



**Obtención de cultivos *in vitro* de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* L. mediante la transformación con *Rhizobium rhizogenes***

Dávila Toapanta, Mike Anthony

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Dra. Proaño Tuma, Karina Isabel Ph.D.

2 de febrero de 2022



PROYECTO\_TITULACION\_DAVILA\_MIKE.docx

Scanned on: 19:26 February 2, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	62
Words with Minor Changes	14
Paraphrased Words	127
Ommited Words	0



KARINA  
ISABEL



Website | Education | Businesses



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**Obtención de cultivos *in vitro* de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* L. mediante la transformación con *Rhizobium rhizogenes***" fue realizado por el señor **Dávila Toapanta, Mike Anthony** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 2 de febrero del 2022



Firmado electrónicamente por:  
**KARINA  
ISABEL**

.....  
**Karina Isabel Proaño Tuma, Ph.D.**

C. C. 1707245104



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Yo, **Dávila Toapanta, Mike Anthony**, con cédula de ciudadanía n° 1721088423, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “**Obtención de cultivos *in vitro* de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* L. mediante la transformación con *Rhizobium rhizogenes*” 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, 2 de febrero del 2022**

**Dávila Toapanta, Mike Anthony**

C.C. 1721088423



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo **Dávila Toapanta, Mike Anthony**, con cédula de ciudadanía n° 1721088423, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Obtención de cultivos *in vitro* de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* L. mediante la transformación con *Rhizobium rhizogenes*** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 2 de febrero del 2022**

.....  
**Dávila Toapanta, Mike Anthony**

C.C. 1721088423

## Dedicatoria

A mi madre, Marlene Toapanta por mostrarme el valor del esfuerzo y brindarme amor incondicional en cada etapa de mi vida.

A mis hermanas, Michelle y Melany por apoyarme en todo momento.

*Mike Anthony Dávila Toapanta*

## **Agradecimientos**

A mi madre, Marlene Toapanta, por apoyarme cada día y por todo el esfuerzo que ha realizado para que pueda cumplir esta meta.

A mis hermanas, Melany y Michelle, por confiar en mí, por todo su cariño y ser una fuente de inspiración.

A mi tía, Nancy Toapanta, gracias por todo lo que me ha dado y por estar siempre pendiente de mi bienestar.

A mi padre, Marco Dávila, gracias por seguir apoyándome y confiar en mí.

A mi directora de tesis, Dra. Karina Proaño, por permitirme desarrollar mi proyecto de titulación en su laboratorio, por la confianza depositada en mí y por todo el apoyo brindado a lo largo de la realización del proyecto.

A la Dra. Mónica Jadán, por ser un gran apoyo, por su guía y consejos, y por siempre recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio.

A las técnicas de laboratorio, Ing. Gabriela Miño e Ing. Cristina Cholota, por sus consejos para el desarrollo del proyecto.

A todos los compañeros de aula que de una u otra forma fueron apoyo durante esta etapa universitaria, y en especial a mis amigos, Jhosep y Eskarle.

¡Gracias a todos!

*Mike Dávila*

## Índice de Contenido

Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización.....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenido .....	8
Índice de Tablas .....	11
Índice de Figuras .....	12
Listado de Abreviaturas.....	13
Resumen .....	14
Abstract .....	15
Capítulo 1: Introducción .....	16
Formulación del Problema .....	16
Justificación del Problema .....	18
Objetivos.....	19
Objetivo General .....	19
Objetivos Específicos.....	20
Marco Teórico.....	20
<i>Nicotiana tabacum</i> L. ....	20
Transformación Genética de Plantas .....	21
<i>Rhizobium rhizogenes</i> .....	26



Raíces Pilosas .....	29
Hipótesis .....	32
Capítulo 2: Materiales y Métodos .....	33
Material Vegetal .....	33
Desinfección de Hojas .....	33
Obtención de Explantes .....	34
Cultivo de <i>R. rhizogenes</i> .....	35
Transformación de <i>Rhizobium rhizogenes</i> .....	36
Extracción y Purificación del Plásmido pSiM24-GUS .....	36
Preparación de Células Competentes .....	38
Transformación y Selección de Clones.....	38
Obtención de Raíces Pilosas.....	39
Ensayo Exploratorio .....	39
Preparación del Inóculo de <i>Rhizobium rhizogenes</i> .....	40
Inducción de Raíces Pilosas .....	40
Evaluación de Raíces Pilosas .....	41
Análisis Estadístico .....	43
Capítulo 3: Resultados .....	44
Desinfección de Hojas de Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.) .....	44
Cultivos de <i>R. rhizogenes</i> .....	45
Transformación de <i>R. rhizogenes</i> .....	47

	10
Extracción y Purificación del Plásmido pSiM24-GUS .....	47
Selección de Clones .....	50
Obtención de Raíces Pilosas.....	52
Ensayo Exploratorio .....	52
Raíces Pilosas Obtenidas a Partir de Cepas Tipo Silvestre .....	54
Evaluación de Raíces Pilosas.....	56
Raíces Pilosas Inoculadas con LBA 9402-GUS.....	61
Capítulo 4: Discusión .....	63
Desinfección de Hojas de Tabaco .....	63
Cultivos de <i>R. rhizogenes</i> .....	63
Transformación de <i>R. rhizogenes</i> .....	64
Obtención de Raíces Pilosas.....	66
Capítulo 5: Conclusiones .....	69
Capítulo 6: Recomendaciones .....	70
Capítulo 7: Referencias.....	71
Capítulo 8: Anexos .....	81

**Índice de Tablas**

<b>Tabla 1</b>	<i>Medios de cultivo para R. rhizogenes</i> .....	<b>36</b>
<b>Tabla 2</b>	<i>Master mix para la PCR del gen reportero GUS</i> .....	<b>37</b>
<b>Tabla 3</b>	<i>Programa de PCR para el gen reportero GUS</i> .....	<b>38</b>
<b>Tabla 4</b>	<i>Master mix para la PCR del gen rolB</i> .....	<b>42</b>
<b>Tabla 5</b>	<i>Programa de PCR para el gen rolB</i> .....	<b>43</b>
<b>Tabla 6</b>	<i>Concentraciones y pureza de los plásmidos extraídos</i> .....	<b>49</b>
<b>Tabla 7</b>	<i>Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para generación de raíces</i> .....	<b>54</b>
<b>Tabla 8</b>	<i>Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para porcentaje de raíces pilosas</i> .....	<b>57</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> <i>Esquema del vector binario pSiM24</i> .....	<b>25</b>
<b>Figura 2</b> <i>Estructura del plásmido Ri</i> .....	<b>28</b>
<b>Figura 3</b> <i>Proceso de cultivo de raíces pilosas</i> .....	<b>31</b>
<b>Figura 4</b> <i>Plantas de tabaco de 6 semanas de edad</i> .....	<b>34</b>
<b>Figura 5</b> <i>Proceso de obtención de explantes para los diferentes ensayos</i> .....	<b>35</b>
<b>Figura 6</b> <i>Resultados del ensayo de desinfección</i> .....	<b>44</b>
<b>Figura 7</b> <i>Cultivo primario de las cepas de R. rhizogenes</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 8</b> <i>Cultivo secundario de las cepas de R. rhizogenes</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 9</b> <i>Electroforesis del plásmido pSiM24-GUS</i> .....	<b>48</b>
<b>Figura 10</b> <i>Electroforesis de la PCR del plásmido pSiM24-GUS</i> .....	<b>49</b>
<b>Figura 11</b> <i>Colonias en medio de selección con kanamicina</i> .....	<b>50</b>
<b>Figura 12</b> <i>Colony PCR de bacterias LBA 9402 y 15834</i> .....	<b>51</b>
<b>Figura 13</b> <i>Crecimiento de las bacterias transformadas</i> .....	<b>52</b>
<b>Figura 14</b> <i>Ensayo exploratorio para cada vial de las cepas de R. rhizogenes</i> .....	<b>53</b>
<b>Figura 15</b> <i>Capacidad de generar raíces de las cepas de R. rhizogenes</i> .....	<b>54</b>
<b>Figura 16</b> <i>Porcentaje de explantes con raíces</i> .....	<b>55</b>
<b>Figura 17</b> <i>Explante inoculado con LBA 9402</i> .....	<b>56</b>
<b>Figura 18</b> <i>Distinción entre raíces adventicias y pilosas</i> .....	<b>57</b>
<b>Figura 19</b> <i>Porcentaje de raíces pilosas</i> .....	<b>58</b>
<b>Figura 20</b> <i>Crecimiento de los cultivos de raíces pilosas</i> .....	<b>59</b>
<b>Figura 21</b> <i>Electroforesis de la PCR para el gen rolB</i> .....	<b>60</b>
<b>Figura 22</b> <i>Explantes inoculados con la bacteria LBA 9402-GUS</i> .....	<b>61</b>
<b>Figura 23</b> <i>Cultivo in vitro de raíces pilosas</i> .....	<b>62</b>

**Listado de Abreviaturas**

<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>MS</b>	Murashige y Skoog
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>OD<sub>600</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm

## Resumen

La industria química del Ecuador no cuenta con sistemas de producción de moléculas para la elaboración de productos químicos. Una alternativa para solventar este problema es la producción de moléculas a través del sistema de cultivo de raíces pilosas. La presente investigación tiene como objetivo obtener cultivos *in vitro* de raíces pilosas de la planta modelo *Nicotiana tabacum* L. (tabaco) mediante la transformación con *Rhizobium rhizogenes*. Para esto se utilizó explantes de hojas de tabaco y se emplearon las cepas de *R. rhizogenes* 15834, A4 y LBA 9402. Con el objetivo de diferenciar entre raíces adventicias y raíces pilosas en los explantes, se realizó la inserción del plásmido pSiM24-GUS en las bacterias. El protocolo implementado para la obtención de raíces pilosas fue la incubación de los explantes con el inóculo bacteriano por 20 minutos, seguido por un tiempo de cocultivo de 3 días y posterior cambio a medio de inducción de raíces. Para distinguir entre raíces adventicias y raíces pilosas se realizó una comprobación visual de las características fenotípicas de geotropismo, crecimiento de raíces ramificadas y profusión de pelos radiculares. La cepa que generó un mayor porcentaje de explantes con raíces fue la LBA 9402 con una media de 96 %, seguido por la A4 con un 76 % y la 15834 con 67 %. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de raíces pilosas obtenidas con las diferentes cepas. Se verificó mediante PCR la transferencia del gen rolB de la bacteria al genoma de la planta. Finalmente, se obtuvieron cultivos *in vitro* de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* L. con las características fenotípicas típicas de la transformación con *R. rhizogenes*.

Palabras clave:

- ***RHIZOBIUM RHIZOGENES***
- **RAÍCES PILOSAS**
- ***NICOTIANA TABACUM***

### Abstract

Chemical industry in Ecuador does not have systems for molecules production for the development of chemical products. An alternative to solve this problem is molecules production through the hairy root culture system. The objective of this research is to obtain *in vitro* cultures of hairy roots of the model plant *Nicotiana tabacum* L. (tobacco) through transformation with *Rhizobium rhizogenes*. For this, explants of tobacco leaves were used and the strains of *R. rhizogenes* 15834, A4 and LBA 9402. In order to differentiate between adventitious roots and hairy roots in the explants, the plasmid pSiM24-GUS was inserted into the bacteria. The protocol implemented to obtain hairy roots was an incubation of the explants with the bacterial inoculum for 20 minutes, followed by a co-culture time of 3 days and subsequent change to root induction medium. To distinguish between adventitious roots and hairy roots, a visual verification of the phenotypic characteristics of geotropism, branched root growth and profusion of root hairs was performed. The strain that generated a higher percentage of explants with roots was LBA 9402 with a mean of 96%, followed by A4 with 76% and 15834 with 67%. There were no significant differences in the percentage of hairy roots obtained with the different strains. Transfer of the *rolB* gene from the bacteria to the plant genome was verified by PCR. Finally, *in vitro* cultures of hairy roots with the typical phenotypic characteristics of transformation with *R. rhizogenes* were obtained.

Key words:

- ***RHIZOBIUM RHIZOGENES***
- **HAIRY ROOTS**
- ***NICOTIANA TABACUM***

## Capítulo 1: Introducción

### Formulación del Problema

El mercado mundial de los compuestos químicos tiene un valor de más de 3.6 billones de euros por año, pero hasta ahora solo alrededor del 5 % de este mercado se aborda biotecnológicamente (Zeng, 2019). Los sistemas tradicionales de producción de estos compuestos contribuyen a problemas ambientales y socio económicos. Ya que son sistemas que dependen de recursos fósiles, con grandes emisiones de gases de efecto invernadero y que generan desechos tóxicos (Jang et al., 2018).

Una alternativa a estos sistemas, es la producción de químicos a través de sistemas de base biológica, que es un sector en rápida expansión con tasas de crecimiento anual del 12,6 % (Grand View Research, 2019). Diferentes compuestos químicos se pueden extraer de tejidos de plantas y microorganismos u obtener mediante procesos de fermentación a través de estos (González-Manzano & Dueñas, 2021).

Mundialmente, la demanda de compuestos químicos de origen vegetal ha crecido grandemente. Debido a que estos productos son ampliamente utilizados en industrias como la farmacéutica, alimentaria, cosmética, de fragancias, colorantes y de pesticidas, siendo parte de diferentes formulaciones o como compuesto único (Srivastava et al., 2018).

Aunque existen más de 50.000 especies de plantas utilizadas para este fin, los compuestos de interés en los tejidos de las plantas generalmente representan menos del 1% del peso total de la planta. Lo cual puede llevar a la sobreexplotación, amenazando a estas especies vegetales (Motolinía-Alcántara et al., 2021).



El principal desafío que enfrenta la industria química en el Ecuador es la dependencia de materia prima básica importada. Esto se debe a la falta de tecnología e inversión para desarrollar la industria petroquímica y otro tipo de industrias que provean principios activos (Ekos, 2017).

La industria química del Ecuador no cuenta con sistemas de base biológica para la producción de compuestos químicos. Posiblemente debido a que la principal arista para el desarrollo de estos sistemas de producción como es la biotecnología sigue en fase inicial en el país. Esto a consecuencia de la falta de fuentes de financiamiento, acceso limitado a insumos y equipos de laboratorio, trámites administrativos extenuantes y a la falta de políticas públicas que fomenten el bioemprendimiento en el país (Carrera, 2019).

Este escenario ha traído como consecuencia que en el 2020 el 43,8 % de las importaciones de materia prima realizadas por el sector industrial correspondan compuestos químicos y farmacéuticos. Estas importaciones alcanzaron un valor de 1.877 millones de dólares y responden a una producción insuficiente de estos compuestos respecto a la demanda nacional (Sánchez et al., 2021).

De las diversas estrategias que el país podría implementar para solventar el no contar con una industria química básica. Los sistemas de producción basados en plantas pueden ser una solución, en especial aquellos que hacen uso de la biotecnología. Uno de estos es el desarrollo de cultivos de raíces pilosas mediados por *Agrobacterium rhizogenes* (actualmente renombrada taxonómicamente como *Rhizobium rhizogenes* (de Lajudie & Young, 2018)), el cual ofrece un sistema de producción sostenible para los metabolitos deseados, biotransformación de compuestos y producción de proteínas terapéuticas (Srivastava et al., 2018).

## Justificación del Problema

Ecuador es un país megadiverso donde existen alrededor de 20 000 plantas vasculares, muchas de ellas con principios activos de interés. Se conoce que de estas cerca de 8000 poseen propiedades medicinales (Ruiz y Moreira, 2017). El 80% de la población utiliza estas plantas para el tratamiento primario de enfermedades (Bodeker et al., 2005). Este elevado porcentaje refleja la importancia de implementar tecnologías para el aprovechamiento y cobertura de la demanda de compuestos derivados de estas plantas.

La elaboración y comercialización de bioinsumos, fitofármacos, nutraceuticos, alimentos funcionales, prebióticos, junto con la producción de biocombustibles; son actividades que están creciendo en el Ecuador (Carrera, 2019). Por lo cual, fuentes de estos productos o de insumos para su elaboración, como son las plantas o sistemas de producción basados en estas, son de especial interés ya que contribuyen a dinamizar la economía del país.

El cultivo de raíces pilosas es una integración de técnicas biotecnológicas, combinando el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales con la transformación genética mediada por *Agrobacterium*. Esta tecnología permite el aprovechamiento de plantas medicinales y de otras que contengan compuestos de interés económico o industrial (Gantait y Mukherjee, 2021).

Las raíces pilosas se pueden obtener de una amplia variedad de plantas, permitiendo la producción de una variedad de moléculas complejas gracias a las nuevas herramientas genéticas disponibles. Su adaptabilidad las han posicionado como una alternativa a los sistemas clásicos para producir moléculas complejas, por lo que este sistema puede ser aprovechado por diferentes industrias como la farmacéutica, cosmética y alimentaria (Gutierrez-Valdes et al., 2020). Estos sistemas destacan

principalmente por ser fáciles de establecer y mantener, ser económicos, renovables y sobre todo sostenibles (Srivastava et al., 2018).

