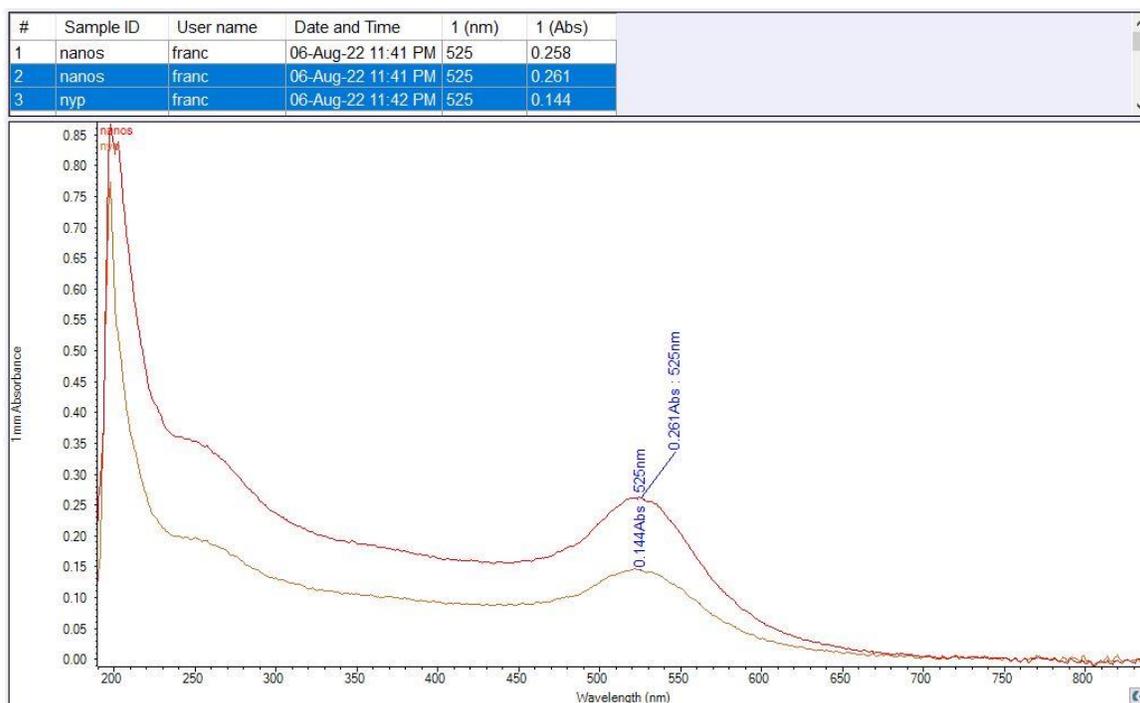
Bacterias transformadas luego de 48h de cultivo.

**Síntesis y funcionalización de Au-NP**

Las nanopartículas sintetizadas y posteriormente funcionalizadas mostraron una coloración roja y un máximo de absorbancia de aproximadamente 0.261 a la longitud de onda de 525 nm (**Figura 8**).

Figura 8

Espectrofotometría de Au-NP funcionalizadas.



Nota. Se observa un máximo de absorbancia en 525 nm para las Au-NP funcionalizadas (curva roja), como para las Au-NP diluidas en 9 PBS μL y 7.5 μL de agua DEPC (curva marrón).

Hibridación de las Au-NP con el ADN

La detección diferencial entre el ADN del CPS y ADN del CN inicialmente se confirmó mediante tres ensayos de hibridación de las Au-NP y todas las concentraciones propuestas. Las reacciones fueron evaluadas con el fin de observar un cambio de color tras la adición de 6.5 μL de ácido, como era de esperarse, tanto el control negativo como el blanco cambiaron de color indicando la agregación de las nanopartículas y consecuentemente desplazando la curva de absorbancia hacia longitudes de onda mayores a 525 nm.

Los resultados fueron evidentes luego de 10 minutos posteriores al cambio del pH por acción del ácido, por lo que se decidió establecer tres tiempos de evaluación: 0, 10 y 25

minutos. Las **Figura 9**, **Figura 10**, **Figura 11** y **Figura 12** representan todas las repeticiones realizadas transcurridos 25 minutos.

Figura 9

Hibridación de las Au-NP con ADN a concentración de 25 ng/ μ L luego de 25 minutos.

