



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE



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

Desarrollo de un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens*
para la edición del promotor del gen RGA2 de banano

Estudiante: Dustin Adrián Pachala Ortiz

Tutor: Ing. Francisco Flores Flores Ph. D

Sangolquí, 8 de marzo de 2024

INTRODUCCIÓN

Formulación del problema

El banano (*Musa* sp.) es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial, pero enfrenta desafíos fitopatológicos, como el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 FOC R4T, causante de fusariosis.

Justificación

Este proyecto se enfoca en desarrollar un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para editar el promotor del gen RGA2 del banano, relacionado con la resistencia al hongo FOC R4T. (Martínez et al., 2020; Dale et al., 2017).



Fig 1. Importancia del banano. Tomado de: Primicias – Iniap 2022

OBJETIVOS

General

- Desarrollar un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RGA2 de banano.

Específicos

- Transformar *Agrobacterium tumefaciens* con un plásmido que contiene el sistema CRISPR-Cas9 para la edición del promotor del gen RGA2, asociado con la resistencia a la fusariosis en banano.
- Confirmar la presencia de la región promotora del gen RGA2, en el germoplasma de diferentes variedades de banano.
- Estandarizar un protocolo óptimo para la conservación de *Agrobacterium* transformada.

HIPÓTESIS

Existen diferencias significativas en la eficiencia de transformación de *Agrobacterium tumefaciens* en los dos métodos aplicados.

MARCO TEÓRICO

Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 (FOC R4T)

FOC R4T se propaga rápidamente, destruyendo extensas plantaciones de banano. La principal amenaza radica en la necrosis del huésped, manifestada por la decoloración vascular, amarillamiento y posterior necrosis en raíces y pseudotallo (Florencio et al., 2023; Martínez et al., 2020).



Fig 2. Síntomas de FOC R4t. Tomado de: América economía.

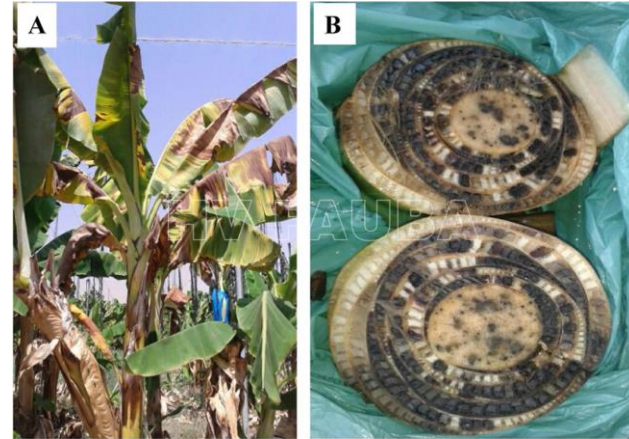


Fig 3. Síntomas de FOC R4t. Tomado de: Herbario Virtual Fitopatología.

MARCO TEÓRICO

Susceptibilidad al banano

La capacidad de FOC R4T para producir clamidosporas, estructuras resistentes, dificulta su identificación en los cultivos de banano.

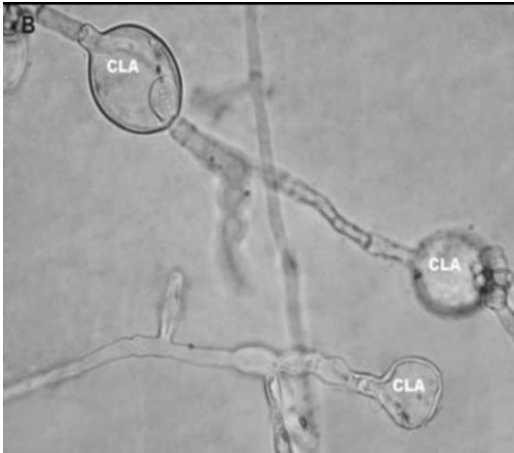


Fig 4. Clamidosporas de FOC R4t. Tomado de: Parada et al. (2023)

Gen RGA2

Peraza et al. (2008) identificaron los genes:

- RGC,
- RGC2
- RGC3
- RGC4
- RGC5

Entre ellos, RGC2 mostró un polimorfismo transcripcional altamente correlacionado con la resistencia.