La presente investigación contribuirá al desarrollo de metodologías, generación de conocimientos y capacidades para la fabricación de moléculas que beneficien al sector de la salud y el sector industrial en nuestro país. Esta tecnología también puede utilizarse para abordar temas relacionados con la remediación ambiental, la producción de proteínas recombinantes y mejoramiento vegetal (Srivastava et al., 2020), siendo beneficiosos para la industria, medioambiente y agricultura.

Este estudio también promoverá el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad, alineándose a la Estrategia Nacional de Biodiversidad 2030 del Ecuador. Este plan tiene un rol protagónico en la transformación de la matriz productiva y erradicación de la pobreza (Ministerio del Ambiente, 2016).

Por lo tanto, dada la importancia de esta tecnología para obtener compuestos químicos y biomoléculas. Este trabajo pretende realizar una aproximación hacia el desarrollo de esta tecnología en el país. Para lo cual se pretende obtener cultivos *in vitro* de raíces pilosas de la planta modelo *Nicotiana tabacum* L. empleando tres cepas de *Rhizobium rhizogenes*, los cuales podrán ser empleados para futuros experimentos como la expresión de proteínas recombinantes, biotransformación de compuestos y diversos estudios relacionados a la raíz.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Obtener cultivos *in vitro* de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* L. mediante la transformación con *Rhizobium rhizogenes*.

### **Objetivos Específicos**

- Aplicar un procedimiento de desinfección a hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) para la obtención de explantes libres de patógenos.
- Establecer cultivos viables de *R. rhizogenes* para la inoculación *in vitro* de explantes de hojas de tabaco.
- Implementar una metodología para la obtención *in vitro* de raíces pilosas a partir de explantes de hojas de tabaco y cultivos de *R. rhizogenes*.
- Determinar el porcentaje de raíces pilosas obtenidas mediante la transformación con *R. rhizogenes*.

### **Marco Teórico**

#### ***Nicotiana tabacum* L.**

**Generalidades.** El tabaco es una planta originaria de Sudamérica perteneciente a la familia Solanaceae. Se distribuye en alturas de entre 1 a 1800 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio óptima para su crecimiento a 25 °C (Batoro y Ekowati, 2017).

La planta de tabaco posee un ciclo de vida anual. Puede alcanzar hasta 2.5 metros de alto, posee hojas simples lanceoladas, flores en panícula al final de las ramas, cáliz color verde y pétalos verdosos con tonalidad rojiza en el extremo superior (Batoro y Ekowati, 2017). Principalmente se utilizan sus hojas para fumar, inhalar o masticar, las cuales contienen entre el 0.6 y 9 % del alcaloide nicotina (González y Gurdíán, 1998).

**Importancia.** *Nicotiana tabacum* L. destaca por su importancia económica, siendo una de las plantas comerciales no comestibles más cultivadas alrededor del mundo (González y Gurdían, 1998). Es una planta que se ha convertido en un sistema modelo para la mayor parte de investigaciones referentes a la célula vegetal, cultivo de tejidos vegetales y biología molecular de plantas.

La planta de tabaco es un sistema bien investigado que se emplea en la producción de proteínas recombinantes, anticuerpos y productos químicos de interés para la industria (Ganapathi et al., 2004). El conocimiento de su composición genética, fisiología y bioquímica ha facilitado el trabajo en nuevas aplicaciones de ingeniería genética y su uso como sistema de producción de moléculas complejas (Kumar y Mitra, 2017).

### ***Transformación Genética de Plantas***

El término “transformación genética” se refiere al proceso de introducción de ácidos nucleicos en bacterias y células eucariotas (Chahal et al., 2011). Este proceso implica la introducción y expresión de genes foráneos en un organismo huésped. La transformación puede ser transiente si los genes se expresan extra cromosómicamente y no se heredan o puede ser estable si los genes foráneos se incorporan al genoma y se transmiten a la progenie (Handler, 2008).

La transformación genética en plantas se puede realizar utilizando métodos físicos, químicos o biológicos, entre los que se destacan: la biolística, la electroporación, el uso de polímeros como el polietilenglicol, la transformación mediada por *Agrobacterium* y los vectores virales. La eficiencia de la transformación genética en plantas sigue siendo un desafío debido principalmente a la pared celular que representa una barrera para la entrega de biomoléculas exógenas (Cunningham et al., 2018).

Las técnicas más empleadas para la transformación genética de plantas son la biolística y la mediada por *Agrobacterium*. La biolística permite atravesar la pared celular de las células vegetales mediante la fuerza mecánica, pero a menudo daña partes del tejido produciendo bajos niveles de expresión génica. La transformación mediada por *Agrobacterium* en cambio, aunque tiene limitaciones en cuanto al rango de huéspedes susceptibles, es con la que se obtienen mejores resultados (Cunningham et al., 2018).

**Transformación Genética mediada por *Agrobacterium*.** El género *Agrobacterium* pertenece a una gran familia de bacterias asociadas a plantas, denominada Rhizobiaceae. A lo largo de los años, los análisis basados en nuevos criterios taxonómicos, como las comparaciones de secuencias de ARN 16S y la secuenciación de genomas completos, apuntaron hacia la estrecha relación entre los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*. Razón por la cual, varios taxónomos han propuesto reagrupar estas especies bajo el nombre del género *Rhizobium*. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el nombre *Agrobacterium* permanece en uso en la mayoría de las publicaciones y aplicaciones de microbiología del suelo, fisiología vegetal, biología celular y molecular de plantas por su uso generalizado (Lacroix & Citovsky, 2013).

La alta eficiencia de la transformación mediada por *Agrobacterium*, ha hecho de este proceso una importante herramienta para la investigación de plantas y una tecnología de base para la industria de la biotecnología agrícola (Gelvin, 2017). Se conoce que las cepas virulentas del género *Agrobacterium* pueden de forma natural transformar genéticamente una gran variedad de especies de plantas, las cuales son utilizadas en el laboratorio para transformar levaduras, hongos y células animales (Lacroix et al., 2006).

La transformación genética de las células vegetales mediada por *Agrobacterium* se basa en la transferencia de una región del plásmido inductor de tumores (Ti) o del plásmido inductor de raíces (Ri), desde la bacteria al genoma nuclear de la planta. El segmento que se transfiere se conoce como ADN transferido (T-DNA) y tiene un tamaño de entre 10 a 30 Kpb. El procesamiento del T-DNA y su transferencia a la planta, se relaciona en gran medida con la actividad de los genes de virulencia (*vir*) que también se encuentran en el plásmido (Gelvin, 2003).

La transformación mediada por *Agrobacterium* presenta algunos desafíos, ya que muestra una estrecha especificidad tanto con el huésped como con el tejido utilizado (Nyaboga et al., 2014). En este proceso existen varios factores que pueden limitar la transformación, entre los cuales se incluyen el genotipo, la herida en el tejido vegetal, la síntesis de inductores fenólicos del gen *vir* por la planta, la unión bacteriana al tejido vegetal, la transferencia del T-DNA al citoplasma de la planta, la translocación nuclear del T-DNA y la integración al genoma de la planta (Gelvin, 2000). Inclusive la integración aleatoria del ADN puede causar la interrupción de genes importantes o la inserción en regiones del genoma con expresión deficiente o inestable (Gelvin, 2017). Sin embargo, esta integración aleatoria se puede prevenir usando la magnificación con virus no integrables o mediante el uso de plásmidos especializados (Cunningham et al., 2018).

En la manipulación genética de plantas se utiliza tanto el sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens* como *R. rhizogenes*, siendo este último sistema uno de los que presenta mayores ventajas en el proceso. La transformación mediada por *R. rhizogenes* tiene la ventaja de que las células vegetales se diferencian espontáneamente en el fenotipo de raíces pilosas en la mayoría de las plantas. Las raíces transformadas son fáciles de cultivar en medio libre de fitorreguladores, muestran

un crecimiento acelerado con ausencia de geotropismo y presentan una mayor ramificación. Estas características sirven como marcador visual para la identificación y selección de células transformadas sin necesidad de antibióticos (Tepfer, 1983). A partir de estas raíces, se pueden regenerar plantas transgénicas que conserven rasgos fenotípicos característicos que sirvan como marcadores morfológicos para seleccionar plantas transgénicas (Bahramnejad et al., 2019).

**Vectores Binarios.** Un vector binario es una herramienta estándar en la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. El vector está compuesto por bordes de T-DNA, múltiples sitios de clonación, sitios de replicación para *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, genes marcadores seleccionables, genes reporteros y elementos accesorios (que mejoran la eficiencia o dan mayor capacidad al sistema) (Komari et al., 2006).

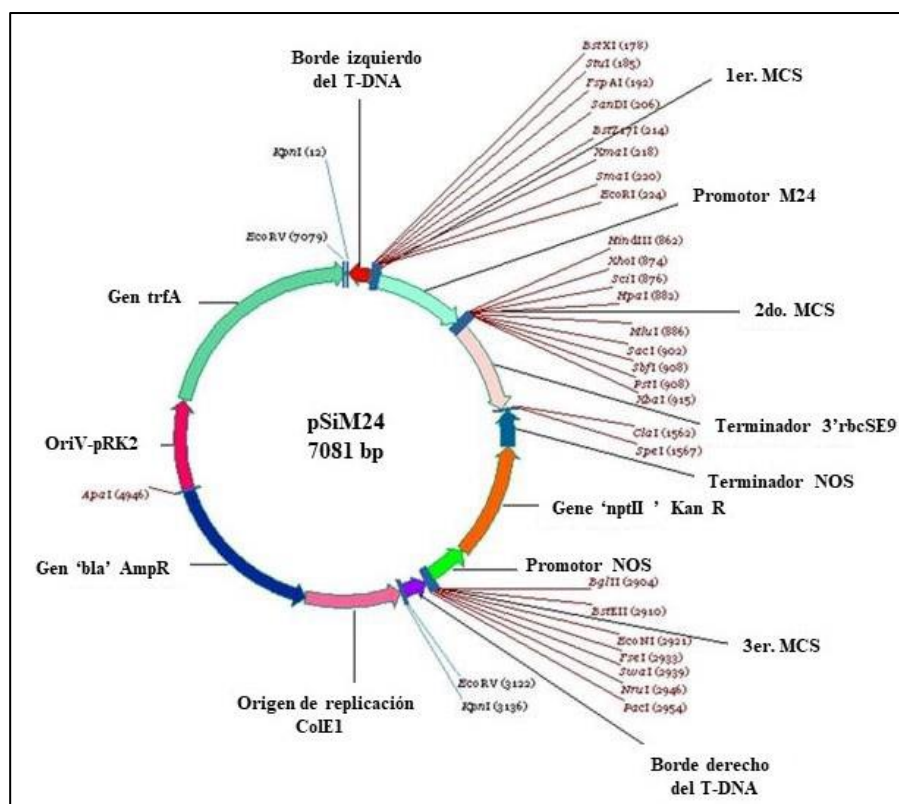
Existen varios autores que describen el uso de vectores binarios con *A. tumefaciens* pero es a partir de la publicación de Bahramnejad y sus colaboradores en 2019, cuando se tiene una descripción completa de los numerosos vectores binarios empleados con *R. rhizogenes* y sus aplicaciones. El desarrollo de vectores binarios basados en plásmidos Ri, facilitó manipulaciones genéticas rápidas y factibles en plantas. El uso exitoso de vectores binarios junto con *R. rhizogenes* en estudios de silenciamiento de genes y edición del genoma, demuestran la capacidad y adaptabilidad de los sistemas de raíces pilosas para ser aplicados en este tipo de investigaciones (Bahramnejad et al., 2019).



**Plásmido pSiM24.** El plásmido pSiM24 es un vector binario de expresión de genes heterólogos en plantas, el cual puede ser utilizado tanto para expresión transiente o estable. Este vector tiene un tamaño de 7081 pb, contiene el promotor de transcripción modificado M24 del virus del mosaico de *Mirabilis*, bordes derecho e izquierdo del T-DNA, tres sitios de clonación múltiple, el terminador 3'rbcsE9, sitios de replicación para *Escherichia coli* (ColE1) y *Agrobacterium* (pRK2-OriV), el gen de la replicasa trfA, genes marcadores de selección para la resistencia a la kanamicina (nptII) y la resistencia a la ampicilina (bla) (Figura 1)(Sahoo et al., 2014).

**Figura 1**

Esquema del vector binario pSiM24



*Nota.* Adaptado de “pSiM24 is a novel versatile gene expression vector for transient assays as well as stable expression of foreign genes in plants” (p.4), por Sahoo et al., 2014, *PloS One*, 9 (6).

El plásmido pSiM24 ha sido probado en *Arabidopsis* y tabaco para la transferencia de transgenes empleando la proteína verde fluorescente (GFP) y la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Este sistema se utilizó tanto de forma transitoria (agroinfiltración, electroporación de protoplastos y biolística) como de forma estable (mediada por *Agrobacterium* y biolística) (Sahoo et al., 2014).

**Genes Reporteros.** Los genes reporteros son genes que codifican proteínas o que catalizan reacciones específicas que son fácilmente detectables. Son particularmente útiles para el análisis de la actividad promotora, la localización de proteínas y estudios de interacción. Un sistema ideal de genes reporteros debería ser detectable *in situ*, sensible, cuantitativo, rápido, reproducible, seguro y con baja actividad endógena. La  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), la luciferasa (LUC), la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) y la antocianina, son los genes reporteros más utilizados en la investigación de plantas (Anami et al., 2013).

La  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) es una enzima bacteriana codificada por el gen *uidA* (*gusA*) de *Escherichia coli*, que se encuentra mayoritariamente en microorganismos y animales (Jefferson, 1987). Esta enzima cataliza la hidrólisis de una amplia variedad de  $\beta$ -glucurónidos, como el cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido (X-Gluc). Este compuesto incoloro es convertido por la enzima  $\beta$ -glucuronidasa a un producto azul índigo insoluble, que se utiliza para la localización histoquímica *in situ* de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en células y tejidos (Coussens et al., 2012).

### ***Rhizobium rhizogenes***

*Rhizobium rhizogenes* (anteriormente denominada *Agrobacterium rhizogenes*) es una bacteria del suelo que habita cerca de las raíces de las plantas. En la década de los 70's fue identificada como el agente bacteriano causante del síndrome de raíces pilosas en plantas (Guillon et al., 2006; Gutierrez-Valdes et al., 2020). El crecimiento de

las raíces ocurre debido a la transferencia de la secuencia de ADN (T-DNA) del plásmido inductor de raíces (Ri) de la bacteria al genoma de la planta (Muranaka y Saito, 2010).

*R. rhizogenes* también es capaz de transferir el T-DNA de vectores binarios en trans, lo que facilita la selección de raíces pilosas transgénicas y de plantas obtenidas a partir de las mismas. Existe evidencia científica del éxito en la transformación genética de plantas utilizando *R. rhizogenes* con vectores binarios que albergan construcciones genéticas deseadas. (Christey, 2001).

**Características.** *R. rhizogenes* es un bacilo Gram negativo. Esta bacteria se la puede encontrar sola o en pares, no forma esporas, es móvil y posee de uno a seis flagelos (Ozyigit et al., 2013). Las condiciones para su cultivo en laboratorio son temperaturas entre 25 °C y 28 °C, niveles de pH de 5 a 9 y biotina como factor de crecimiento. Las colonias son generalmente de color blanco o ligeramente crema. Se pueden producir grandes cantidades de polisacárido extracelular en algunos medios dando a las colonias un aspecto acuoso. Algunas cepas de *R. rhizogenes* son de crecimiento lento y puede requerir hasta una semana para formar colonias (Matthysse, 2006).