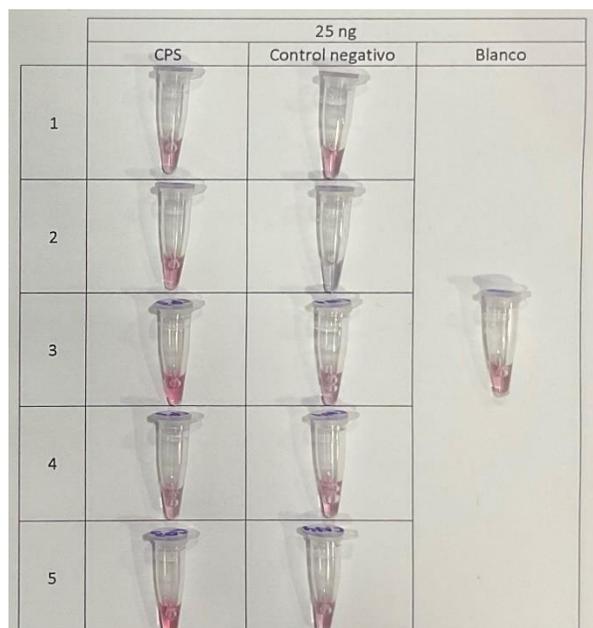
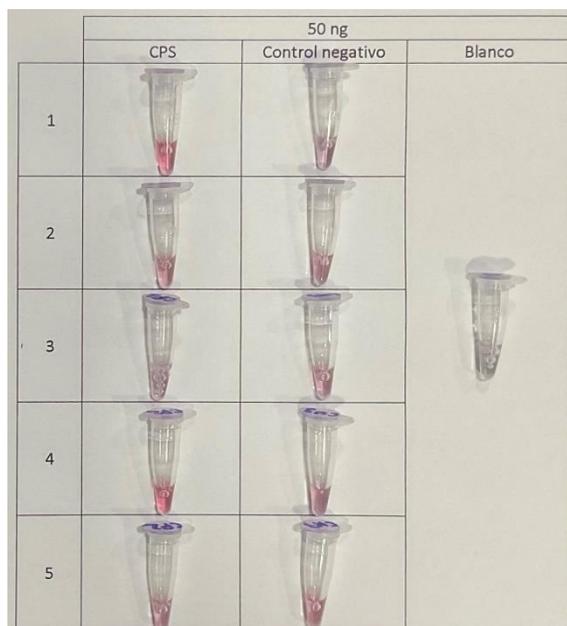


Figura 10

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

**Figura 11**

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

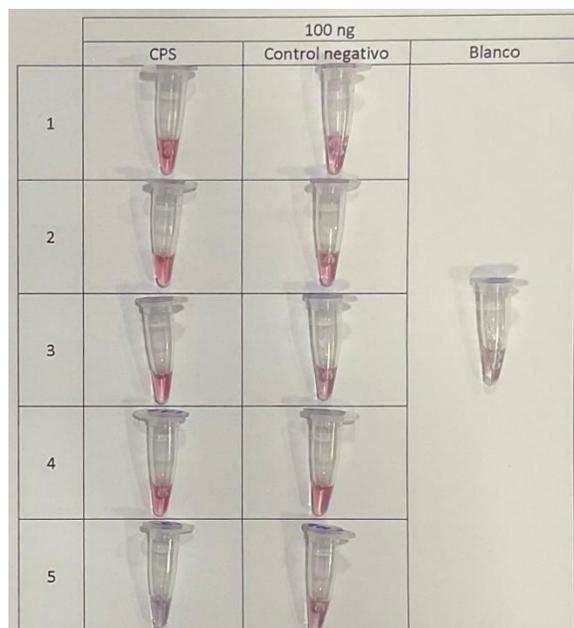
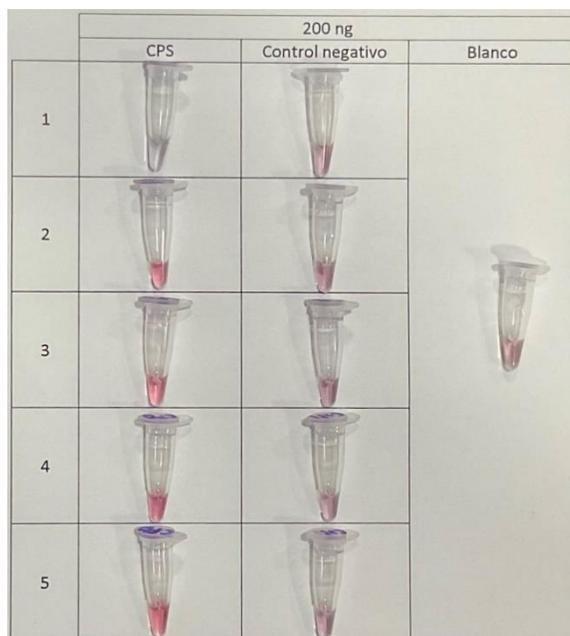


Figura 12

Hibridación de las Au-NP con ADN a concentración de 200 ng/ μ L luego de 25 minutos



Análisis estadístico

Mediante un ANOVA multifactorial al 95% de nivel de confianza se determinó que tanto el organismo (valor-p <0.0001), la concentración de ADN (valor-p: 0.0083) como el tiempo (valor-p <0.0001) son factores significativos (**Tabla 3**). Sin embargo, no se observó significancia entre las interacciones de dichos factores.