MARCO TEÓRICO

Métodos de transformación

Choque térmico

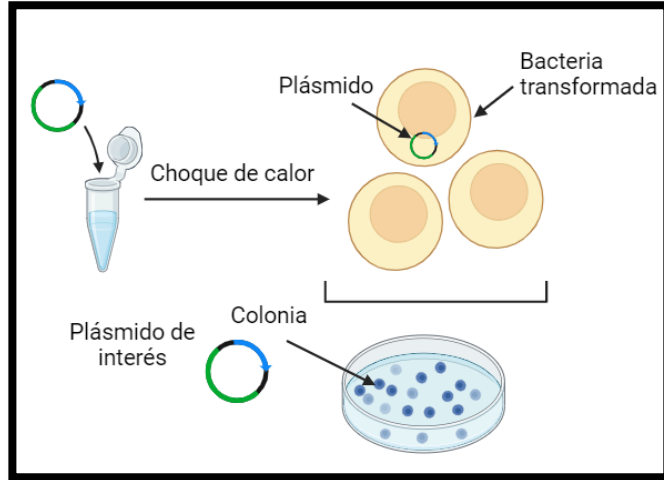


Fig 5. Choque térmico. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

Electroporación

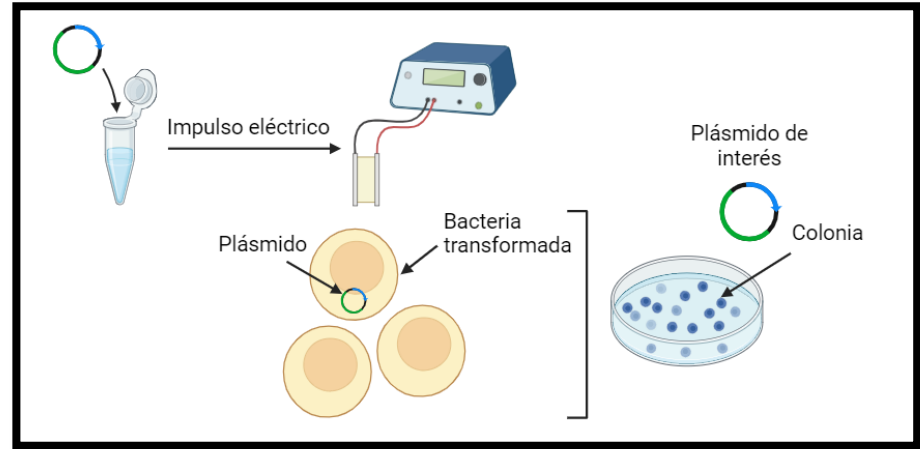


Fig 6. Electroporación. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

MARCO TEÓRICO

Agentes crioprotectores

Glicerol

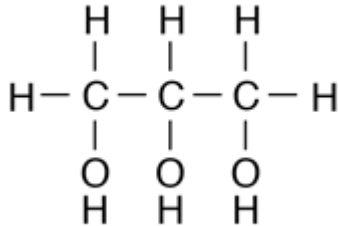


Fig 7. Estructura glicerol. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

Altera el patrón de cristalización en la formación de hielo extracelular.

Dimetilsulfóxido (DMSO)

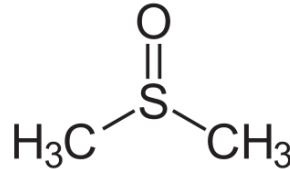


Fig 8. Estructura DMSO. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

Reviste las células de los cultivos bacterianos.