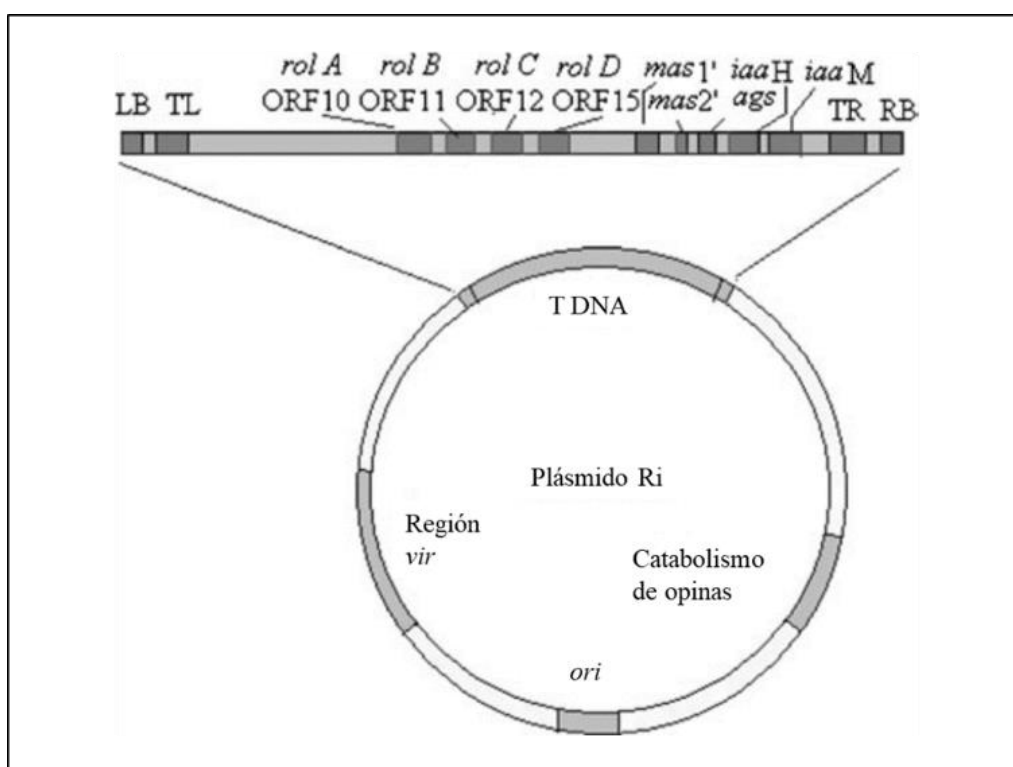
**Plásmido Ri.** El plásmido Ri de *R. rhizogenes* tiene un tamaño de aproximadamente 200 Kpb. Sus elementos codifican para la síntesis y catabolismo de opinas, así como el inicio, transferencia e integración del T-DNA (Gelvin, 2003).

El plásmido Ri posee diferentes segmentos de genes, los cuales se presentan en la Figura 2. El plásmido contiene la región *vir* que provee la información para la síntesis de proteínas de virulencia. Además, posee una región correspondiente al catabolismo de opinas, un sitio de replicación (*ori*) y el T-DNA. Dentro del T-DNA se

identifican dos regiones separadas entre sí por aproximadamente por 15 kb, el T-DNA izquierdo (TL-DNA) y T-DNA derecho (TR-DNA). El TR-DNA contiene los genes, *iaaM* e *iaaH*, responsables de la biosíntesis de auxinas y los genes responsables de la síntesis de manopina (*mas10* y *mas20*) y agropina (*ags*). En el TL-DNA se localizan los genes inductores de raíces (*rol*) (De Paolis et al., 1985).

## Figura 2

Estructura del plásmido Ri



*Nota.* Adaptado de "Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism" (p. 409), por S. Chandra, 2012, *Biotechnology Letters*, 34 (3). Región TL: T-DNA izquierdo, TR: T-DNA derecho, *vir*, *ori*, y de catabolismo de opinas.

Las proteínas de virulencia (*vir*) participan en la generación de la cadena T de una hebra y su transporte a las células vegetales. Las proteínas de virulencia VirD1 y VirD2 cortan el plásmido Ri en las secuencias repetidas del borde del T-DNA, después de lo cual VirD2 se une covalentemente al extremo 5' de la hebra T resultante. Este complejo VirD2 /cadena T abandona la bacteria a través de un sistema de secreción de proteínas de tipo IV (T4SS), que se compone de 11 proteínas Vir B y VirD4, que incluye un canal de transporte de membrana y un T-pilus (Chandra, 2012).

Después de ingresar al citoplasma, las proteínas efectoras de virulencia y la cadena de T-DNA se dirigen al núcleo. Las proteínas de virulencia contienen secuencias de señal de localización nuclear (NLS) que son importantes para el direccionamiento nuclear. Cada hebra T es recubierta con varias moléculas VirE2 en la célula vegetal, ayudando al direccionamiento hacia el núcleo. Las cadenas T con proteínas *vir* asociadas interactúan con proteínas vegetales y forman supercomplejos T. La importina  $\alpha$  (proteína vegetal) junto con VirE2 y VirE3 ayuda en la orientación nuclear. Una vez en el núcleo, con ayuda de la proteína VirF, tanto las proteínas efectoras *vir* como las proteínas vegetales se eliminan de las cadenas T. Este proceso finaliza con la integración de la cadena T en el genoma de la planta huésped (Chandra, 2012).

### ***Raíces Pilosas***

El nombre de “raíces pilosas” se debe a que se desarrollan abundantes raíces en el tejido vegetal formando una masa semejante a pelos. Las raíces pilosas se producen luego de la infección de *R. rhizogenes* en tejido vegetal que ha sufrido heridas y en donde se transfiere la secuencia T-DNA del plásmido Ri al genoma de la planta (Dubrovsky y Shishkova, 2007; Muranaka y Saito, 2010).

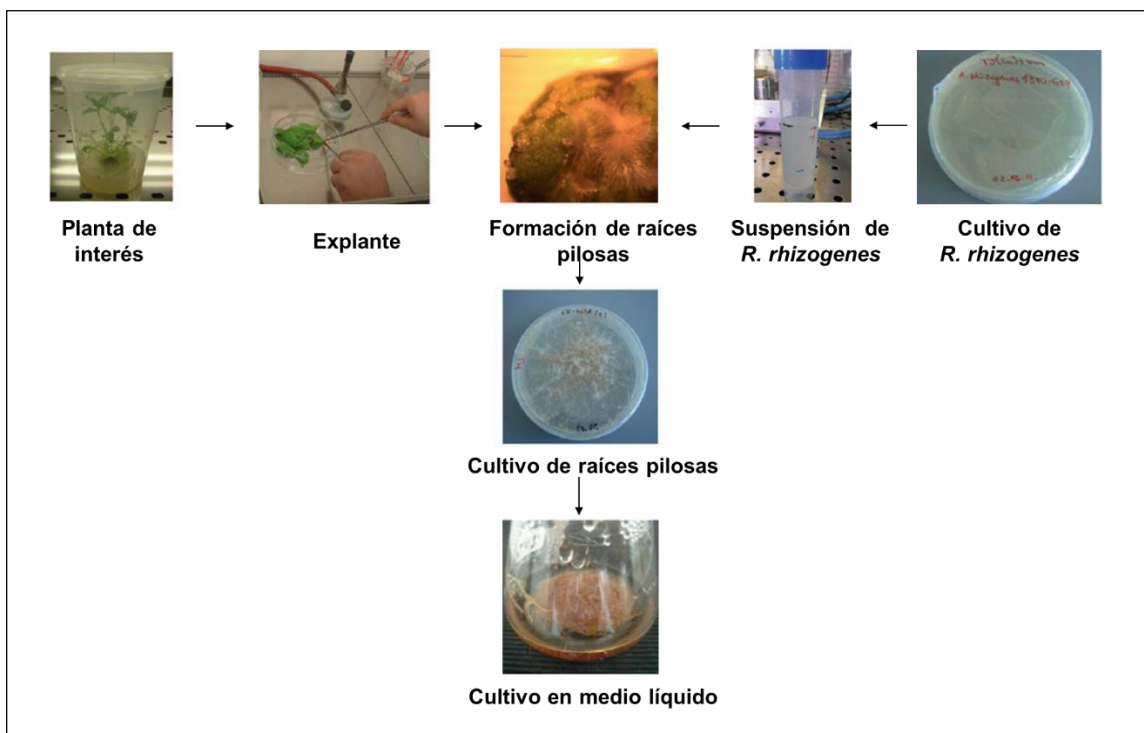
Este crecimiento de raíces se caracteriza por el desarrollo de órganos radiculares altamente diferenciados y funcionales. Los cuales presentan con una alta tasa de crecimiento, abundante crecimiento de raíces ramificadas, profusión de pelos radiculares y ausencia de geotropismo (Häkkinen & Oksman-Caldentey, 2018).

Los eventos moleculares involucrados en la formación de raíces pilosas aún no se conocen del todo. Sin embargo, el proceso de transformación genética se lo puede dividir en los siguientes pasos: 1) Los compuestos fenólicos son liberados por la planta después de sufrir una herida, los cuales promueven la unión de la bacteria a las células vegetales; 2) El T-DNA es procesado en las células bacterianas, formando el complejo T ( hebras T y otras proteínas asociadas); 3) Se produce la transferencia de complejos T de las bacterias al genoma de la planta; 4) Se incorpora el T-DNA en el genoma de la planta e inicia su expresión y 5) Las raíces pilosas emergen del sitio de infección (Georgiev et al., 2012).

**Cultivo *in vitro* de Raíces Pilosas.** Se puede inducir la formación de raíces pilosas en el laboratorio, realizando heridas en tejidos provenientes de una planta e inoculándolos con la bacteria. Las raíces presentan una alta tasa de crecimiento, capacidad de crecer sin fitorreguladores adicionados al medio, estabilidad genética y bioquímica. Las raíces se cultivan *in vitro* en medio semi sólido y posteriormente en medio líquido, donde pueden ser usadas a una mayor escala como se muestra en la Figura 3 (Dubrovsky y Shishkova, 2007).

### Figura 3

#### Proceso de cultivo de raíces pilosas



*Nota.* Adaptado de “Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource” (p. 529), por Georgiev et al., 2012, *Trends in Biotechnology*, 30 (10).

Con el objetivo de confirmar que estas raíces son raíces pilosas producto de la infección con *R. rhizogenes* y no raíces adventicias, se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores que amplifican los genes *rol* y *vir*. En los procesos de transformación, cuando se utilizan genes foráneos, la integración se puede confirmar mediante su expresión o realizando una PCR donde se utilicen cebadores específicos del transgén (Gutierrez-Valdes et al., 2020).

**Aplicaciones del Cultivo Raíces Pilosas.** Las raíces pilosas son una herramienta muy importante para estudiar la biosíntesis de compuestos de interés en las plantas. Estos compuestos (metabolitos secundarios) se pueden acumular en las raíces como un sistema para la producción masiva de principios activos (Gutierrez-Valdes et al., 2020).

Este sistema es una alternativa a la producción de compuestos en microorganismos, especialmente para aquellos productos de origen vegetal. En la producción de proteínas se obtiene un adecuado plegamiento en comparación con los sistemas de microorganismos. Además, este sistema permite una rápida caracterización de la función de genes y actividad enzimática *in vivo*, ya que estas raíces mantienen de forma natural cofactores y sustratos precursores (Shi et al., 2021).

### **Hipótesis**

La transformación con *Rhizobium rhizogenes* permite obtener cultivos *in vitro* de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* L.



## Capítulo 2: Materiales y Métodos

### Material Vegetal

Para esta investigación se utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) obtenidas mediante germinación de semillas proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Las semillas fueron incubadas en agua destilada a 4 °C durante 48 horas para eliminar la latencia. Las semillas flotaron fueron descartadas. Alrededor de 50 semillas fueron colocadas en macetas con sustrato compuesto de tierra negra, pomina y turba (2:1:1). La germinación y crecimiento fue llevada a cabo en invernadero, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas oscuridad. Las plantas fueron regadas dos veces por semana con solución nutritiva ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnSO}_4$  0.5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  0.5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  0.1  $\mu\text{M}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  0.01  $\mu\text{M}$ , Fe-EDTA 15  $\mu\text{M}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{KNO}_3$  2 mM) ajustada a un pH entre 6.8 y 7.2 (Matt et al., 2001).

### Desinfección de Hojas

Se utilizaron hojas de plantas de tabaco de aproximadamente 6 semanas de edad (Figura 4). Se utilizó una modificación del protocolo propuesto por Rage y sus colaboradores (2020), el cual consistió en sumergir las hojas en una solución de hipoclorito de sodio 0.5 % con tres gotas de Tween 20 durante 10 minutos y posteriormente realizar cuatro lavados con agua estéril.

**Figura 4**

*Plantas de tabaco de 6 semanas de edad*



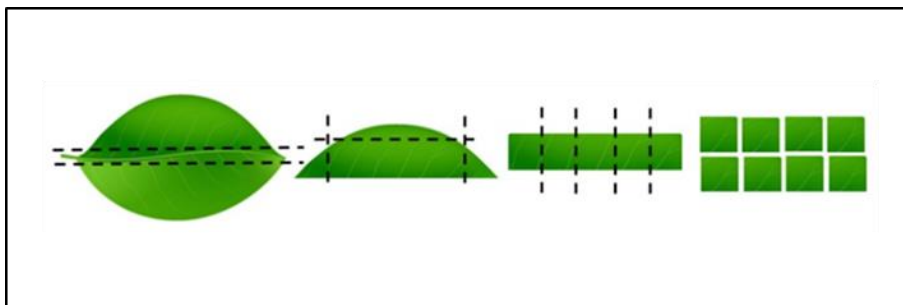
Para evaluar el protocolo se utilizaron explantes obtenidos como se detalla en el apartado de “obtención de explantes”. Se evaluó un total de 20 explantes, colocando 5 con el haz en contacto con el medio, por cada placa Petri. Se utilizó medio basal Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) con 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar. Los explantes se incubaron en cámara de crecimiento Thermo Scientific Modelo 818 a 25 °C con 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Se evaluaron las variables contaminación, necrosamiento, oxidación y viabilidad. Las variables mencionadas se evaluaron por observación a los 5, 15 y 21 días de incubación.

***Obtención de Explantes***

A las hojas previamente desinfectadas se les retiró el pecíolo, la nervadura central y los bordes de la hoja. Se recortó en explantes cuadrados de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, como se muestra en la Figura 5. Finalmente, se les realizó 4 heridas en lugares aleatorios con una aguja estéril.

## Figura 5

Proceso de obtención de explantes para los diferentes ensayos



*Nota.* Tomado de “*Agrobacterium*-mediated Transformation of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi Leaf Explants” (p. 5), por Rosales-Campos & Gutiérrez-Ortega, 2019, *Bio-protocol*, 9 (2).

### Cultivo de *R. rhizogenes*

El cultivo de *R. rhizogenes* se realizó utilizando las cepas LBA9402, A4 y 15834 donadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por VTT Bio- and Chemical Processes, Plant Biotechnology Group.

Se tomaron los viales correspondientes a cada una de las cepas bacterianas del ultracongelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y con un asa de siembra se tomó una porción de la parte superior. Posteriormente, se procedió a la siembra en placas Petri con medio sólido para incubarlas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas o hasta la formación de colonias. Para realizar los cultivos líquidos se tomó una colonia con un asa estéril y se resuspendió en el medio. El crecimiento se evaluó a través de la densidad óptica a  $600\text{ nm}$  ( $\text{OD}_{600}$ ).

En el caso de la cepa A4 el medio se suplementó con  $0,1\text{ mg/L}$  de biotina. En las cepas LBA9402 y 15834 el medio se suplementó con  $100\text{ mg/L}$  de rifampicina, siguiendo la información proporcionada por el centro de investigación que proporcionó las cepas. La composición de los medios de cultivo se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1***Medios de cultivo para R. rhizogenes*

<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Composición por cada litro</b>
15834 y LBA 9402	YMB + Rifampicina (100 mg/L)	0.5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.1 g NaCl 10 g Manitol 0.4 g Extracto de Levadura
A4	AMP + Biotina (0.1 mg/L)	2 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 g Extracto de Levadura 5 g NaCl 0.5 g Caseína hidrolizada 8 g Manitol

*Nota.* La rifampicina y biotina fueron colocadas después de esterilizar el medio de cultivo.

Adicionalmente se realizó un ensayo preliminar para evaluar el crecimiento de cultivos primarios y secundarios de las cepas bacterianas a las 24, 48 y 72 h. Este ensayo se realizó inoculando una colonia en 5 mL de medio para cultivos primarios. Los 5 mL de cultivo primario se colocaron en 25 mL con acetosiringona (200 µM) para obtener los cultivos secundarios. Los cultivos se incubaron a 28 °C con una agitación de 160 rpm.

### **Transformación de *Rhizobium rhizogenes***

#### ***Extracción y Purificación del Plásmido pSiM24-GUS***

El plásmido se extrajo de bacterias *Escherichia coli* DH5α utilizando una modificación del método de Lisis Alcalina de Green y Sambrook (2016). El proceso se inició con la centrifugación de 1.5 mL de cultivo de bacterias en medio líquido a 4 °C y 14000 rpm por 30 segundos. El pellet se resuspendió en 100 µL de solución de lisis 1 (50 mM glucosa o dextrosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8). Luego se colocaron 200 µL de solución de Lisis 2 (0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS), se homogenizó

por inversión y se incubó por 2 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de solución de Lisis 3 (5 M de acetato de potasio, ácido glacial acético), se mezcló por inversión y se incubó por 5 minutos en hielo. Se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm y el sobrenadante resultante se purificó utilizando el doble del volumen de etanol al 95 %, seguido de una centrifugación a 14000 rpm por 5 minutos a 4 °C. El pellet resultante se lavó con etanol al 70 % y se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm a 4 °C. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de solución tampón TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA).