Tabla 3

Análisis ANOVA multifactorial.

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

Por otra parte, la prueba de Duncan al 95% de confianza permitió clasificar grupos significativamente diferentes en base a las medias de los factores estudiados. Se determinó que existe diferencia significativa entre los controles positivos y negativos (*Tabla 4*).

Tabla 4

Prueba de Duncan para el factor organismo.

Organismo	Medias	Grupos
CN	0.09	A
CPS	0.13	B

El tiempo por sí solo permitió discernir dos grupos, un grupo A conformado por las medias a los tiempos de 10 y 25 minutos y un grupo B para 0 minutos. Cuando se analizó la interacción entre organismo y tiempo, se observó que a los 10 minutos la media de los controles negativos disminuye, lo que significa una interrelación entre el tiempo y el desplazamiento de la curva; pero al tiempo de 25 minutos la media del control positivo también experimenta una reducción, por lo que, se podría interpretar como falso negativo (*Tabla 5*). Por tal motivo, se podría esperar que el tiempo óptimo se encuentre entre un intervalo de 10 a 25 minutos.

Tabla 5

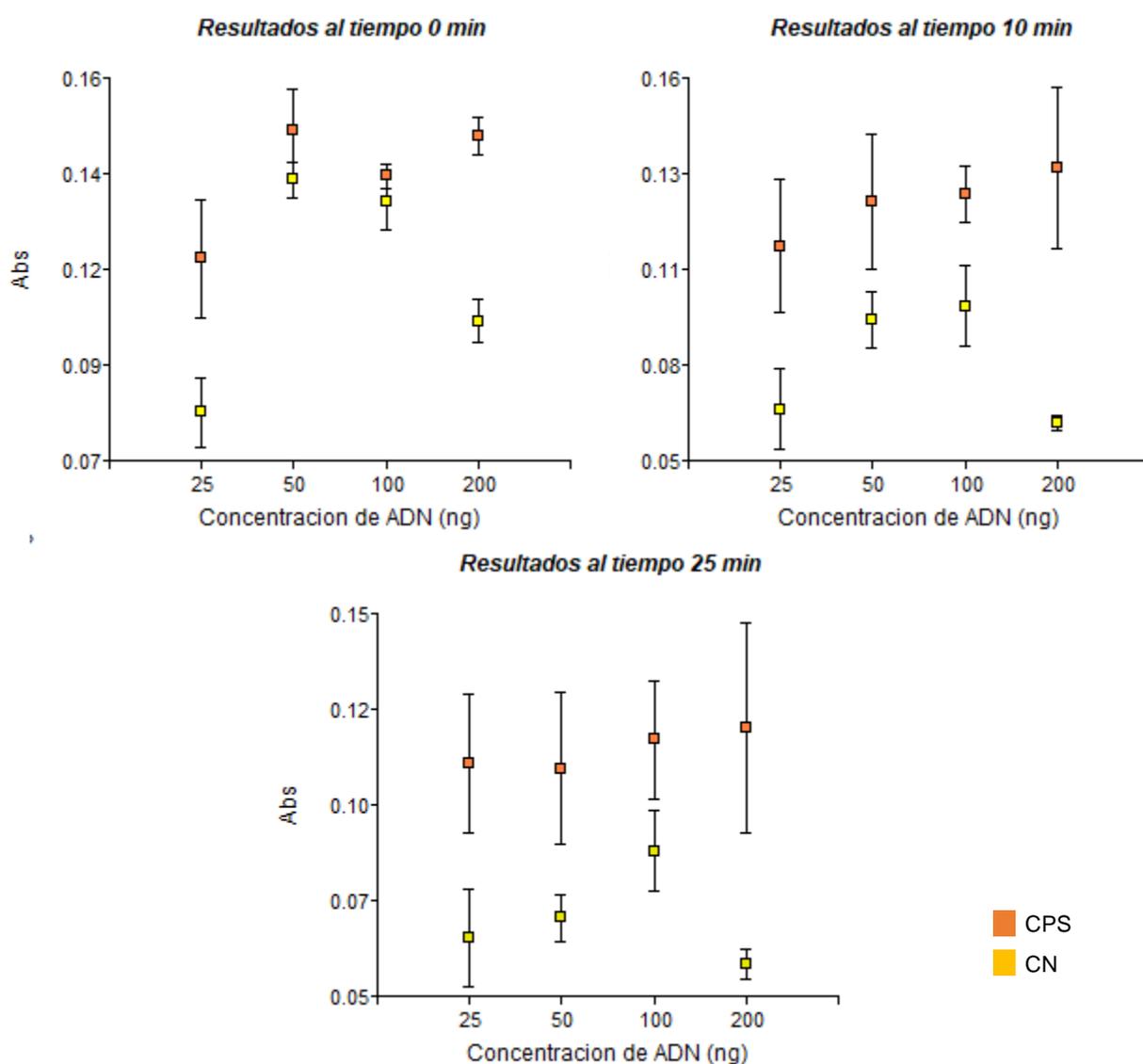
Prueba de Duncan para los factores organismo y tiempo.