Polietilenglicol

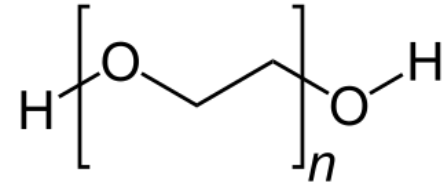


Fig 9. Estructura polietilenglicol. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

Agente no penetrante que recubre las células.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN Plasmídico

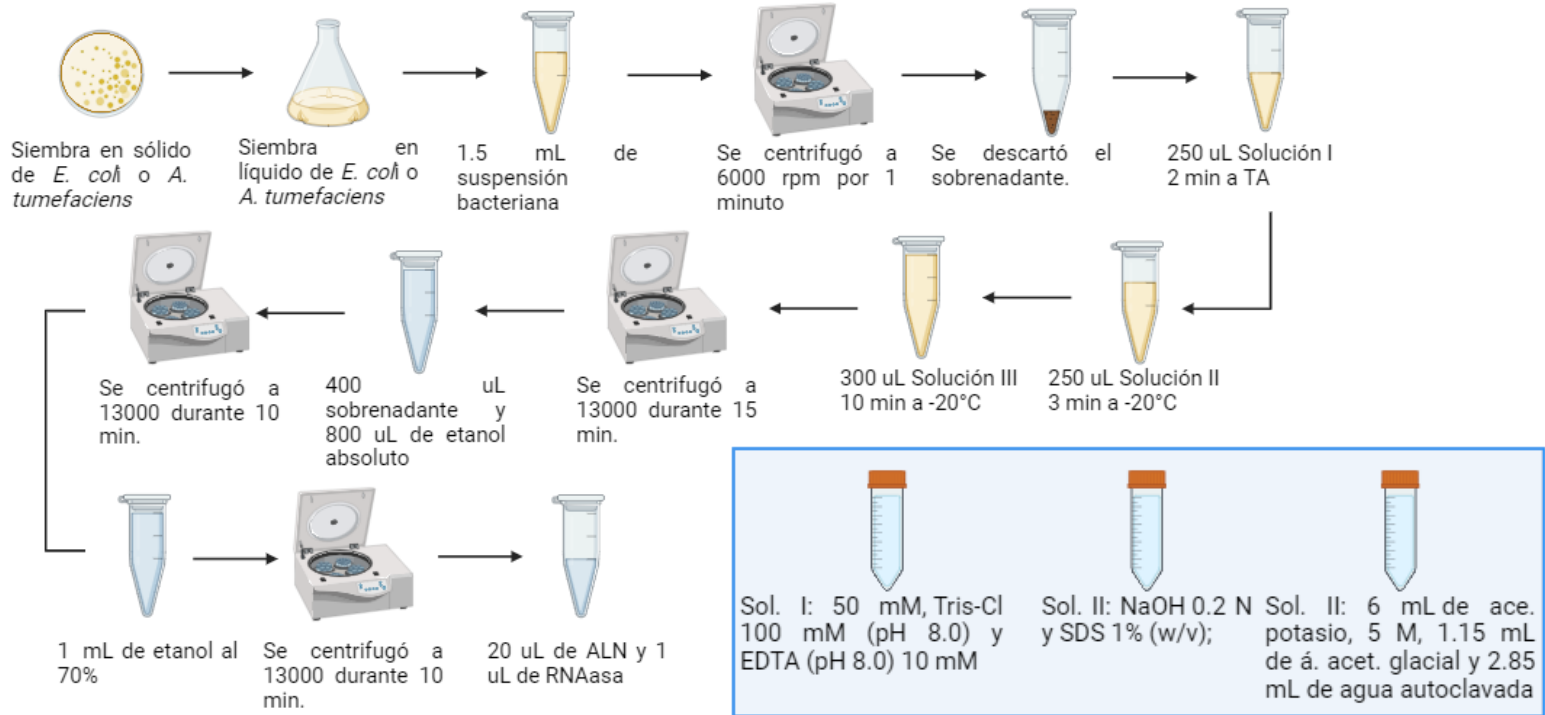


Fig 10. Protocolo de extracción de plásmido. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN de banano