Se observó en gel de agarosa al 0.8 %, se cuantificó y se determinó su relación  $A_{260}/A_{280}$  usando el espectrofotómetro NanoDrop.

Para verificar que el DNA extraído corresponde al plásmido pSiM24-GUS y que contiene el gen reportero *GUS*, se realizó una PCR empleando los primers diseñados por Garzón (2019), Forward: CACAAATCAGAAGGAAGAGA y Reverse: CCGATGATACGAACGAAG. El master mix se preparó según lo indicado en la Tabla 2. Se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de muestra de DNA plasmídico.

**Tabla 2**

*Master mix para la PCR del gen reportero GUS*

Reactivo	Concentración final	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua		23.45
Buffer	1 X	3
$\text{MgCl}_2$	2.5 mM	1.5
dNTPs	0.2 mM	0.6
Primer F	0.2 $\mu\text{M}$	0.6
Primer R	0.2 $\mu\text{M}$	0.6
Platinum <i>Taq</i> DNA polimerasa	1.25 U	0.25
Muestra	-	1
<b>Total</b>		<b>30</b>

*Nota.*  $\mu\text{L}$ : microlitros;  $\mu\text{M}$ : micromolar; mM: milimolar

El número de ciclos, tiempos y temperatura del programa de PCR empleado se muestra en la Tabla 3. Una vez finalizada la PCR, el resultado se visualizó en gel de agarosa al 1%.

**Tabla 3**

*Programa de PCR para el gen reportero GUS*

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	94 °C	1	10 min
Desnaturalización	94 °C		45 s
Annealing	56 °C	35	30 s
Extensión	72 °C		100 s
Extensión final	72 °C	1	5 min

*Nota.* min: minutos, s: segundos.

### ***Preparación de Células Competentes***

Las células competentes se prepararon utilizando el protocolo propuesto por Daspute y sus colaboradores (2019). Se cultivaron células de *R. rhizogenes* en 100 mL de medio de cultivo líquido a 28 °C durante 20 a 24 horas, hasta alcanzar un OD<sub>600</sub> final entre 0.5 y 0.7. Se enfrió el cultivo en hielo durante 20 minutos y se transfirieron 40 mL del cultivo a tubos cónicos de 50 mL. Se centrifugaron los tubos a 5000 g durante 15 minutos a 4 °C y el pellet fue lavado con 40, 20 y 8 mL de glicerol estéril al 10 %. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 1 mL de glicerol estéril al 30 %. Finalmente, se transfirió alícuotas de 50 µL a tubos de 1,5 mL, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

### ***Transformación y Selección de Clones***

Las células electro competentes se descongelaron en hielo. Al tubo con 50 µL de células se añadió 3 µL (5 ng/µL) de ADN plasmídico y se incubó durante 2 minutos. Se transfirieron 50 µL de este cultivo a una cubeta de electroporación previamente enfriada,

se secó la cubeta y se aplicó un pulso eléctrico a 2,5 kV. Se añadió inmediatamente 300  $\mu$ L de medio de cultivo líquido en la cubeta y se mezcló suavemente. Se transfirió la alícuota de 50  $\mu$ L a un tubo estéril de 1,5 mL y se agitó a 160 rpm a 28 °C durante 3 horas. Se sembró toda la alícuota en medio con agar que contiene el antibiótico de selección Kanamicina 25 mg/L y se incubó durante 3 días a 28 °C.

Para verificar que la bacteria adquirió el plásmido pSiM24-GUS, se realizó una Colony PCR. Se tomó la colonia a evaluar con una punta de micropipeta y se la resuspendió en el master mix, cuyos componentes se muestran en la Tabla 2. La única modificación del master mix es que en lugar de 1  $\mu$ L de muestra, se agregó un 1  $\mu$ L de agua para completar el volumen final de 30  $\mu$ L. El programa utilizado se muestra en la Tabla 3.

Las puntas utilizadas para tomar y resuspender las colonias en el master mix sirvieron como inóculos. El volumen empleado de medio líquido fue de 2 mL con el antibiótico de selección kanamicina 25 mg/L. El crecimiento se evaluó observando turbidez en el medio a las 24 horas de cultivo. Posteriormente se realizó un stock del cultivo con glicerol al 20%. La viabilidad de los stocks se verificó sembrando una porción de la parte superior del stock de glicerol en placas Petri con el antibiótico de selección.

## **Obtención de Raíces Pilosas**

### ***Ensayo Exploratorio***

Se realizó un ensayo exploratorio de la capacidad de generar raíces pilosas de las cepas de *R. rhizogenes* 15834, A4 y LBA 9402. Se utilizó 3 viales iniciales por cada una de las cepas. Cada muestra se encontraba al 25% de glicerol con diferentes tratamientos de incubación (T1: 16 horas, T2: 24 horas y T3: 16 horas con previa inmersión en nitrógeno líquido). Cada tubo fue considerado una muestra diferente para su evaluación.

El OD<sub>600</sub> de los cultivos líquidos se ajustó a 0.4. Los inóculos de cada cepa se prepararon como se indica en el siguiente apartado de “preparación del inóculo”. Se siguió la metodología del apartado “inducción de raíces pilosas”. Se inocularon 5 explantes por cada vial y se determinó visualmente el porcentaje de explantes que generaron raíces para cada uno.

### ***Preparación del Inóculo de Rhizobium rhizogenes***

Los inóculos se prepararon siguiendo una modificación del protocolo utilizado por Daspute y sus colaboradores (2019). Se sembró la porción superior del stock de glicerol de *R. rhizogenes* sobre la superficie de las placas de medio de cultivo con los antibióticos adecuados y se incubó a 28 °C durante 2 días. Se tomó una colonia y se suspendió en 5 mL de medio líquido con los antibióticos apropiados. Se incubó durante 24 h a 28 °C y 160 rpm. Este cultivo (cultivo primario) se transfirió a un matraz estéril de 100 mL que contiene 25 mL de medio de cultivo con los antibióticos apropiados y acetosiringona 200 µM (cultivo secundario). El cultivo secundario se incubó durante 24 h a 28 °C y 160 rpm, transcurrido el tiempo se ajustó a un OD<sub>600</sub> de 0.4. Se centrifugó a 3.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente (24 °C). Se eliminó el sobrenadante, se añadieron 20 mL de 1/4 MS con 1 % de sacarosa y se resuspendió la muestra. El paso anterior se realizó por dos ocasiones.

### ***Inducción de Raíces Pilosas***

La inducción de raíces pilosas se llevó a cabo utilizando explantes obtenidos como se indicó en el apartado “obtención de explantes”. Los explantes se transfirieron a un tubo de 50 mL que contenían el inóculo de *R. rhizogenes* y se sumergieron durante 20 minutos. Los explantes se retiraron de la solución bacteriana y se colocaron sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso de bacteria. Se transfirieron los explantes a placas Petri con medio de cocultivo y se colocaron 10 explantes por placa Petri con el



envés de la hoja hacia arriba. Las placas fueron selladas con Parafilm e incubadas durante 3 días en oscuridad a una temperatura entre 22 a 25 °C. El medio de cocultivo está compuesto por 2,15 g/L de sales MS, 1 % agar, 1,0 % sacarosa y 200 µM de acetosiringona.

Finalmente, se transfirieron 5 explantes por placa Petri al medio de inducción si el inóculo procedía de bacterias tipo salvaje o al medio de selección de raíces si el inóculo pertenecía a bacterias transformadas con el plásmido pSiM24-GUS. Los explantes se colocaron con el envés hacia arriba y lo más plano posible. Las placas Petri se sellaron con Parafilm e incubaron a una temperatura entre 22 a 25 °C hasta el crecimiento de las raíces pilosas. El medio de inducción de raíces está compuesto por 2,15 g/L de sales MS, 1,0 % agar, 1,0 % sacarosa y 150 mg/L de cefotaxima. El medio de selección de raíces contiene lo mismo que el medio inducción más 50 mg/L de kanamicina.

El porcentaje de explantes que generaron raíces se determinó visualmente, transcurridos 15 días desde su colocación en el medio de inducción o selección, según correspondía. Para cada cepa de *R. rhizogenes* tipo silvestre se evaluó 6 cajas Petri con 5 explantes cada una. Para la bacteria LBA 9402 con el plásmido pSiM24-GUS se evaluó 4 cajas Petri con 5 explantes cada una.

### ***Evaluación de Raíces Pilosas***

Para distinguir entre raíces adventicias y raíces pilosas formadas en los explantes de hojas de tabaco, se realizó una evaluación fenotípica de las raíces obtenidas. Este proceso se llevó a cabo mediante la observación de los explantes bajo el estereomicroscopio. Se verificó la presencia o ausencia de geotropismo y profusión de pelos radiculares a los 15 días de incubación en el medio de inducción de raíces. Se evaluó un total de 20 explantes para cada una de las cepas de *R. rhizogenes* 15834, A4

y LBA9402. Los resultados se presentaron como el porcentaje de raíces pilosas respecto al total de raíces en cada explante.

A continuación, por cada cepa de *R. rhizogenes* se extrajó 4 raíces de los explantes y se las colocó individualmente en cajas Petri con medio de inducción de raíces. Se evaluó la longitud de las raíces a los 3 y 5 días. A los 5 días se verificó la presencia o ausencia de geotropismo, crecimiento de raíces ramificadas y profusión de pelos radicales.

Finalmente, se evaluó la transferencia del gen *rolB* de la bacteria al genoma de la planta. Para lo cual se extrajo DNA genómico de 100 mg de raíces por cada una de las cepas, empleando el kit *AccuPrep*<sup>®</sup> Plant Genomic DNA Extraction (Bioneer Corporation, República de Corea). Se realizó una PCR utilizando los primers Forward: ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA y Reverse: TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC (Y. M. Wang et al., 2001). El master mix se preparó según lo indicado en la Tabla 4. Se utilizó 2 µL de muestra de DNA genómico.

**Tabla 4**

*Master mix para la PCR del gen rolB*

Reactivo	Concentración final	Volumen (µL)
Agua	-	14.05
Buffer	1 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	0.75
dNTPs	0.2 mM	0.5
Primer F	1 µM	2.5
Primer R	1 µM	2.5
Platinum <i>Taq</i> DNA polimerasa	1 U	0.2
Muestra	-	2
<b>Total</b>		<b>25</b>

El número de ciclos, tiempos y temperatura del programa de PCR empleado se muestra en la Tabla 5. Una vez finalizada la PCR, el resultado se visualizó en gel de agarosa al 1%.

**Tabla 5**

*Programa de PCR para el gen rolB*

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	94 °C	1	5 min
Desnaturalización	94 °C		1 min
Annealing	56 °C	30	1 min
Extensión	72 °C		90 s
Extensión final	72 °C	1	5 min

*Nota.* min: minutos, s: segundos.

### **Análisis Estadístico**

Se empleó estadística descriptiva y diferentes pruebas estadísticas para el análisis de los datos. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks modificado, prueba de Levene, el análisis de varianza (ANOVA), la prueba de Tukey y la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Para todas las pruebas se consideró un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . Estos análisis junto con los gráficos estadísticos se realizaron empleando los programas InfoStat, GraphPad Prism 9 y Excel.

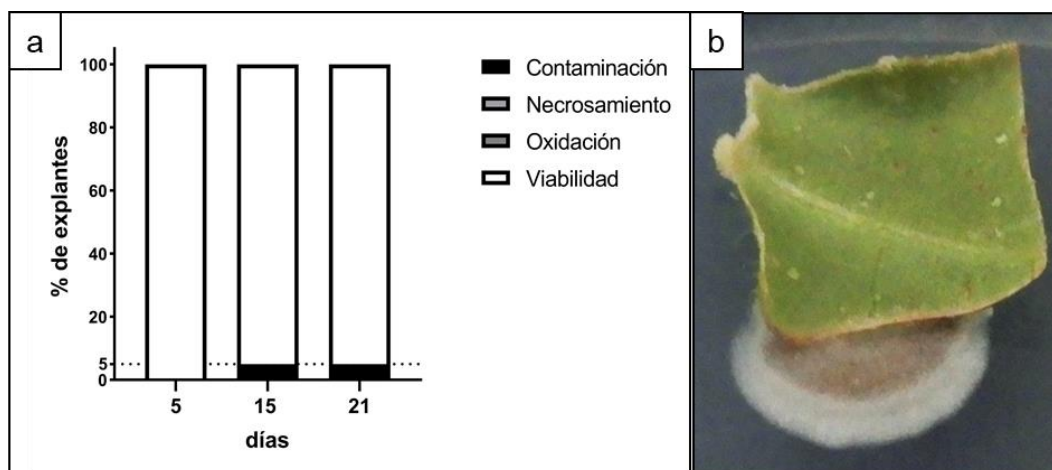
### Capítulo 3: Resultados

#### Desinfección de Hojas de Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

Se utilizaron plantas de tabaco de 6 semanas de edad. La desinfección de hojas se realizó utilizando hipoclorito de sodio al 0.5% por 10 minutos, siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Se analizaron 20 explantes observando las variables de contaminación, necrosamiento, oxidación y viabilidad, durante 5, 15 y 21 días (Figura 6).

#### Figura 6

*Resultados del ensayo de desinfección*



*Nota.* a) Resumen en porcentaje de las variables evaluadas, b) explante con contaminación por hongo, no se observa necrosamiento ni oxidación.

En la Figura 6a, se puede observar que a los 5 días de incubación no hubo contaminación, necrosamiento ni oxidación. A los 15 días en cambio, se observó la presencia de hongos en el medio alrededor de un explante (Figura 6b), aunque no se observó señales de necrosamiento u oxidación. La presencia de esta contaminación se mantuvo hasta los 21 días sin observar contaminación en otros explantes.

Estos resultados sugieren que el protocolo empleado es eficaz en un 95 % para la desinfección de hojas de tabaco, manteniendo la viabilidad de los explantes durante el tiempo evaluado. Además, estos resultados indican que un tiempo adecuado para confirmar la existencia o no de contaminación, es de al menos 15 días para descartar presencia hongos.

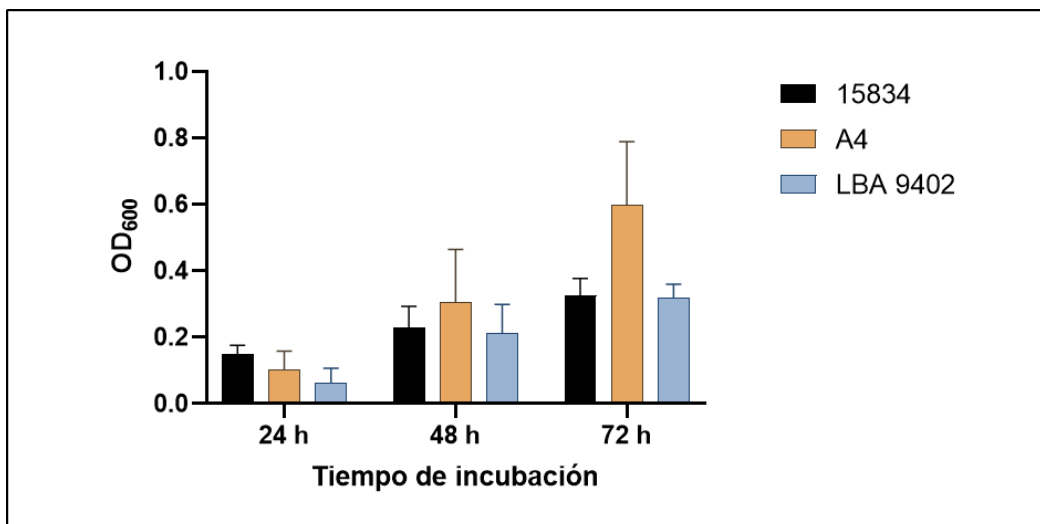
### **Cultivos de *R. rhizogenes***

Con el objetivo de determinar la capacidad de generar raíces pilosas de las cepas de *R. rhizogenes* 15834, A4 y LBA 9402, se evaluó el crecimiento de cultivos primarios a las 24, 48 y 72 h.

El resultado del ensayo se muestra en la Figura 7, donde se puede observar la media de tres replicas. La cepa que presentó mayor crecimiento a las 24 horas fue la 15834 con un OD<sub>600</sub> de 0.15, seguido por la A4 con 0.10 y la LBA 9402 con 0.06. A las 48 y 72 horas la cepa A4 mostró mayor crecimiento con medias de 0.26 y 0.46, respectivamente. Las cepas 15834 y LBA9402 presentaron un crecimiento similar tanto a las 48 como a las 72 horas. Estos resultados sugieren una baja tasa de crecimiento de las diferentes cepas evaluadas, independientemente del tiempo de incubación.