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

Las gráficas de dispersión de los datos obtenidos confirmaron que el intervalo de tiempo óptimo está entre los 10 minutos y 25 minutos; conforme transcurre el tiempo de 0 a 10 minutos las medias del CN toman valores más bajos, esto debido a la agregación de las nanopartículas y del desplazamiento de la curva, sin embargo, este fenómeno también se observó en el CPS al tiempo de 25 minutos (**Figura 13**).

Figura 13

Gráficas de dispersión de puntos para cada tiempo y concentración de ADN propuestos



En base a los resultados obtenidos en relación con el tiempo, se tomaron los valores de absorbancia obtenidos a los 10 y 25 minutos de los controles blancos para establecer el cut-off o punto de corte de la prueba y discernir consecuentemente que resultados son positivos o negativos. Se consideró el promedio de los valores de absorbancia sumado dos desviaciones estándar o expresado de otra manera:

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

El valor de corte determinado fue de 0.127, bajo este criterio, todos los datos superiores a 0.127 se consideraron positivos y en su defecto todos los datos menores o iguales a 0.127 se consideraron como negativos. El valor de corte permitió determinar los valores de sensibilidad y especificidad.

Se establecieron valores de sensibilidad y especificidad para cada concentración de ADN utilizadas en el experimento (**Tabla 6**). Los datos resultantes demostraron que la especificidad de la prueba no tiene una variación considerable en relación con la concentración de ADN, además, se observó que, entre 100 y 200 ng/μL de ADN la prueba demostró ser más sensible (70%-80%) en comparación a 25 y 50 ng (40%).

Tabla 6

Sensibilidad y especificidad de la prueba.

	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%
Especificidad	25	100%	100%	100%
	50	20%	100%	100%
	100	40%	80%	100%
	200	100%	100%	100%

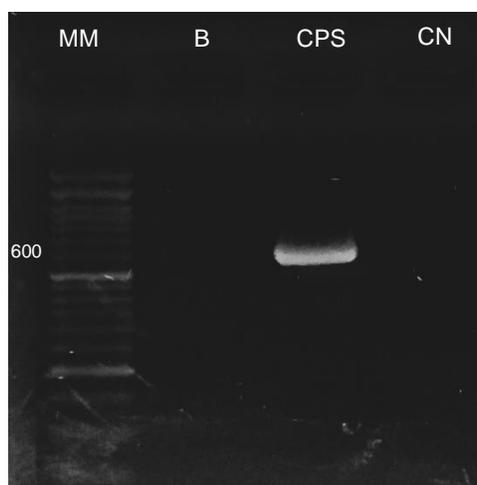
Dado que los resultados han demostrado una mayor sensibilidad entre un rango de concentraciones de 100 ng/μL y 200 ng/μL en un intervalo de tiempo de 10 a 25 minutos, se consideró que a partir de los 100 ng/μL la prueba posee una sensibilidad del 80% y una especificidad de 80% en dicho intervalo de tiempo.

Comparación con el método gold estándar

La PCR con los cebadores tms2F1 y tms2R2 utilizando una concentración de 25 ng/μL de ADN del CPS y del CN, mostró ser sensible y específica. En el gel de agarosa se observó una única banda de 617 pb correspondiente al CPS (**Figura 14**).

Figura 14

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



Nota. Se usó 25 ng/μL de ADN; MM= marcador molecular 100 pb Opti-DNA Marker de abm ® y B= control blanco, CPS=control positivo sintético y CN=control negativo

Capítulo 5: Discusión

La amplia distribución de la enfermedad de la agalla de la corona exige la investigación en técnicas de diagnóstico rápidas, sensibles y efectivas, de hecho, existe un gran interés del sector florícola en la detección de este fitopatógeno en suelos. Con base en esta necesidad, se desarrolló una prueba basada en nanopartículas de oro funcionalizadas con un oligonucleótido dirigido hacia el gen *tms2* de *Agrobacterium tumefaciens*.

Los resultados del aislamiento bacteriano e identificación molecular aquí reportados confirman la dificultad de los métodos microbiológicos convencionales aplicados en la detección de *A. tumefaciens*. Se ha informado que el aislamiento en medios selectivos no es lo suficientemente sensible o robusto, incluso cuando es conjugado con pruebas bioquímicas y de patogenicidad (Puławska & Sobiczewski, 2005). De acuerdo con Cubero et al., (1999) las infecciones ocasionadas por *A. tumefaciens* pueden ser difíciles de confirmar debido a un reducido número de bacterias presentes en el tejido tumorigénico, mucho más aún cuando se trata de un tejido maduro.