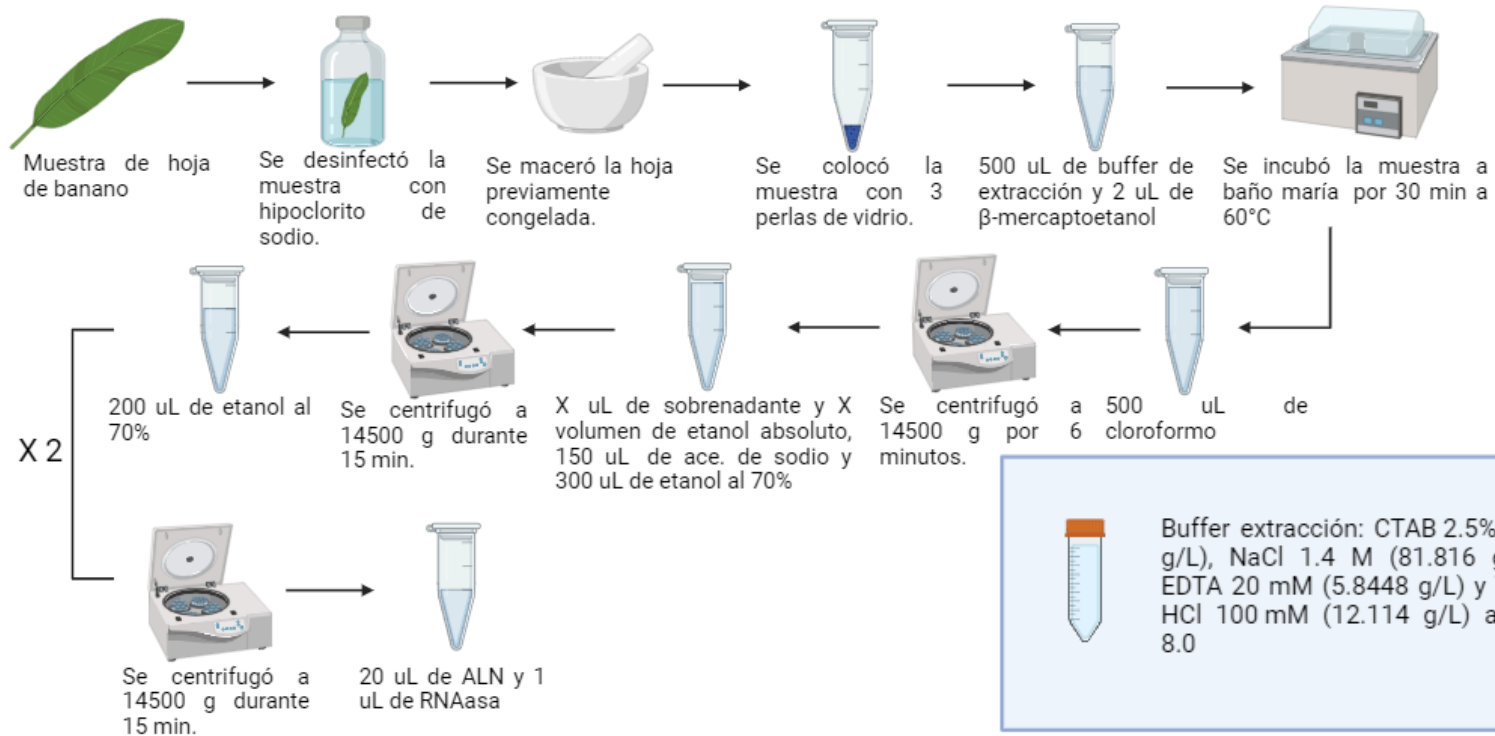


Fig 11. Protocolo de extracción de ADN de banano. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de primers

Primer	Secuencia	%GC	TM
Bac Reverse	5'- CCTTCATGCGTTCCCCTTGC- 3'	60	64.8°C
Cas 9 Forward	5'-ATACGTCCACCAAGGAGGTT- 3'	50	61°C
ARN guía Forward	5'-ATTCCCGGCTGGTGCAACAA- 3'	55	65

Primer	Secuencia	%GC	TM
Forward	5' - AGAGAGATTTTCATATGTTGTCACA - 3'	33	54.9 °C
Reverse	5'- TCTCTGATGGCAAATAGTGGGA - 3'	45	60.5 °C



Benchling

Fig 12. Plataforma Benchling. Tomado de Benchling.