**Figura 7**

*Cultivo primario de las cepas de R. rhizogenes*

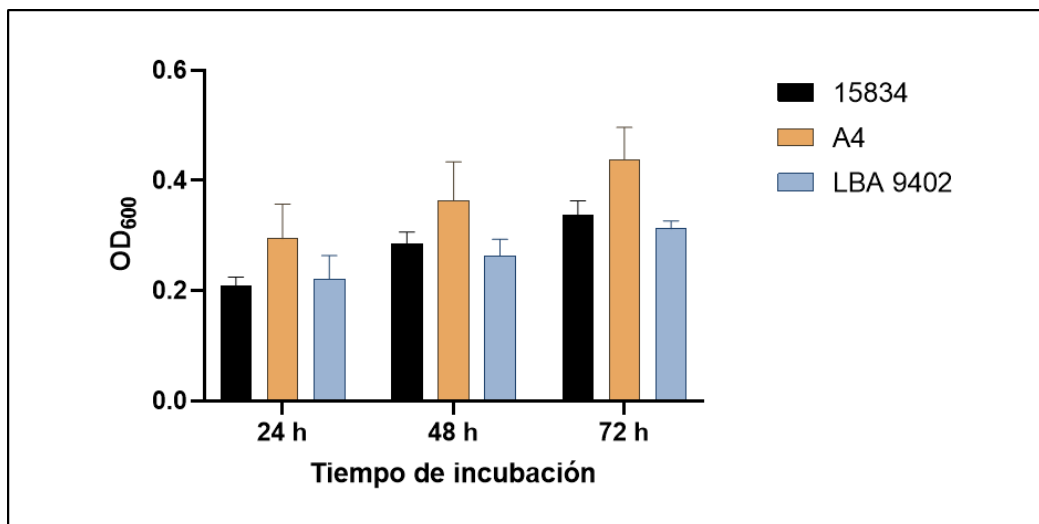


*Nota.* Crecimiento de las cepas bacterianas 15834, A4 y LBA9402. OD<sub>600</sub>: densidad óptica a 600 nm. Media de 3 réplicas.

Posteriormente se evaluaron los cultivos secundarios. El crecimiento de los cultivos secundarios para cada una de las cepas fue también evaluado a las 24, 48 y 72 horas (Figura 8). La cepa que mostró mayor crecimiento a estas condiciones fue la A4 con un OD<sub>600</sub> de 0.29, 0.36 y 0.43 a las 24, 48 y 72 h, respectivamente. Las cepas 15834 y LBA 9402 tuvieron menor crecimiento que A4 y presentaron valores similares de crecimiento entre ellas en los 3 tiempos de evaluación. Valores promedio de OD<sub>600</sub> de 0.43 a las 72 h sugieren una baja tasa de crecimiento bacteriano.

**Figura 8**

*Cultivo secundario de las cepas de R. rhizogenes*

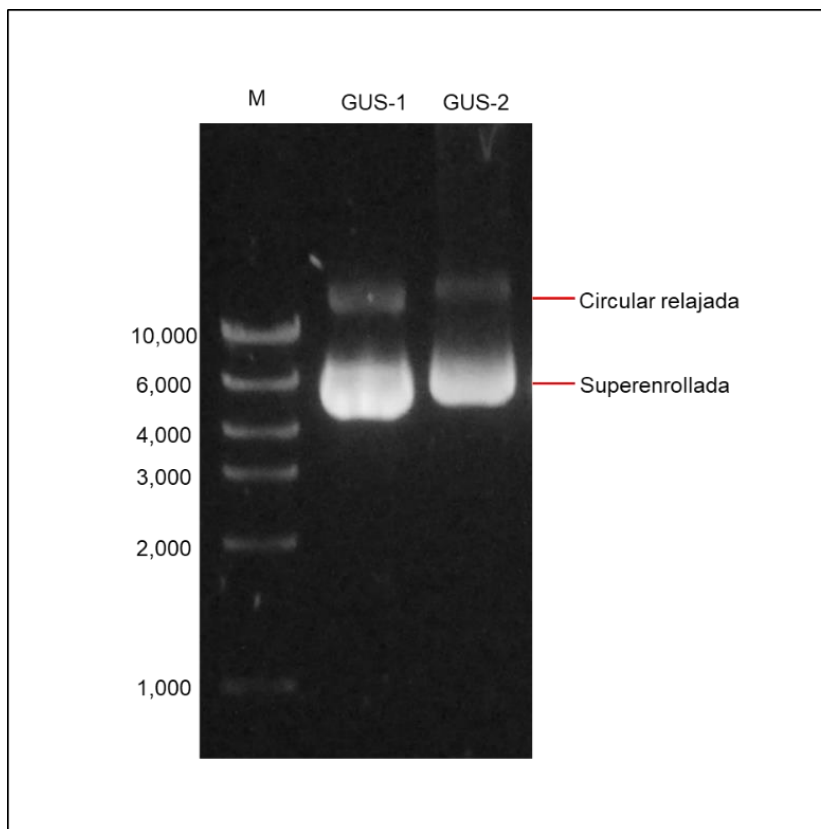


*Nota.* Se muestra la media de 3 réplicas. Cepas bacterianas 15: 15834, A4, LBA: LBA9402. OD<sub>600</sub>: densidad óptica a 600 nm.

## Transformación de *R. rhizogenes*

### ***Extracción y Purificación del Plásmido pSiM24-GUS***

El primer paso para la transformación de *R. rhizogenes* es el aislamiento y purificación del plásmido pSiM24-GUS. El plásmido se extrajo de 2 cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  utilizando el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. El material genético del plásmido se visualizó en un gel de agarosa al 0.8 % con SYBR Safe. En la Figura 9, se puede observar bandas de DNA plasmídico correspondientes a dos conformaciones de DNA, la circular relajada y superenrollada. Se observa esta conformación debido a que no se utilizó ningún tratamiento previo con enzimas de restricción, lo que verifica que se trata de material de DNA correspondiente al plásmido.

**Figura 9***Electroforesis del plásmido pSiM24-GUS*

*Nota.* Se muestran dos conformaciones del plásmido pSiM24-GUS, la circular relajada y la superenrollada. M: Marcador molecular High DNA Mass Ladder.

Adicionalmente, se determinó la concentración y la pureza de los plásmidos usando el espectrofotómetro NanoDrop. Los resultados se observan en la Tabla 4. Los valores de concentración promedio fueron de 7046.8 ng/μL, lo que indica una alta concentración. Los datos de pureza indican que se obtuvo una buena calidad de ADN, ya que los valores en la relación  $A_{260}/A_{280}$  fueron mayores a 1.8 y los valores de  $A_{260}/A_{230}$  estuvieron en el rango de 2 a 2.2. Por lo tanto, la pureza y concentración de estos plásmidos fue de buena calidad para ser utilizados en la transformación de las bacterias.



**Tabla 6**

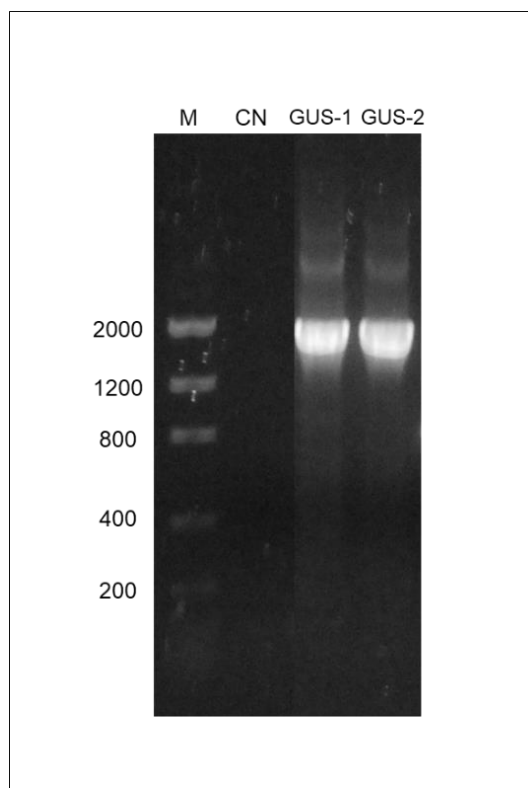
*Concentraciones y pureza de los plásmidos extraídos*

Plásmido	Concentración ng/ $\mu$ L	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
pSiM24-GUS 1	6152,4	1.96	2.25
pSiM24-GUS 2	7941,2	2.04	2.23

La comprobación de que los plásmidos contenían el gen reportero *GUS* se realizó mediante PCR y su posterior visualización en gel de agarosa al 1 % con SYBR Safe. En la Figura 10 se observa que los plásmidos contienen el gen *GUS* debido a la presencia de una banda de alrededor de 2000 pb.

**Figura 10**

*Electroforesis de la PCR del plásmido pSiM24-GUS*



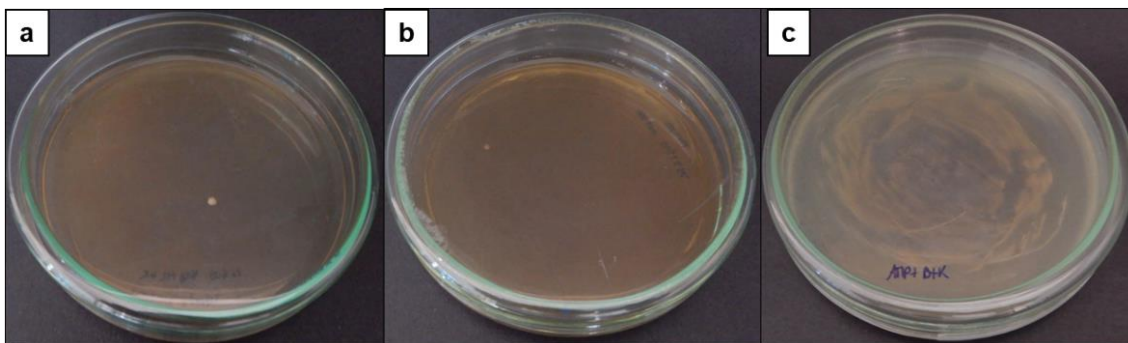
*Nota.* M: Marcador molecular Low DNA Mass Ladder, CN: Control negativo.

### **Selección de Clones**

Una vez completado el proceso de electroporación de las bacterias con el plásmido pSiM24-GUS, se visualizó el crecimiento de las bacterias en medio de selección con el antibiótico kanamicina. En este ensayo se determinó que la concentración de antibiótico kanamicina 25 mg/L permitió el crecimiento masivo de la cepa A4. Las colonias se formaron a los 3 días de incubación a 28 °C, como se observa en la Figura 11. Por lo tanto, la eficiencia de transformación se calculó únicamente para las cepas 15834 y LBA9402. Este dato se obtuvo dividiendo el número de colonias visibles en la placa sobre los  $\mu\text{g}$  de DNA empleados. Se obtuvo una eficiencia de  $2.35 \times 10^2$  UFC/ $\mu\text{DNA}$  para la cepa LBA 9402 y de  $4.73 \times 10^1$  para la 15834, lo que muestra baja eficiencia de transformación.

### **Figura 11**

*Colonias en medio de selección con kanamicina*



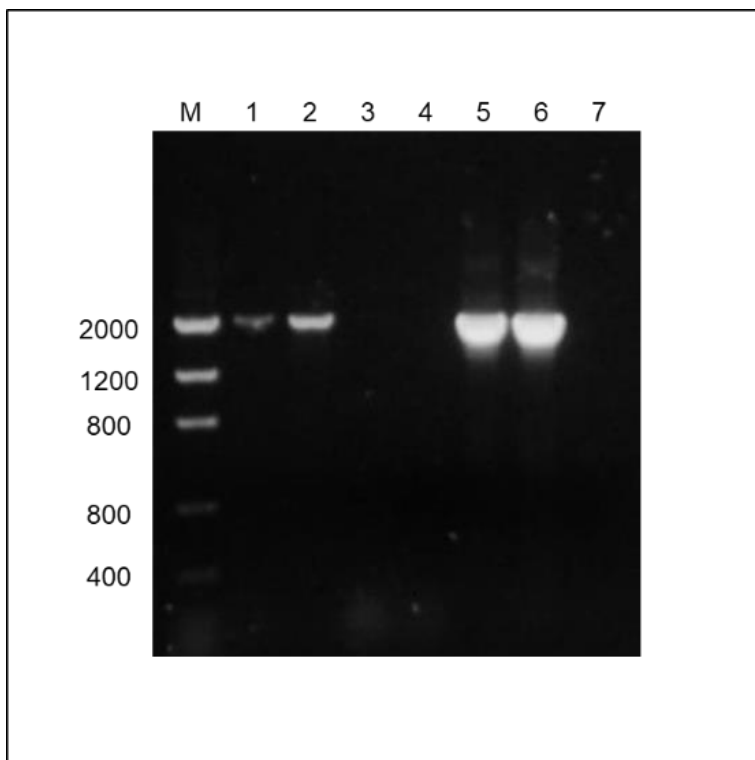
*Nota.* Crecimiento en medio con kanamicina 25 mg/L de bacterias electroporadas con plásmido pSiM24-GUS. a) LBA9402, b) 15834 y c) A4.

Para confirmar que las colonias poseen el plásmido con el gen reportero *GUS*, se realizó una Colony PCR. La visualización se realizó en gel de agarosa al 1 % con SYBR Safe. En la Figura 12 se observa una banda de alrededor de 2000 pb que

corresponde aproximadamente al tamaño del gen *GUS*, lo que confirma la presencia del plásmido en las colonias analizadas.

### Figura 12

*Colony PCR de bacterias LBA 9402 y 15834*



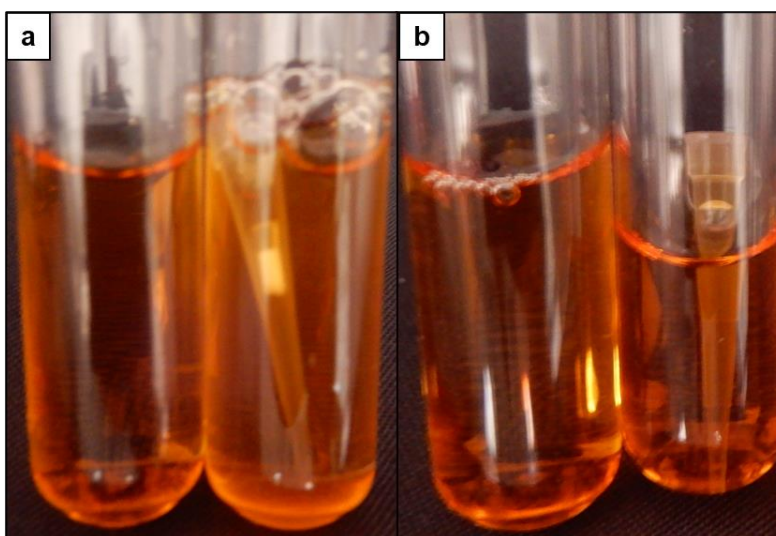
*Nota.* Productos de Colony PCR en gel agarosa al 1%. M) Marcador molecular Low DNA Mass Ladder, Muestras: 1) LBA 9402 *GUS*, 2) 15834 *GUS*; Controles negativos: 3) LBA 9402, 4) 15834, 7) agua libre de nucleasas; Controles positivos: 5) Plásmido pSiM24-*GUS* y 6) Colonia *E. coli GUS*.

Con el objetivo de obtener cultivos viables de las bacterias transformadas, se realizó un cultivo con las puntas utilizadas para la Colony PCR. El cultivo se realizó en tubos de vidrio con medio YMB y kanamicina 25 mg/L (Figura 13). Se registró los resultados observando la turbidez del medio comparado con el control. La bacteria LBA

9402 *GUS* mostró crecimiento, sin embargo, en la bacteria 15834 *GUS* no se observó el mismo resultado. Estos datos muestran que la bacteria 15834 *GUS* no es viable, por tal razón, se realizó únicamente el stock de glicerol al 20 % de la bacteria LBA 9402 *GUS* para utilizarla en los ensayos posteriores.

### Figura 13

*Crecimiento de las bacterias transformadas*



*Nota.* Comparación de las bacterias transformadas (a la derecha) con el control (a la izquierda). Cultivos de bacterias a: LBA 9402 *GUS* y b: 15834 *GUS*.