Por otra parte, la presencia de especies del género *Pseudomonas* en los tumores de la corona ya ha sido reportada, incluso, una investigación realizada por Tandapilco, (2020) en Ecuador, informó acerca del aislamiento de *Pseudomonas* spp. a partir de tejido tumorigénico. Por tal motivo, se utilizó ADN de una especie proveniente de este género como control negativo.

Dada la dificultad para obtener un control positivo aislado a partir de tejido sintomático, se vio oportuno el desarrollo de un control positivo sintético (CPS). El diseño de constructos genéticos personalizados ofrece la posibilidad de mejorar la confiabilidad de los resultados, la bioseguridad en los laboratorios, el procesamiento y la sensibilidad y especificidad de pruebas moleculares (Caasi et al., 2013). El CPS desarrollado mostró resultados confiables cuando fue utilizado como ADN plantilla para reacciones PCR con cebadores específicos. Dado que el

CPS fue desarrollado a partir de cebadores previamente validados, el porcentaje de CG se mantuvo dentro del intervalo de 40-60% asegurando así la estabilidad de la molécula; la síntesis de estructuras genéticas con altos porcentajes de CG constituyen un desafío, puesto que, se ha informado acerca de las interacciones entre guaninas vecinas y su influencia en la formación de estructuras secundarias unimoleculares, bimoleculares y cuádrimoleculares (Bi et al., 2020; Caasi et al., 2013; Jensen et al., 2010).

Las nanopartículas de oro han demostrado ser un método eficiente para la detección de patógenos. Se ha reportado su aplicación efectiva en el diagnóstico de coronavirus, cepas de *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Ralstonia solanacearum* (Khaledian et al., 2017; Quintela et al., 2019; Wang & Alocilja, 2015). En el presente estudio se sintetizó nanopartículas de oro a partir del método de reducción con citrato, las nanopartículas demostraron tener un máximo de absorbancia a 525 nm, característica que les otorgó su color rojo intenso y que está relacionado a su tamaño (20 nm). El tamaño controlado tiene una fuerte correlación con el método de síntesis y la proporción de reactivos utilizados (Quintela et al., 2019). La optimización del método de síntesis asegura el estado coloidal y el mantenimiento de las AuNP en el tiempo; en este estudio no se evaluó la estabilidad de las nanopartículas en diferentes condiciones.

Las AuNP poseen la capacidad de agregarse cuando existe una disminución del pH de la solución, aglomerándose en nanopartículas de mayor tamaño, lo que les otorga la compatibilidad con la biodetección óptica basada en el cambio de color de rojo a púrpura (Fan et al., 2020). Los resultados obtenidos demostraron el cambio de color y el desplazamiento de la curva cuando las AuNP se probaron con ADN del control negativo.

La especificidad de la prueba viene dada por la selección del oligonucleótido utilizado para la funcionalización. En este caso se usó el cebador *tms2R2* puesto que demostró ser compatible con varias cepas de *A. tumefaciens* luego del análisis en la herramienta Primer Blast, además, se no se observaron concordancias con especies de otros géneros. El cebador

tms2R2 fue diseñado por Puławska & Sobiczewski, (2005) y de acuerdo con su estudio el conjunto de cebadores *tms2* se validó como específico. En esta investigación, se obtuvo una especificidad del 95%.

Finalmente, las nanopartículas sintetizadas arrojaron como resultado una sensibilidad del 75% cuando se utilizan concentraciones entre 100 y 200 ng de ADN del CPS, estos resultados demuestran que a mayor concentración de ADN existe una mayor probabilidad de hibridación, sin embargo, es importante hacer hincapié en que la extracción de material genético de suelo y de tumores puede contener un alto porcentaje de contaminación, por lo tanto, es necesario evaluar la sensibilidad de la prueba con material genético proveniente de estas fuentes (Puławska & Sobiczewski, 2005).

Capítulo 6: Conclusiones

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.

Capítulo 7: Recomendaciones

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*.