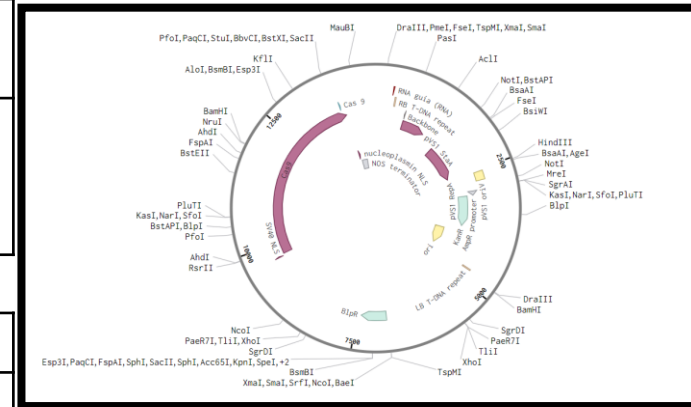


Fig 13. Primers en Benchling. Tomado de Benchling.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parámetros PCR y confirmación

Reactivos	Cantidad (uL)
2X BlastTaq™ PCR Master Mix	12.5 uL
Agua libre de nucleasas	9.5 uL
Primer Forward	1 uL
Primer Reverse	1 uL
DNA	1 uL

Proceso	Tiempo	Temperatura °C
Densaturalización	3 min	95
35 ciclos	15 sec	95
	15 sec	58.9
	23 sec	72
Extensión final	1 uL	72

Proceso	Tiempo	Temperatura °C
Desnaturalización	3 min	95
35 ciclos	15 sec	95
	15 sec	53.7
	8 sec	72
Extensión final	1 uL	72

MATERIALES Y MÉTODOS

Métodos de transformación Choque térmico

Células quimiocompetentes

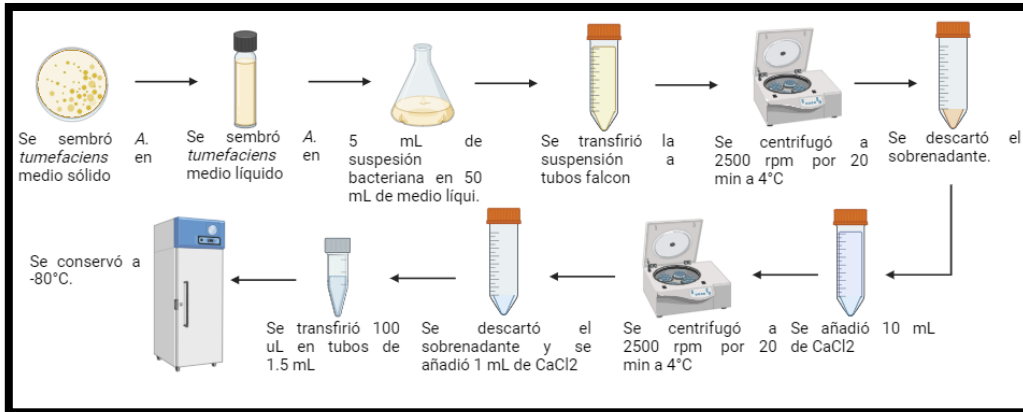


Fig 14. Preparación de células quimiocompetentes. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