### Obtención de Raíces Pilosas

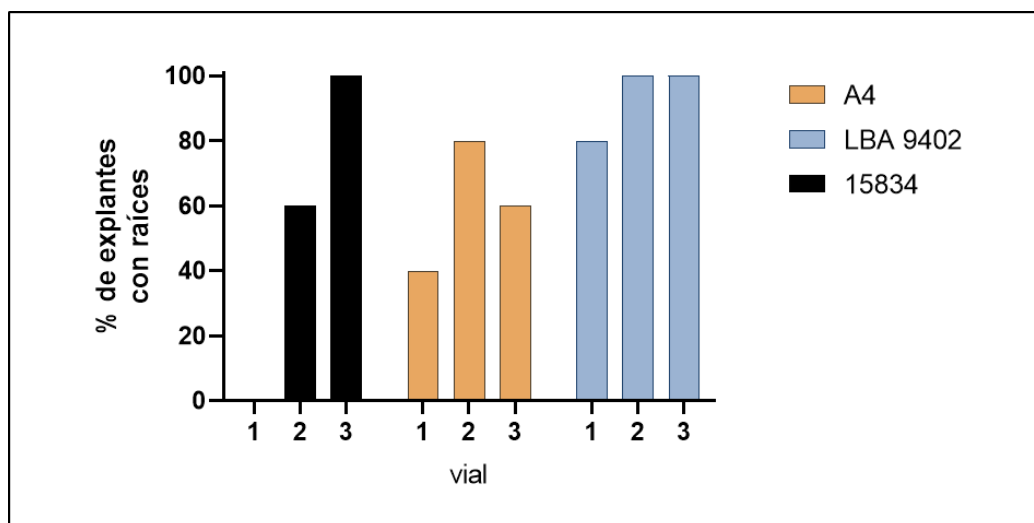
#### *Ensayo Exploratorio*

En este ensayo se evaluó la capacidad de las cepas *R. rhizogenes* 15834, A4 y LBA 9402 para generar raíces en explantes de tabaco. Se empleó 3 viales por cepa con diferentes tratamientos de almacenamientos cada una. Cada muestra se encontraba al 25% de glicerol con diferentes tratamientos de incubación (T1: 16 horas, T2: 24 horas y T3: 16 horas con previa inmersión en nitrógeno líquido). Cada tubo fue considerado una muestra diferente para su evaluación.

En la Figura 14 se muestra el porcentaje de explantes que generaron raíces. Se observa que los viales con el tratamiento T3 de las cepas tanto 15834 como LBA 9402 generaron un 100 % de explantes con raíces. En cambio, para la cepa A4 el mejor tratamiento fue el T2 con una generación de raíces en los explantes del 80%.

**Figura 14**

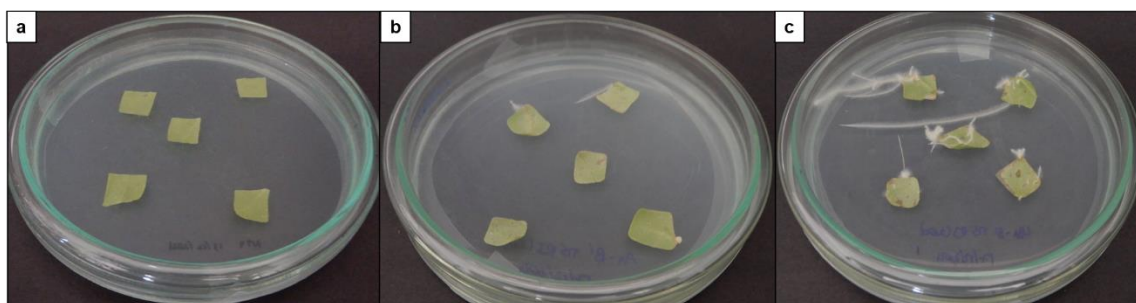
*Ensayo exploratorio para cada vial de las cepas de R. rhizogenes*



En la Figura 15 se muestra el criterio de evaluación para la generación de raíces de los explantes. En la Figura 15a se muestra explantes con 0 % de generación de raíces, posiblemente por una pérdida de la virulencia de la bacteria. En la Figura 15b se observa aproximadamente un 40 %, mientras que en la Figura 15c un 100% de explantes con raíces. Estos criterios permitieron seleccionar cepas con una mayor capacidad de generación de raíces para los siguientes ensayos.

## Figura 15

Capacidad de generar raíces de las cepas de *R. rhizogenes*



Nota. a: 0, b: 40 y c: 100 % de generación de raíces.

Estos resultados permitieron seleccionar a T3 como el mejor tratamiento para la cepa 15834 y LBA 9402 y el T2 como el mejor tratamiento para la cepa A4.

### **Raíces Pilosas Obtenidas a Partir de Cepas Tipo Silvestre**

Los explantes inoculados con las cepas de *R. rhizogenes* 15834, A4 y LBA 9402 en medio de inducción de raíces, fueron evaluados a los 15 días. Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar la cepa que genera un mayor porcentaje de explantes con raíces.

En el Anexo 1 se muestran los datos del porcentaje de explantes con raíces de 6 repeticiones para cada cepa. A estos datos de porcentaje de explantes se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks (modificado) (Tabla 5).

**Tabla 7**

*Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para generación de raíces*

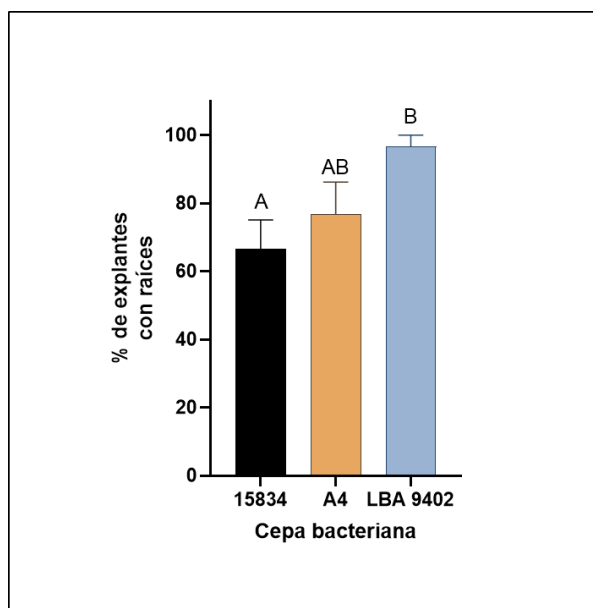
Variable	n	Media	D.E.	W*	p
Residuos Porcentaje	18	0	17.49	0.95	0.6459

El p valor de 0.6459 determina que los datos siguen una distribución normal. Por lo que a continuación, se realizó la prueba de Levene (Anexo 2) para determinar si existe homogeneidad de varianzas. El p valor de 0.1357 confirma que los datos presentan esta homogeneidad.

Una vez comprobados los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se realizó un ANOVA (Anexo 3). El p valor de 0.0395 menor a  $\alpha=0.05$ , determinó que existen diferencias significativas en las medias del porcentaje de explantes que generaron raíces. Empleando la prueba de Tukey (Anexo 4), se determinó que con la cepa LBA 9402 se obtiene un mayor porcentaje de explantes con raíces que con la cepa 15834. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre la cepa A4 y las cepas 15834 y LBA, como se observa en la Figura 16.

**Figura 16**

*Porcentaje de explantes con raíces*



*Nota.* Capacidad de generar raíces para las diferentes cepas de *R. rhizogenes*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

En esta figura se observa que la cepa que generó un mayor porcentaje de explantes con raíces fue la LBA 9402 con una media de 96 %, seguido por la A4 con un 76 % y la 15834 con 67 %. Estos resultados sugieren que la cepa LBA 9402 tiene una mayor capacidad de inducir la formación de raíces (Figura 17).

### **Figura 17**

*Explante inoculado con LBA 9402*



*Nota.* Explante de hoja de tabaco con raíces.

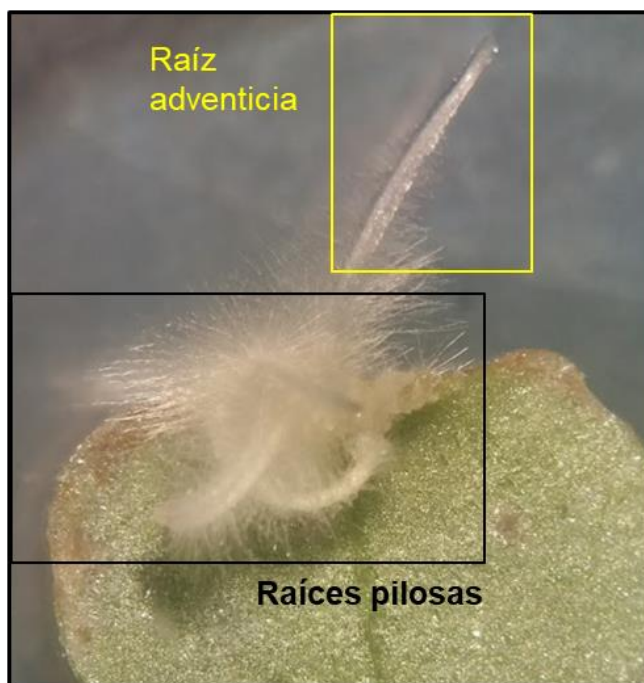
### ***Evaluación de Raíces Pilosas***

Para determinar el porcentaje de raíces pilosas que se obtuvo con cada una de las cepas de *R. rhizogenes*, 15834, A4 y LBA 9402, se realizó una evaluación visual de las características fenotípicas de geotropismo y profusión de pelos radiculares. Se analizó 20 explantes por cada una de las cepas. En esta evaluación se diferenció entre raíces pilosas y raíces adventicias. Las raíces adventicias no se consideraron en este análisis por no cumplir con el fenotipo característico de las raíces pilosas producto de la transformación con *R. rhizogenes* (Figura 18).



**Figura 18**

*Distinción entre raíces adventicias y pilosas*



*Nota.* Recuadro amarillo: raíz sin profusión de pelos radiculares. Recuadro negro: raíces con ausencia de geotropismo y abundantes pelos radiculares.

A los resultados obtenidos (Anexo 5), se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks (modificado) (Tabla 6), con el objetivo de determinar la cepa con la que se obtiene mayor porcentaje de raíces pilosas.

**Tabla 8**

*Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para porcentaje de raíces pilosas*

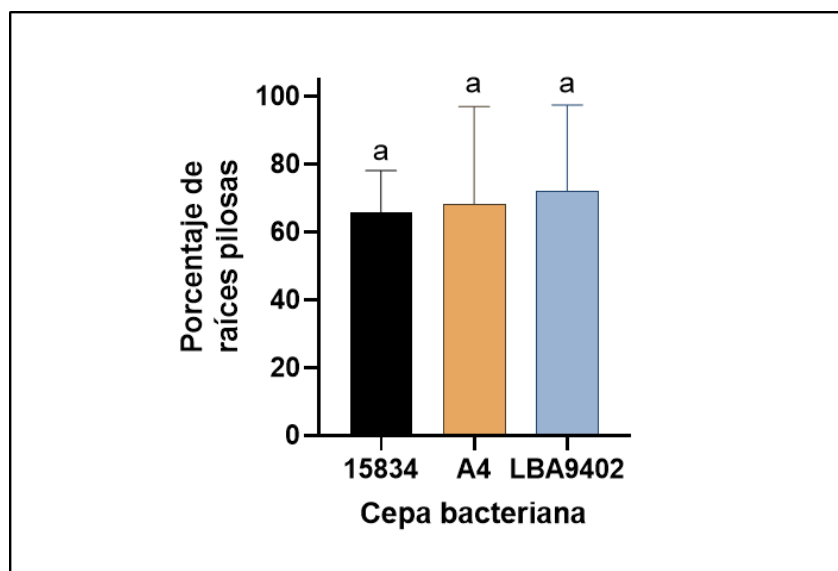
<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>W*</b>	<b>p</b>
Residuos Porcentajes	60	0	22.91	0.91	0.001

Con el p valor de 0.001, se determinó que los datos no siguen una distribución normal. Por lo tanto, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Anexo 6). Con este análisis se obtuvo un p valor de 0.7112 mayor a  $\alpha=0.05$ , lo cual determina que no existen diferencias significativas en las medias del porcentaje de raíces pilosas.

En la Figura 19, se observan las medias del porcentaje de raíces pilosas obtenidas para cada una de las cepas. La cepa con la que se obtuvo un mayor porcentaje de raíces pilosas fue la LBA 9402 con una media de 72 %, seguido por la A4 con 68 % y la 15834 con 65 %. Lo que sugiere que no existe diferencia en el porcentaje de raíces pilosas obtenidas con las diferentes cepas.

**Figura 19**

*Porcentaje de raíces pilosas*



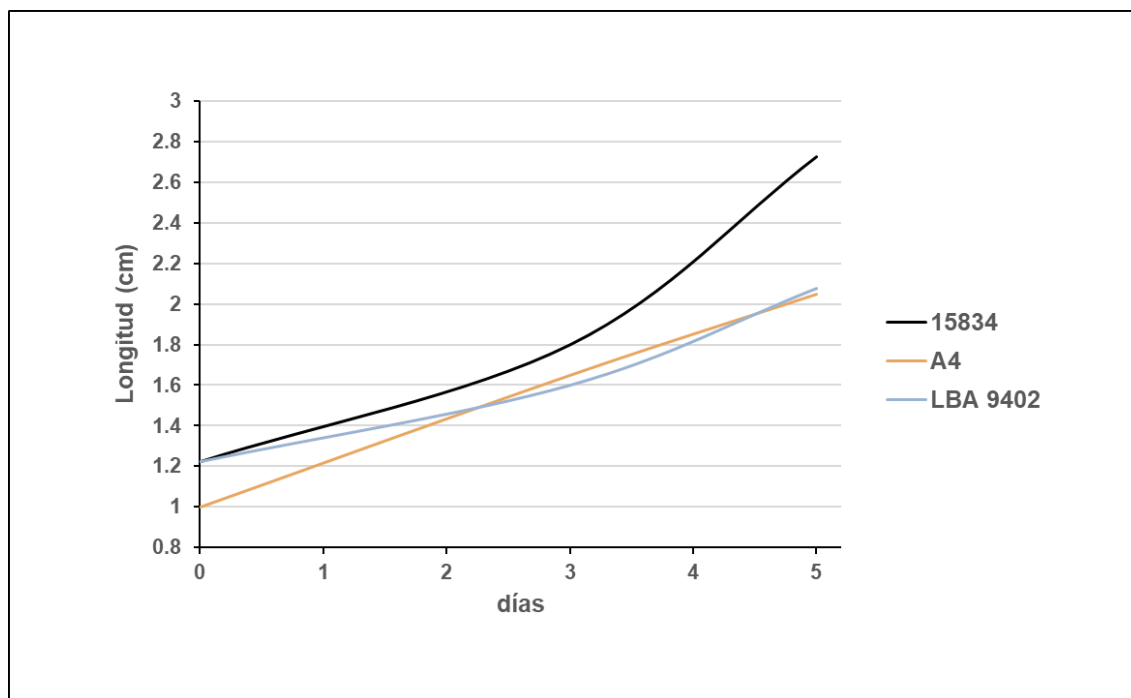
*Nota.* Porcentaje de raíces pilosas obtenidas para cada cepa. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Una vez determinadas fenotípicamente aquellas raíces que correspondían a raíces pilosas producto de la transformación con *R. rhizogenes*, se extrajeron cuatro

raíces de los explantes por cada cepa. Las raíces se colocaron individualmente en cajas Petri. Se evaluó el crecimiento de las raíces midiendo su longitud a los 3 y 5 días, los resultados se muestran en la Figura 20.

### Figura 20

*Crecimiento de los cultivos de raíces pilosas*



*Nota.* Crecimiento promedio en longitud de raíces por cepa bacteriana: 15834, A4 y LBA 9402.

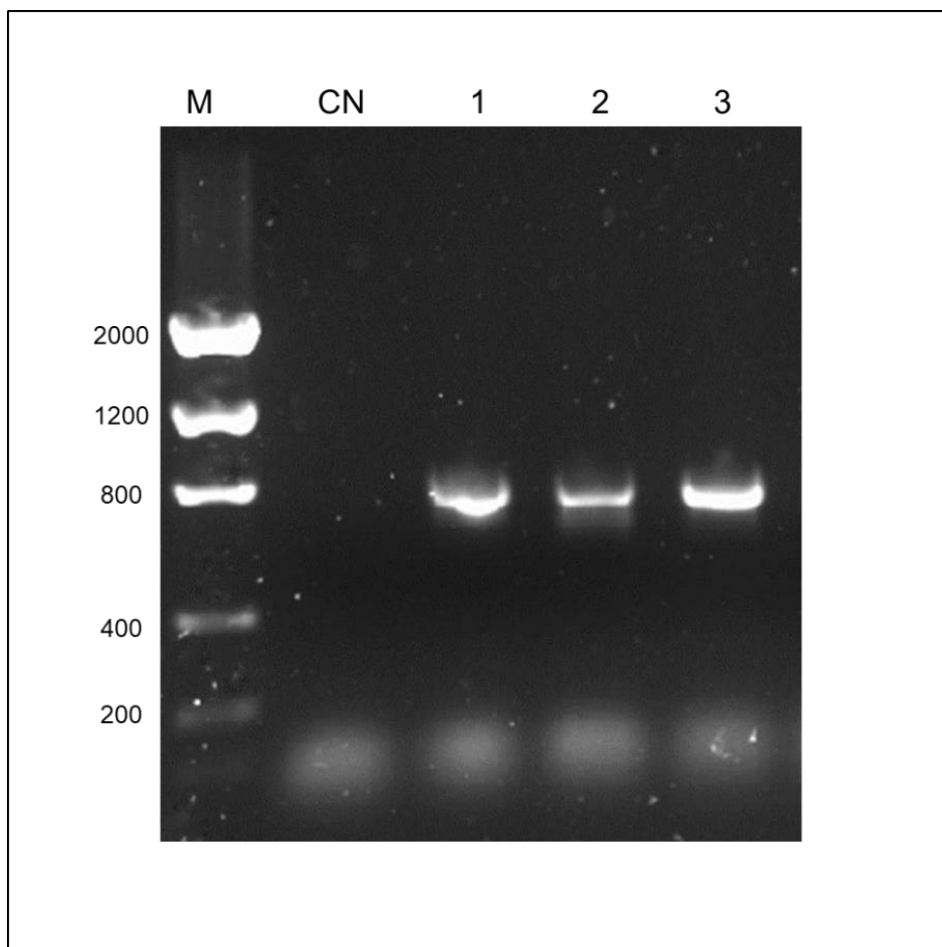
Las raíces obtenidas empleando la cepa 15834 presentan un mayor crecimiento, seguido de las cepas A4 y LBA9402. Debido a la característica de crecimiento desordenado y ramificado de las raíces frente a la inoculación con las bacterias, se evaluó la misma raíz inicial a los 3 y 5 días.