Referencias

- Aguayo, J., Mostert, D., Fourrier-Jeandel, C., Cerf-Wendling, I., Hostachy, B., Viljoen, A., & Iqbal, R. (2017). Development of a hydrolysis probe-based real-time assay for the detection of tropical strains of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense race 4. *PLoS ONE*, 12(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171767>
- Alippi, A. M., Lopez, A. C., & Balatti, P. A. (2010). First report of *Agrobacterium rubi* and *A. rhizogenes* causing crown and root gall and hairy root on blueberry in Argentina. *Plant Disease*, 94(8), 1064. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-8-1064C>
- Alvarado, J. (2022). *Evaluación del efecto de la aplicación de dos bactericidas sobre el desarrollo de la agalla causada por Agrobacterium tumefaciens en rosa* [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/25378/1/FAG-CIA-ALVARADO%20JULEXI.pdf>
- Barton, I. S., Fuqua, C., & Platt, T. G. (2018). Ecological and evolutionary dynamics of a model facultative pathogen: *Agrobacterium* and crown gall disease of plants. In *Environmental Microbiology* (Vol. 20, Issue 1, pp. 16–29). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13976>
- Berrendero, E., Perona, E., & Mateo, P. (2008). Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 447–460.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65273-0>
- Bi, C., Huang, X., Tang, D., Shi, Y., Zhou, L., Hu, Y., Chen, X., Qi, S., & Lin, S. (2020). A python script to design site-directed mutagenesis primers. *Protein Science*, 29(4), 1054–1059.
<https://doi.org/10.1002/pro.3806>

- Binns, A. N., & Zhao, J. (2020). The MexE/MexF/AmeC efflux pump of *Agrobacterium tumefaciens* and its role in Ti plasmid virulence gene expression. *Journal of Bacteriology*, 202(8).
<https://doi.org/10.1128/JB.00609-19>
- Bourras, S., Rouxel, T., & Meyer, M. (2015). *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: How a Plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. *Phytopathology*, 105(10), 1288–1301. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0380-RVW>
- Brisbane, P., & Kerr, A. (1983). Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(3), 425–431. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02638.x>
- Caasi, D. R. J., Arif, M., Payton, M., Melcher, U., Winder, L., & Ochoa-Corona, F. M. (2013). A multi-target, non-infectious and clonable artificial positive control for routine PCR-based assays. *Journal of Microbiological Methods*, 95(2), 229–234.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.017>
- CFN. (2021). *FICHA SECTORIAL CULTIVO DE FLORES SUBGERENCIA DE ANÁLISIS DE PRODUCTOS Y SERVICIOS*. <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2021/fichas-sectoriales-3-trimestre/Ficha-Sectorial-Flores.pdf>
- Chandrasekaran, M., Lee, J. M., Ye, B. M., Jung, S. M., Kim, J., Kim, J. W., & Chun, S. C. (2019). Isolation and characterization of avirulent and virulent strains of *Agrobacterium tumefaciens* from rose crown gall in selected regions of South Korea. *Plants*, 8(11).
<https://doi.org/10.3390/plants8110452>
- Chen, H.-Y., Lin, C.-C., Wang, C.-W., & Lin, N.-C. (2021). Disease Note Diseases Caused by Bacteria and Phytoplasmas First Report of *Agrobacterium tumefaciens* Causing Crown

Gall Disease of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in Taiwan. *Plant Disease*.

<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-1007>

Cubero, J., Martínez, M. C., Llop, P., & Ló Pez, M. M. (1999). A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 86).

Dong, L., Sun, C., Thies, K., Luthe, D., & Graves, C. (1992). Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. *Phytopathology*, 82, 434–439.

Eiras, M., Resende, R. O., Missiaggia, A. A., & de Ávila, A. C. (2001). RT-PCR and Dot Blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. *Fitopatologia Brasileira*, 26(2), 170–175. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000200009>

Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. In *Trends in Plant Science* (Vol. 8, Issue 8, pp. 380–386). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00162-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6)

Expoflores. (2020). *Reporte Estadístico Anual 2020*. <https://expoflores.com/wp-content/uploads/2021/03/Anual-Expoflores.pdf>

Expoflores. (2021). *Reporte Estadístico Mensual Diciembre 2021*. <https://expoflores.com/wp-content/uploads/2021/12/diciembre-2021.pdf>

Fan, J., Cheng, Y., & Sun, M. (2020). Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. In *Chemical Record* (Vol. 20, Issue 12, pp. 1474–1504). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/tcr.202000087>

Fougère-Danezan, M., Joly, S., Bruneau, A., Gao, X. F., & Zhang, L. B. (2015). Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids. *Annals of Botany*, 115(2), 275–291. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu245>

- Ganjeh, A., Rahimian, H., & Basavand, E. (2021). *Agrobacterium tumefaciens* causing crown and stem gall disease of citrus propagation nursery in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 103(355). <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00679-z>/Published
- Gohlke, J., & Deeken, R. (2014). Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Issue APR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00155>
- Haas, J. H., Moore, L. W., Ream, W., & Manulis, S. (1995). Universal PCR Primers for Detection of Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 61, Issue 8).
- Habbadi, K., Duplay, Q., Chapulliot, D., Kerzaon, I., Benkirane, R., Benbouazza, A., Wisniewski-Dyé, F., Lavire, C., Achbani, E. H., & Vial, L. (2020). Characterization and phylogenetic diversity of *Allorhizobium vitis* isolated from grapevine in Morocco. *Journal of Applied Microbiology*, 128(3), 828–839. <https://doi.org/10.1111/jam.14523>
- Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. R. (1991). Plasmid Transformation of *Escherichia coli* and Other Bacteria. *Methods in Enzymology*, 204, 63–113. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-a](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-a)
- Haudecoeur, E., & Faure, D. (2010). A fine control of quorum-sensing communication in *Agrobacterium tumefaciens*. *Communicative & Integrative Biology*, 3(2), 84–88. <https://doi.org/10.4161/cib.3.2.10429>
- Hill, H. D., & Mirkin, C. A. (2006). The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nature Protocols*, 1(1), 324–336. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.51>