Protocolo

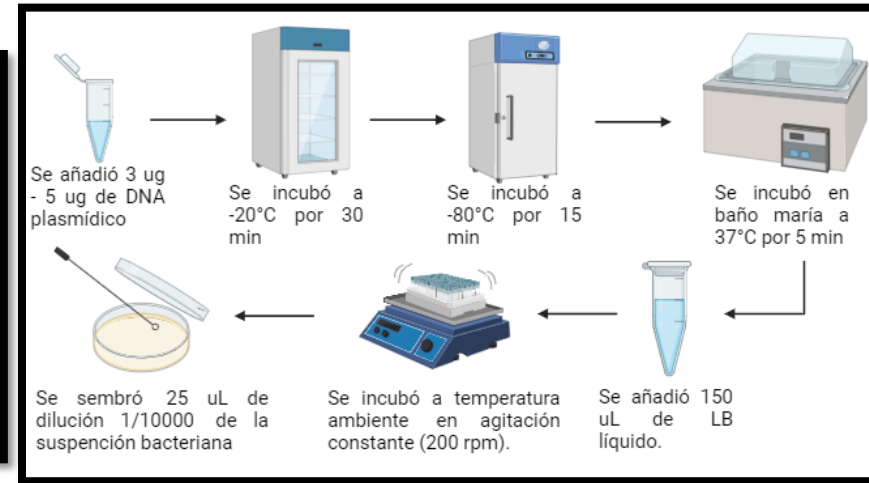
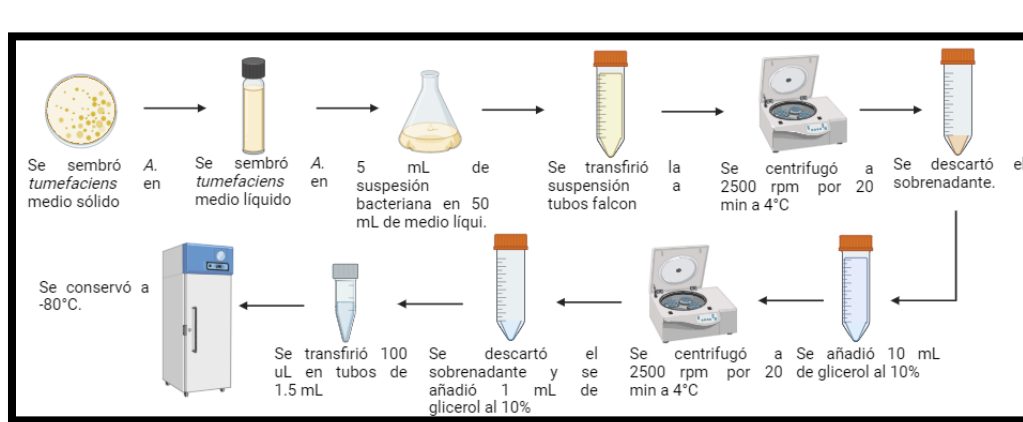


Fig 15. Protocolo choque térmico. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

MATERIALES Y MÉTODOS

Métodos de transformación Electroporación

Células electrocompetentes



Protocolo

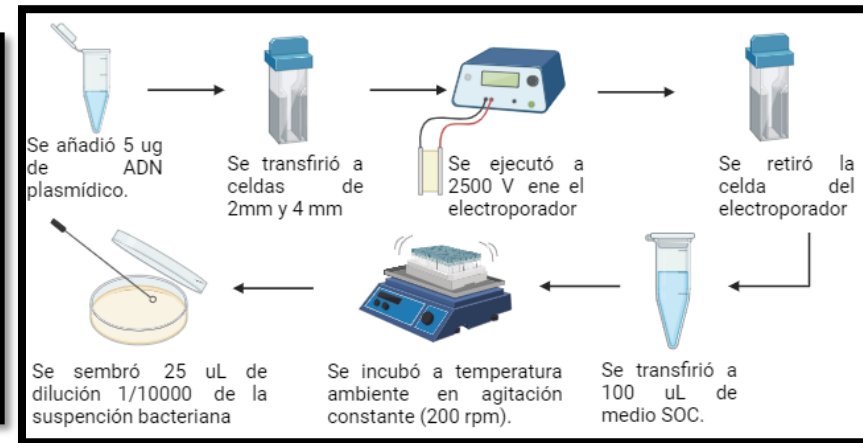


Fig 16. Preparación de células electrocompetentes. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

Fig 17. Protocolo electroporación. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