A continuación, se realizó una PCR para comprobar la transferencia del gen *rolB* de la bacteria al genoma de la planta. El resultado se visualizó en gel de agarosa al 1 %

con SYBR Safe. En la Figura 21 se observan bandas correspondientes a 780 pb, lo que muestra que el ADN genómico extraído de las raíces pilosas obtenidas utilizando las cepas A4 (1), 15834 (2) y LBA9402 (3), contienen el gen *rolB*.

### Figura 21

*Electroforesis de la PCR para el gen *rolB**



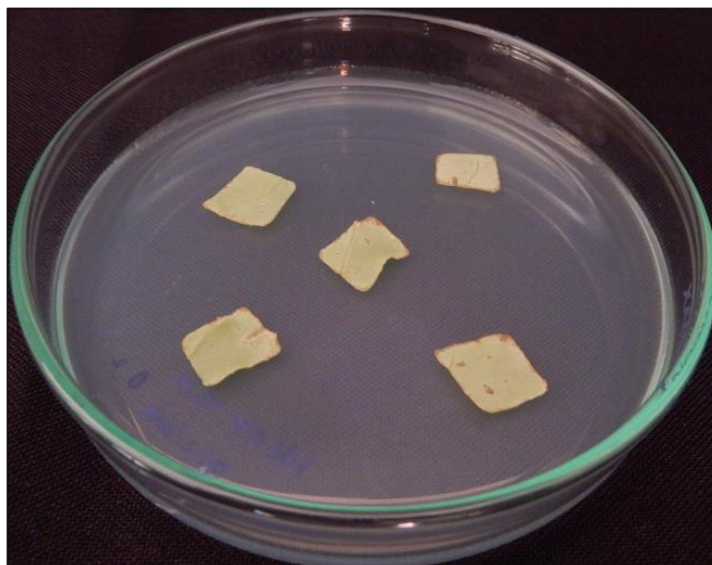
*Nota.* M: Marcador molecular Low DNA Mass Ladder, CN: Control negativo. PCR de muestras correspondientes a ADN genómico de raíces pilosas obtenidas empleando las cepas A4 (1), 15834 (2) y LBA 9402 (3).

### ***Explantos Inoculados con LBA 9402-GUS***

Con el objetivo de distinguir entre raíces pilosas y raíces adventicias mediante la expresión del gen reportero *GUS*, se utilizó como inóculo de los explantes de tabaco la bacteria LBA 9402 con el plásmido pSiM24-*GUS*. De los 20 explantes colocados en medio de selección de raíces con kanamicina (50 mg/L) no se observó generación de raíces ni apareamiento de tejido adicional a los explantes. A los 21 días se observó cierto grado de necrosamiento en los bordes de los explantes (Figura 22).

### **Figura 22**

*Explantos inoculados con la bacteria LBA 9402-GUS*



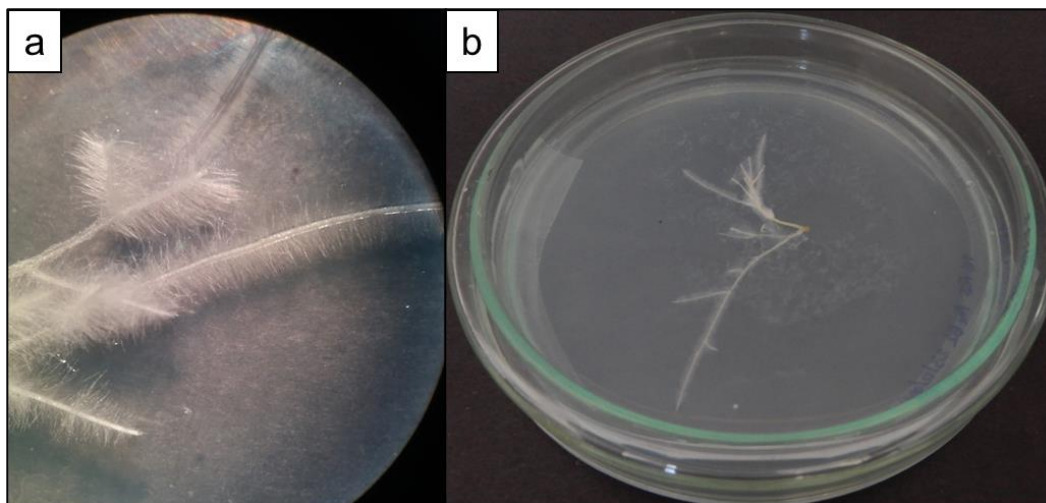
Estos resultados sugieren que la bacteria LBA 9402-GUS no fue capaz de transferir el plásmido pSiM24-GUS a la planta. Por lo tanto, el tejido vegetal no adquirió la resistencia a kanamicina, observándose necrosamiento en los explantes e inhibición de la formación de raíces pilosas.

Finalmente, en este trabajo se logró obtener cultivos *in vitro* de raíces pilosas mediante la transformación con *R. rhizogenes* que cumplen las características de: alta tasa de

crecimiento, abundante crecimiento de raíces ramificadas, profusión de pelos radicales y ausencia de geotropismo. En la Figura 23, se observa un ejemplo característico de un cultivo *in vitro* de raíces pilosas producto de esta transformación.

### Figura 23

*Cultivo in vitro de raíces pilosas*



*Nota.* a: raíces pilosas observadas bajo estereomicroscopio, se observan las características de profusión de pelos radicales, ausencia de geotropismo y ramificación. b: cultivo *in vitro* de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* L. en caja Petri.

## Capítulo 4: Discusión

### Desinfección de Hojas de Tabaco

El presente estudio tiene por objeto obtener cultivos *in vitro* de raíces pilosas, a partir de las cepas de *R. rhizogenes* 15834, A4 y LBA 9402, para futuras investigaciones sobre la expresión de proteínas recombinantes, biotransformación de compuestos y diversos estudios relacionados a la raíz.

El primer paso para este ensayo es la aplicación de un protocolo de desinfección. Se conoce que la desinfección de explantes es un paso esencial del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, ya que los resultados finales de las investigaciones dependen directamente de la eficacia de la esterilización (Hesami et al., 2019).

Al aplicar el protocolo de desinfección, a los explantes de hojas de tabaco, utilizando hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5 % durante 10 minutos, se observó una eficacia de desinfección del 95 % y una viabilidad de los explantes del 100 %. En el trabajo realizado por Cajas (2020) a la misma concentración de NaClO pero con un tiempo de 2 minutos se muestra una eficacia de 83 % y una viabilidad del 80 %, lo que sugiere que un mayor tiempo de inmersión incrementa la eficacia de la desinfección. Según Hesami y sus colaboradores en (2019), las variables de contaminación y viabilidad están directamente relacionadas con el tiempo de inmersión. En relación a la viabilidad obtenida del 100 % se puede considerar que el protocolo de desinfección aplicado es óptimo para este tipo de ensayos, lo que indica que un tiempo adecuado para confirmar contaminación es de al menos 15 de incubación como lo menciona Bosshard (2011).

### Cultivos de *R. rhizogenes*

Luego de la desinfección se establecieron cultivos de *R. rhizogenes* en medios líquidos y sólidos. Se obtuvo valores máximos de OD<sub>600</sub> de 0.46 a las 72 horas del cultivo primario de la cepa A4. El crecimiento bacteriano es un parámetro generalizado y

aceptado para la detección de la viabilidad bacteriana. El cual se ve reflejado en su capacidad para propagarse en un medio nutritivo líquido o en un medio de cultivo sólido, apareciendo como colonias visibles (S. Kumar & Ghosh, 2019). Por lo tanto, aunque los valores de OD<sub>600</sub> fueron menores a los de otros estudios realizados (Rana et al., 2016), los medios y las condiciones de cultivo permitieron establecer cultivos viables de *R. rhizogenes* 15834, A4, LBA 9402 y LBA 9402 *GUS*.

Los resultados obtenidos para los cultivos secundarios suplementados con 200 µM de acetosiringona, en los que el valor máximo obtenido para la cepa A4 0.43 es menor al obtenido en el cultivo sin acetosiringona, sugiere una ligera disminución del crecimiento de *R. rhizogenes* en este medio. Estos resultados son similares a los obtenidos por Rana y sus colaboradores en 2016.

Los cultivos líquidos de la bacteria no permitieron comparar el crecimiento entre las cepas de *R. rhizogenes*, ya que el tamaño del inóculo inicial no fue constante. Rana y sus colaboradores (2016), proponen ajustar los valores iniciales de OD<sub>600</sub> de 0.15 para empezar las medidas de OD<sub>600</sub> a diferentes tiempos de incubación. Lo que permitiría determinar la cepa de *R. rhizogenes* con mejor crecimiento bacteriano.

### **Transformación de *R. rhizogenes***

Luego de establecer cultivos de *R. rhizogenes* y con el objetivo de diferenciar entre raíces adventicias y raíces pilosas en los explantes, se realizó la inserción del plásmido pSiM24-GUS mediante electroporación. Esta técnica es una de las más eficientes para insertar ADN foráneo en *Agrobacterium*, aunque este proceso puede verse afectado por una baja pureza del ADN (Wise et al., 2006b). La concentración y pureza del ADN del plásmido es un factor importante en esta técnica.



El protocolo de Lisis alcalina permite obtener cantidades de DNA plasmídico entre 5 y 100  $\mu\text{g}$ , con una pureza suficiente para diversos ensayos *in vitro* (Green & Sambrook, 2016). En el presente estudio se obtuvo alrededor de 350  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico, lo cual posiblemente se explicaría por el alto número de copias que *E. coli* produce del plásmido pSiM24 (Sahoo et al., 2014). Los valores de pureza obtenidos fueron mayores a 1.8 para la relación  $A_{260}/A_{280}$  y de 2.2 para la relación  $A_{260}/A_{230}$ . Estos valores son considerados como muestras libres de contaminación (Thermo Fisher Scientific, 2011).

Al observar el ADN plasmídico extraído en un gel de agarosa al 0.8%, se pudo observar (Figura 9 del apartado “resultados”) bandas correspondientes a las conformaciones circular relajada y superenrollada del plásmido pSiM24. Se ha demostrado que el ADN plasmídico directamente purificado de *E. coli* presenta bandas con mayor intensidad que corresponden a la conformación superenrollada (Wong & Medrano, 2005) y bandas de menor intensidad para las formas circular cerrada o circular relajada (Lin et al., 2011).

La presencia del gen *GUS* se confirmó mediante PCR utilizando los primers diseñados por Garzón (2019), el cual se visualizó en gel de agarosa al 1 % mediante una banda muy cercana a los 2000 pb. Según Sahoo y colaboradores en (2014) describen el tamaño del plásmido pSiM24-GUS posee un tamaño de 8881 pb y contiene el gen *GUS* con un fragmento de aproximadamente 1900 pb (Sahoo et al., 2014).

Finalmente, al realizar la electroporación de *R. rhizogenes* 15834 y LBA 9402 con el plásmido pSiM-24 *GUS* se obtuvieron eficiencias de  $4.73 \times 10^1$  y  $2.35 \times 10^2$  UFC/ $\mu\text{g}$  DNA respectivamente. Estos valores representan una baja eficiencia de transformación comparadas con las eficiencias obtenidas por Nagel y sus colaboradores (1990), quienes obtuvieron eficiencias entre  $10^3$  y  $10^6$  UFC/ $\mu\text{g}$  para diferentes cepas de

*A. tumefaciens* y *R. rhizogenes*. La baja eficiencia de transformación puede ser debido al uso de vectores con un alto número de copias o que contengan fragmentos mayores a 15 Kb (Komari et al., 2006). Este es el caso del vector pSiM24-GUS, el cual posee un alto número de copias y presenta diferentes conformaciones de ADN plasmídico.

Para determinar las colonias de *R. rhizogenes* transformadas se utilizó una Colony PCR. Las cepas LBA 9402 *GUS* y 15834 *GUS* presentaron bandas correspondientes a la presencia del gen *GUS* en el plásmido pSiM24. En cambio, a través de la turbidez del cultivo en medio líquido de las puntas de PCR se determinó, que únicamente la cepa LBA 9402 *GUS* fue viable. Estos resultados sugieren la posible pérdida del plásmido o escasa replicación del mismo.

### **Obtención de Raíces Pilosas**

El primer paso, para la obtención de raíces pilosas fue realizar ensayos preliminares para determinar la capacidad de transformación de las diferentes cepas de *R. rhizogenes*.

Se analizó 3 viales por cada cepa y se seleccionó el vial con mayor porcentaje de generación de raíces. Sin embargo, se encontró que un vial correspondiente a la cepa 15834 no generó raíces en ninguno de los explantes inoculados. Esto evidencia una posible pérdida de la virulencia. Por tal razón, es importante evitar flujos de energía y asegurar no exponer a temperaturas de almacenamiento no adecuadas (Wise et al., 2006a).

Se realizó un nuevo ensayo con el objetivo de determinar la cepa de *R. rhizogenes* que genera mayor cantidad de explantes con raíces. Las cepas de *R. rhizogenes* LBA 9402, A4 y 15834 mostraron la presencia de raíces a los 15 días, lo que permitió determinar el porcentaje de explantes con raíces. La cepa que genera la mayor

cantidad de explantes con raíces fue la LBA 9402 en relación a la A4 y 15834, con un porcentaje del 96 %. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Qin y sus colaboradores (2022), donde la cepa LBA 9402 indujo raíces en los explantes de hojas de tabaco en un 80 %. Otros estudios donde se emplean las mismas cepas pero en explantes de *Fagopyrum tataricum* G. muestran una misma tendencia en la generación de raíces usando la cepa LBA 9402 (Thwe et al., 2016). Esto sugiere que la cepa LBA 9402 es posiblemente la más efectiva en la inducción de raíces.

En el establecimiento de cultivos *in vitro* de raíces pilosas es necesario distinguir entre raíces adventicias y raíces pilosas. Esto se puede realizar mediante una PCR que amplifique los genes *rol* y *vir* transferidos por la bacteria o empleando un gen heterólogo cuya expresión pueda ser detectada (Gutierrez-Valdes et al., 2020). Cuando se tiene por objetivo determinar la cepa que genera una mayor proporción de raíces pilosas, el método más adecuado es empleando un marcador visual de crecimiento acelerado, ausencia de geotropismo y abundante ramificación (Tepfer 1983). Por esta razón en este estudio se realizó una evaluación de estas características fenotípicas para determinar la cepa de *R. rhizogenes* que genera un mayor porcentaje de raíces pilosas. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas.

Se ensayó adicionalmente la inoculación de la bacteria LBA 9402 que contiene el plásmido pSiM24-GUS, con el objetivo de utilizar otro método para distinguir entre raíces pilosas y adventicias. Sin embargo, no se observó crecimiento de raíces en los explantes y hubo necrosamiento en los bordes de los mismos. Sahoo y colaboradores en 2014, sugieren emplear una concentración de 250 a 300 mg/L de kanamicina como marcador de selección para el plásmido pSiM24. El presente estudio utilizó una concentración mucho más baja de kanamicina (50 mg/L) que la sugerida, pero pese a eso no se observó ningún crecimiento. Este resultado se debe posiblemente a que la

bacteria no fue capaz de transferir el plásmido con el gen de resistencia a la kanamicina, lo que provocó el necrosamiento de los bordes.

Se evaluó el crecimiento en longitud de raíces individuales a los 5 días incubación. Para la cepa de *R. rhizogenes* 15834 se obtuvo un crecimiento de 2.7 cm, para la LBA 9402 de 2.075 cm y para la A4 de 2.05 cm. Estos resultados son similares a los obtenidos por Thwe y colaboradores (2016) en explantes de *Fagopyrum tataricum* G, quienes obtuvieron una longitud de 1.53 cm para la cepa 15834, de 2.33 cm para la LBA9402 y de 2.43 cm para cepa A4.