- INEC. (2022). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, EPAC 2021*.
https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2021/Principales%20resultados-ESPAC_2021.pdf
- Janick, J., & Hummer, K. E. (2009). *Rosaceae: Taxonomy, Economic Importance, Genomics*. In *Genetics and Genomics of Rosaceae* (pp. 1–17). Springer New York.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6>
- Jensen, M. A., Fukushima, M., & Davis, R. W. (2010). DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS ONE*, 5(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011024>
- Just, J., & Bendahmane, M. (2020). *Rosa* spp. In *Trends in Genetics* (Vol. 36, Issue 2, pp. 146–147). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.11.002>
- Kado, C. (2002). Crown gall. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2002-1118-01>
- Kado, C., & Heskett, M. (1970). Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60, 969–976.
<https://doi.org/10.1094/Phyto-60-969>
- Kado, C. I. (2014). Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Issue AUG). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00340>
- Khaledian, S., Nikkhah, M., Shams-bakhsh, M., & Hoseinzadeh, S. (2017). A sensitive biosensor based on gold nanoparticles to detect *Ralstonia solanacearum* in soil. *Journal of General Plant Pathology*, 83(4), 231–239. <https://doi.org/10.1007/s10327-017-0721-z>

- Li, M., Shi, J., Xie, X., Leng, Y., Wang, H., Xi, P., Zhou, J., Zhong, S., & Jiang, Z. (2013). Identification and application of a unique genetic locus in diagnosis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(4), 482–493. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.828321>
- Lin, Y. H., Pierce, B. D., Fang, F., Wise, A., Binns, A. N., & Lynn, D. G. (2014). Role of the VirA histidine autokinase of *Agrobacterium tumefaciens* in the initial steps of pathogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 5(MAY). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00195>
- Mafakheri, H., Mohsen Taghavi, S., Puławska, J., de Lajudie, P., Lassalle, F., & Osdaghi, E. (2019). Two Novel Genomospecies in the *Agrobacterium tumefaciens* Species Complex Associated with Rose Crown Gall. *Phytopathology*, 109(11), 1859–1868. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0178-R>
- Mañay, L. R. (2021). *Caracterización molecular y filogenética del virus fitopatógeno Citrus tristeza virus (CTV) aislado de cultivos de limón Meyer (Citrus x meyeri) en la parroquia de Tumbaco – Ecuador* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/28724/1/T-ESPE-050976.pdf>
- Mashiguchi, K., Hisano, H., Takeda-Kamiya, N., Takebayashi, Y., Ariizumi, T., Gao, Y., Ezura, H., Sato, K., Zhao, Y., Hayashi, K. I., & Kasahara, H. (2019). *Agrobacterium tumefaciens* Enhances Biosynthesis of Two Distinct Auxins in the Formation of Crown Galls. *Plant and Cell Physiology*, 60(1), 29–37. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy182>
- Menzel, W., Jelkmann, W., & Maiss, E. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99((1-2)), 81–92. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(01\)00381-0](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(01)00381-0)
- Morton, E. R., & Fuqua, C. (2012). Laboratory Maintenance of *Agrobacterium*. *Current Protocols in Microbiology*, 24(1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc03d01s24>

- Padmavathy, B., Vinoth Kumar, R., & Jaffar Ali, B. M. (2012). A direct detection of *Escherichia coli* genomic DNA using gold nanoprobe. *Journal of Nanobiotechnology*, 10.
<https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-8>
- Palumbo, J. D., Kado, C. I., & Phillips, D. A. (1998). An Isoflavonoid-Inducible Efflux Pump in *Agrobacterium tumefaciens* Is Involved in Competitive Colonization of Roots. *Journal of Bacteriology*, 180(12), 3107–3113. <https://doi.org/10.1128/jb.180.12.3107-3113.1998>
- Panda, T., & Deepa, K. (2011). Biosynthesis of gold nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(12), 10279–10294. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.5021>
- Pei Min, O. (2014). *Comparison of two selective Media for de isolation of Agrobacterium tumefaciens from the soil*. University Tunku Abdul Rahman.
- Poindexter, J. S. (1978). Selection for Nonbuoyant Morphological Mutants of *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 135(3), 1141–1145.
<https://doi.org/10.1128/jb.135.3.1141-1145.1978>
- Puławska, J., & Sobiczewski, P. (2005). Development of a semi-nested PCR based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. *Journal of Applied Microbiology*, 98(3), 710–721. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02503.x>
- Puławska, J., Warabieda, W., & Ismail, E. (2016). Identification and characterization of bacteria isolated from crown galls on stone fruits in Poland. *Plant Pathology*, 65(6), 1034–1043.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12482>
- Puławska, J., Willems, A., & Sobiczewski, P. (2006). Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(6), 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.11.002>