Finalmente, mediante una PCR de ADN genómico extraído de las raíces pilosas a partir de cada una de las cepas de *R. rhizogenes*, se comprobó la presencia del gen rolB. Este resultado confirma que este gen se encuentra en el T-DNA del plásmido Ri de *R. rhizogenes* y es transferido al genoma de la planta. Al emplear los primers Forward: ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA y Reverse: TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC, se obtiene un fragmento de 780 pb correspondiente al gen rolB, lo que confirma este resultado (Wang et al., 2001).

En resumen, en este trabajo se logró obtener cultivos *in vitro* de raíces pilosas mediante la transformación con *R. rhizogenes* que cumplen las características de: alta tasa de crecimiento, abundante crecimiento de raíces ramificadas, profusión de pelos radicales y ausencia de geotropismo.

## Capítulo 5: Conclusiones

- El procedimiento de desinfección utilizando NaClO al 0.5 % por 10 minutos aplicado para la desinfección de explantes de tabaco fue eficaz en un 95 % para obtener explantes libres de patógenos.
- Se establecieron cultivos viables de *R. rhizogenes* con capacidad de propagarse tanto en medios líquidos como sólidos de YMB y AMP.
- La metodología empleada con inmersión de los explantes por 20 minutos en el inóculo bacteriano, seguido por un cocultivo de 3 días y posterior cambio a medio de inducción de raíces; permitió obtener cultivos *in vitro* de raíces pilosas a partir de explantes de hojas de tabaco.
- Se determinó mediante el análisis estadístico que la cepa de *R. rhizogenes* LBA 9402 tiene una mayor capacidad de inducir la formación de raíces con un 96 % frente a las cepas A4 y 15834 que presentan un 76 % y 67 % respectivamente.
- Las tres cepas de *R. rhizogenes* 15834, A4 y LBA 9402 evaluadas presentaron similares porcentajes de raíces pilosas en explantes de hojas tabaco, no presentaron diferencias significativas.
- La transferencia del gen rolB de *R. rhizogenes* al genoma de la planta evidenció una metodología eficiente en el proceso de transformación.
- Se confirma la hipótesis de investigación, ya que la transformación con *Rhizobium rhizogenes* permite obtener cultivos *in vitro* de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* L.

## Capítulo 6: Recomendaciones

- Se recomienda optimizar las condiciones de temperatura y manejo de los cultivos de *R. rhizogenes* para obtener mayor crecimiento bacteriano en medio líquido.
- Se recomienda comparar el crecimiento de las diferentes cepas de *R. rhizogenes* para seleccionar la que permita disminuir los tiempos de trabajo.
- Se recomienda buscar y probar diferentes vectores binarios que previamente hayan sido utilizados junto con *R. rhizogenes* en la transformación de plantas.
- Se recomienda conservar y mantener las diferentes líneas de raíces pilosas obtenidas para su uso en futuras investigaciones.

## Capítulo 7: Referencias

- Anami, S., Njuguna, E., Coussens, G., Aesaert, S., & Van Lijsebettens, M. (2013). Higher plant transformation: principles and molecular tools. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(6-8), 483-494.  
<https://doi.org/10.1387/ijdb.130232mv>
- Bahramnejad, B., Naji, M., Bose, R., & Jha, S. (2019). A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. En *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Número 7, p. 107405). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.004>
- Batoro, J., & Ekowati, G. (2017). An Ethnobotanical Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Indonesia. A Review. *Advances in Life Sciences*, 26-29.  
<https://doi.org/doi:10.5923/j.als.20170702.03>
- Bosshard, P. P. (2011). Incubation of fungal cultures: how long is long enough? *Mycoses*, 54(5), e539-45. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01977.x>
- Cajas, I. (2020). *Estandarización del método de transfección de callo y suspensiones celulares de tabaco (Nicotiana tabacum) mediante Agrobacterium tumefaciens*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Carrera, E. (2019). *Breve perspectiva de la situación actual de la Biotecnología en Ecuador – Enfoque Científico*. <https://enfoquecientifico.com/2019/05/28/breve-perspectiva-de-la-situacion-actual-de-la-biotecnologia-en-el-ecuador/>
- Chahal, P., Durocher, Y., & Kamen, A. (2011). Cell transfection. En *Comprehensive Biotechnology* (pp. 395-401). ScienceDirect. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00042-8>

- Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters*, 34(3), 407-415.  
<https://doi.org/10.1007/s10529-011-0785-3>
- Christey, M. C. (2001). Use of *ri*-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(6), 687-700.  
<https://doi.org/10.1007/s11627-001-0120-0>
- Coussens, G., Aesaert, S., Verelst, W., Demeulenaere, M., De Buck, S., Njuguna, E., Inzé, D., & Van Lijsebettens, M. (2012). *Brachypodium distachyon* promoters as efficient building blocks for transgenic research in maize. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), 4263-4273. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers113>
- Cunningham, F. J., Goh, N. S., Demirer, G. S., Matos, J. L., & Landry, M. P. (2018). Nanoparticle-Mediated Delivery towards Advancing Plant Genetic Engineering. *Trends in Biotechnology*, 36(9), 882-897.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.03.009>
- Daspute, A. A., Yunxuan, X., Gu, M., Kobayashi, Y., Wagh, S., Panche, A., & Koyama, H. (2019). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy roots transformation as a tool for exploring aluminum-responsive genes function. *Future Science OA*, 5(3).  
<https://doi.org/10.4155/fsoa-2018-0065>
- de Lajudie, P. M., & Young, J. P. W. (2018). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of rhizobia and agrobacteria Minutes of the closed meeting, Granada, 4 September 2017. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(10), 3363-3368.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002974>
- De Paolis, A., Mauro, M. L., Pompom, M., Cardarelli, M., Spanò, L., & Costantino, P.



- (1985). Localization of agropine-synthesizing functions in the TR region of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plasmid*, 13(1), 1-7.  
[https://doi.org/10.1016/0147-619X\(85\)90050-2](https://doi.org/10.1016/0147-619X(85)90050-2)
- Dubrovsky, J. G., & Shishkova, S. (2007). Enigmas de la raíz: la parte oculta de la planta. En *Biotecnología* (Vol. 14).  
[http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_18.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_18.pdf)
- Ekos. (2017, abril 4). *Industria Química: encadenamientos productivos | Ekosnegocios*.  
<https://www.ekosnegocios.com/articulo/industria-quimica-encadenamientos-productivos>
- Ganapathi, T., Penna, S., Rao, P. S., & Bapat, V. (2004). Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) - A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 171-184.
- Gantait, S., & Mukherjee, E. (2021). Hairy root culture technology: applications, constraints and prospect. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(1), 35-53.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-11017-9>
- Garzón, D. (2019). *Expresión de tripsina heteróloga en suspensiones de tabaco (Nicotiana tabacum) mediante transfección por el Sistema Nanostraw* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/21215>
- Gelvin, S. B. (2000). AGROBACTERIUM AND PLANT GENES INVOLVED IN T-DNA TRANSFER AND INTEGRATION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51(1), 223-256. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.223>
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the «gene-jockeying» tool*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*,

67(1), 16-37. <https://doi.org/10.1128/membr.67.1.16-37.2003>

Gelvin, S. B. (2017). Integration of Agrobacterium T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetics*, 51(1), 195-217. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035320>

Georgiev, M. I., Agostini, E., Ludwig-Müller, J., & Xu, J. (2012). Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 528-537. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.001>

González-Manzano, S., & Dueñas, M. (2021). Applications of Natural Products in Food. En *Foods* (Vol. 10, Número 2). <https://doi.org/10.3390/foods10020300>

González, J. M., & Gurdíán, W. (1998). Cultivo de Tabaco *Nicotiana tabacum* L. En *Escuela Agrícola Panamericana Departamento de Protección Vegetal* (Vol. 285, Número 40). Escuela Agrícola Panamericana. [https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2495/1/cultivo de tabaco.pdf](https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2495/1/cultivo%20de%20tabaco.pdf)

Grand View Research. (2019). *Bio-based Platform Chemicals Market*. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/bio-based-platform-chemicals-market>

Green, M. R., & Sambrook, J. (2016). Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Minipreps. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(10), pdb.prot093344. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093344>

Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P. K., Rideau, M., & Gantet, P. (2006). Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends in Biotechnology*, 24(9), 403-409. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.07.002>

- Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, S. T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K.-M., Ritala, A., & Cardon, F. (2020). Hairy Root Cultures—A Versatile Tool With Multiple Applications. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11, p. 33).  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.00033>
- Häkkinen, S. T., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2018). Progress and Prospects of Hairy Root Research. En V. Srivastava, S. Mehrotra, & S. Mishra (Eds.), *Hairy Roots: An Effective Tool of Plant Biotechnology* (pp. 3-19). Springer Singapore.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-13-2562-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2562-5_1)
- Handler, A. M. (2008). Genetic Transformation. En J. L. Capinera (Ed.), *Encyclopedia of Entomology* (pp. 1597-1599). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6\\_1062](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_1062)
- Hesami, M., Naderi, R., & Tohidfar, M. (2019). Modeling and Optimizing in vitro Sterilization of Chrysanthemum via Multilayer Perceptron-Non-dominated Sorting Genetic Algorithm-II (MLP-NSGAI). *Frontiers in Plant Science*, 10, 282.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00282>
- Jang, S., Lim, H. G., Yang, J., Seo, S. W., & Jung, G. Y. (2018). Synthetic regulatory tools to engineer microbial cell factories for chemical production. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Synthetic Biology, Cell Engineering and Bioprocessing Technologies* (pp. 115-141). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64085-7.00005-8>
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5(4), 387-405.  
<https://doi.org/10.1007/BF02667740>
- Komari, T., Takakura, Y., Ueki, J., Kato, N., Ishida, Y., & Hiei, Y. (2006). Binary Vectors

- and Super-binary Vectors. En K. Wang (Ed.), *Agrobacterium Protocols* (pp. 15-42). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:15>
- Kumar, M., & Mitra, A. (2017). Hairy root culture of *Nicotiana tabacum* (Tobacco) as a platform for gene manipulation of secondary metabolism. En S. Malik (Ed.), *Production of Plant Derived Natural Compounds through Hairy Root Culture* (pp. 145-163). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-69769-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-69769-7_8)
- Kumar, S., & Ghosh, A. R. (2019). Assessment of bacterial viability: A comprehensive review on recent advances and challenges. *Microbiology (United Kingdom)*, 165(6), 593-610. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000786>
- Lacroix, B., & Citovsky, V. (2013). *Agrobacterium*. En *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (pp. 52-54). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00025-5>
- Lacroix, B., Tzfira, T., Vainstein, A., & Citovsky, V. (2006). A case of promiscuity: *Agrobacterium's* endless hunt for new partners. *Trends in Genetics : TIG*, 22(1), 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.10.004>
- Lin, C.-H., Chen, Y.-C., & Pan, T.-M. (2011). Quantification Bias Caused by Plasmid DNA Conformation in Quantitative Real-Time PCR Assay. *PLOS ONE*, 6(12), e29101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029101>
- Matt, P., Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Krapp, A., & Stitt, M. (2001). The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light peri. *Plant, Cell & Environment*, 24(2), 177-190.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2001.00676.x>

Matthysse, A. G. (2006). *The Genus Agrobacterium BT - The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses* (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.); pp. 91-114). Springer New York.  
[https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1\\_5](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_5)

Ministerio del Ambiente. (2016). *Ecuador presenta la Estrategia Nacional de Biodiversidad – Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica*.  
<https://www.ambiente.gob.ec/ecuador-presenta-la-estrategia-nacional-de-biodiversidad/>

Motolinía-Alcántara, E. A., Castillo-Araiza, C. O., Rodríguez-Monroy, M., Román-Guerrero, A., & Cruz-Sosa, F. (2021). Engineering Considerations to Produce Bioactive Compounds from Plant Cell Suspension Culture in Bioreactors. En *Plants* (Vol. 10, Número 12). <https://doi.org/10.3390/plants10122762>

Muranaka, T., & Saito, K. (2010). 3.17 - *Production of Pharmaceuticals by Plant Tissue Cultures* (H.-W. (Ben) Liu & L. B. T.-C. N. P. I. I. Mander (Eds.); pp. 615-628). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00065-4>

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nagel, R., Elliott, A., Masel, A., Birch, R. G., & Manners, J. M. (1990). Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, 67(3), 325-328.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04041.x>

- Nyaboga, E., Tripathi, J. N., Manoharan, R., & Tripathi, L. (2014). Agrobacterium-mediated genetic transformation of yam (*Dioscorea rotundata*): an important tool for functional study of genes and crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 5, 463. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00463>
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., & Artam Tarhan, E. (2013). *Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation and Its Biotechnological Applications in Crops BT - Crop Improvement: New Approaches and Modern Techniques* (K. R. Hakeem, P. Ahmad, & M. Ozturk (Eds.); pp. 1-48). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7028-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7028-1_1)
- Qin, S., Liu, Y., Yan, J., Lin, S., Zhang, W., & Wang, B. (2022). An Optimized Tobacco Hairy Root Induction System for Functional Analysis of Nicotine Biosynthesis-Related Genes. *En Agronomy* (Vol. 12, Número 2). <https://doi.org/10.3390/agronomy12020348>
- Rage, E., Baschieri, S., Marusic, C., & Donini, M. (2020). *Establishment of Hairy Root Cultures for the Production of Biopharmaceuticals and Optimization of Methods for Recombinant Protein Secretion in the Culture Medium* (pp. 153-173). Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4055-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4055-4_11)
- Rana, M. M., Han, Z.-X., Song, D.-P., Liu, G.-F., Li, D.-X., Wan, X.-C., Karthikeyan, A., & Wei, S. (2016). Effect of Medium Supplements on *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Hairy Root Induction from the Callus Tissues of *Camellia sinensis* var. *sinensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1132. <https://doi.org/10.3390/ijms17071132>
- Rosales-Campos, A. L., & Gutiérrez-Ortega, A. (2019). *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi Leaf Explants. *Bio-protocol*, 9(2),

e3150. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3150>

Sahoo, D. K., Dey, N., & Maiti, I. B. (2014). pSiM24 is a novel versatile gene expression vector for transient assays as well as stable expression of foreign genes in plants.

*PloS One*, 9(6), e98988-e98988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098988>

Sánchez, A. M., Vayas, T., Mayorga, F., & Freire, C. (2021). Importaciones

Ecuatorianas. *Observatorio Económico y Social de Tungurahua. Universidad Técnica de Ambato*, 1-4.

[https://fca.uta.edu.ec/v4.0/images/OBSERVATORIO/dipticos/Diptico\\_N57.pdf](https://fca.uta.edu.ec/v4.0/images/OBSERVATORIO/dipticos/Diptico_N57.pdf)

Shi, M., Liao, P., Nile, S. H., Georgiev, M. I., & Kai, G. (2021). Biotechnological

Exploration of Transformed Root Culture for Value-Added Products. *Trends in Biotechnology*, 39(2), 137-149. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2020.06.012>

Srivastava, V., Mehrotra, S., & Mishra, S. (2018). Hairy roots: An effective tool of plant biotechnology. En *Hairy Roots: An Effective Tool of Plant Biotechnology*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2562-5>

Srivastava, V., Mehrotra, S., & Mishra, S. (Eds.). (2020). *Hairy Root Cultures Based Applications* (1.<sup>a</sup> ed.). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4055-4>

Tepfer, D. (1983). The Potential uses of *Agrobacterium Rhizogenes* in the Genetic Engineering of Higher Plants: Nature Got There First. En P. F. Lurquin & A. Kleinhofs (Eds.), *Genetic Engineering in Eukaryotes* (pp. 153-164). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4493-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4493-3_17)

Thermo Fisher Scientific. (2011). NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity.

*Protocols and Product Manuals*, 43(4), 1-2. [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)

- Thwe, A., Valan Arasu, M., Li, X., Park, C. H., Kim, S. J., Al-Dhabi, N. A., & Park, S. U. (2016). Effect of Different *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Root Induction and Phenylpropanoid Biosynthesis in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00318>
- Wang, Y. M., Wang, J. B., Luo, D., & Jia, J. F. (2001). Regeneration of plants from callus cultures of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on *Alhagi pseudoalhagi*. *Cell Research*, 11(4), 279-284. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290097>
- Wise, A. A., Liu, Z., & Binns, A. N. (2006a). Culture and maintenance of *Agrobacterium* strains. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 343, 3-13. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:3>
- Wise, A. A., Liu, Z., & Binns, A. N. (2006b). Three Methods for the Introduction of Foreign DNA into *Agrobacterium*. En K. Wang (Ed.), *Agrobacterium Protocols* (pp. 43-54). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:43>
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75-85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>
- Zeng, A. P. (2019). New bioproduction systems for chemicals and fuels: Needs and new development. En *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Número 4, pp. 508-518). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.01.003>



## Capítulo 8: Anexos