- Quintela, I. A., de Los Reyes, B. G., Lin, C. S., & Wu, V. C. H. (2019). Simultaneous colorimetric detection of a variety of *Salmonella* spp. In food and environmental samples by optical biosensing using oligonucleotide-gold nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01138>
- Raymond, O., Gouzy, J., Just, J., Badouin, H., Verdenaud, M., Lemainque, A., Vergne, P., Moja, S., Choisine, N., Pont, C., Carrère, S., Caissard, J. C., Couloux, A., Cottret, L., Aury, J. M., Szécsi, J., Latrasse, D., Madoui, M. A., François, L., ... Bendahmane, M. (2018). The *Rosa* genome provides new insights into the domestication of modern roses. *Nature Genetics*, *50*(6), 772–777. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0110-3>
- Sattarahmady, N., Tondro, G. H., Gholchin, M., & Heli, H. (2015). Gold nanoparticles biosensor of *Brucella* spp. genomic DNA: Visual and spectrophotometric detections. *Biochemical Engineering Journal*, *97*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.01.010>
- Sawada, H., Ieki, H., & Matsuda, I. (1995). PCR Detection of Ti and Ri Plasmids from Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(2), 828–831. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.828-831.1995>
- Sharma, P., Pandey, V., Sharma, M. M. M., Patra, A., Singh, B., Mehta, S., & Husen, A. (2021). A Review on Biosensors and Nanosensors Application in Agroecosystems. In *Nanoscale Research Letters* (Vol. 16, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03593-0>
- Sivaprasad Yeturu, Karla Méndez, Patricia Garrido, Sandy Serrano, & Ana Garrido. (2016). Serological and Molecular Identification of Cucumber Mosaic Virus (CMV) Infecting Banana Crops In Ecuador. *ECUADOR ES CALIDAD: Revista Científica Ecuatoriana*, *3*(1). <https://doi.org/10.36331/revista.v3i1.22>

- Spanos, A., Athanasiou, K., Ioannou, A., Fotopoulos, V., & Krasia-Christoforou, T. (2021). Functionalized magnetic nanomaterials in agricultural applications. In *Nanomaterials* (Vol. 11, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nano11113106>
- Spence, N. J., Mills, P. R., & Barbara, D. J. (2000). A survey of viruses of *Alstroemeria* in the UK and the characterisation of carlaviruses infecting *Alstroemeria*. *European Journal of Plant Pathology*, *106*(9), 843–847. <https://doi.org/10.1023/A:1008731508023>
- Swierczewska, M., Liu, G., Lee, S., & Chen, X. (2012). High-sensitivity nanosensors for biomarker detection. *Chemical Society Reviews*, *41*(7), 2641–2655. <https://doi.org/10.1039/c1cs15238f>
- Tan, B. S., Yabuki, J., Matsumoto, S., Kageyama, K., & Fukui, H. (2003). PCR primers for identification of opine types of *Agrobacterium tumefaciens* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, *69*(4), 258–266. <https://doi.org/10.1007/s10327-003-0044-0>
- Tandapilco, J. (2020). *Aislamiento y caracterización microbiológica, bioquímica y molecular de Agrobacterium tumefaciens a partir de tejidos vegetales infectados* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/14554>
- Tempo, J., Petit, A., Holsterst, M., van Montagut, M., & Schello, J. (1977). Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(7), 2848–2849. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.74.7.2848>
- Wang, Y., & Alocilja, E. C. (2015). Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens. *Journal of Biological Engineering*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13036-015-0014-z>

- Winans, S. C., Kerstetter, R. A., & Nester, E. W. (1988). Transcriptional Regulation of the *virA* and *virG* Genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 170(9), 4047–4054.
<https://doi.org/10.1128/jb.170.9.4047-4054.1988>
- Yang, W., Ji, L., Tan, L.-R., Li, S.-M., Wang, Y., Liu, H.-X., & Luo, Y.-M. (2011). Sensitive and specific detection of *Agrobacterium tumefaciens* in soil using a rapid polymerase chain reaction (PCR). *African Journal of Microbiology Research*, 5(6), 708–713.
<https://doi.org/10.5897/AJMR11.050>
- Zheng, L., Rodoni, B. C., Gibbs, M. J., & Gibbs, A. J. (2010). A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology*, 59(2), 211–220.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

Apéndices