MATERIALES Y MÉTODOS

Métodos de Crioconservación

10 %

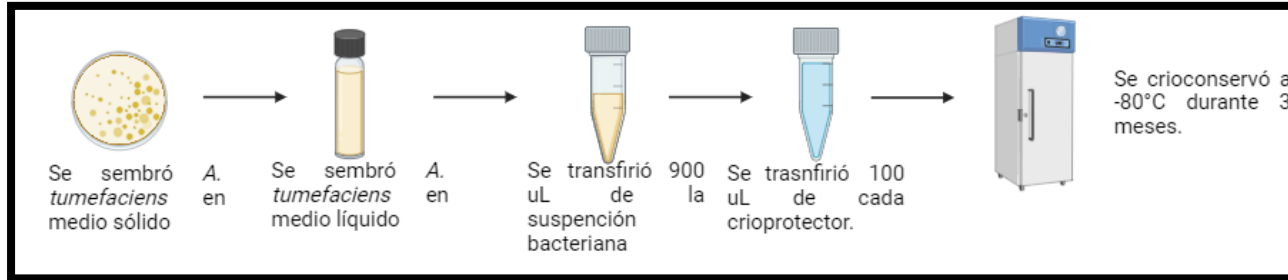


Fig 18. Protocolo crioconservación al 10%. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

20 %

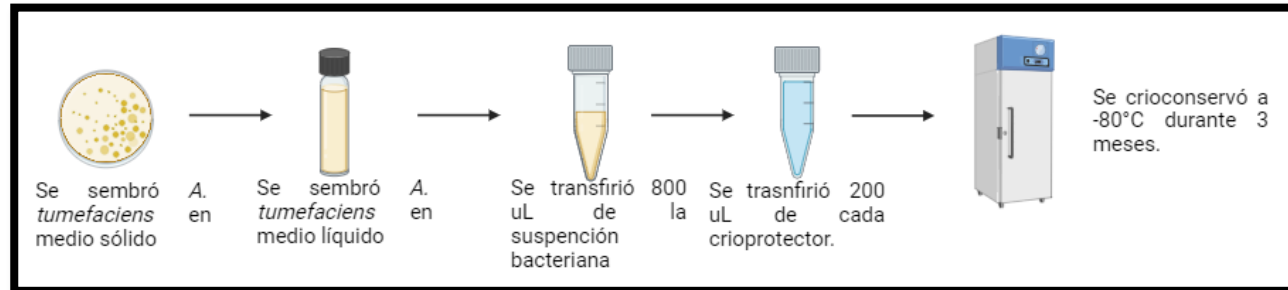


Fig 19. Protocolo crioconservación al 20%. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

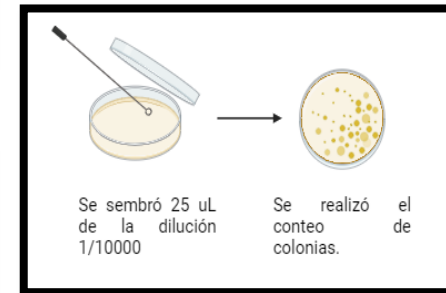


Fig 20. Siembra de cepas luego de 3 meses. Elaborado por: Pachala Dustin (2024)

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental – Eficiencia de transformación

Nº	Tratamiento
TC1	Choque térmico con 3 ug de ADN plasmídico
TC2	Choque térmico con 5 ug de ADN plasmídico
TE1	Electroporación con celda de 2 mm
TE2	Electroporación con celda de 4 mm

Hipótesis Nula: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

No existe diferencia significativa en la media de la eficiencia de transformación.

Hipótesis Alternativa: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$

Existe diferencia significativa en la media de la eficiencia de transformación.

$$Y_{ij} = \mu + c_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = Eficiencia de transformación

μ = Media de la eficiencia de transformación (CFU/ug)

c_i = efecto del i-ésimo tratamiento para la transformación de *A. tumefaciens*

ε_{ij} = Error experimental asociado a la j-enésima unidad experimental.



Fig 21. Plataforma Infostat.
Tomado de infostat.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental – Viabilidad de crioconservación

Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento
T1	T2	T3
Glicerol	DMSO	Polietilenglicol
10 %		
Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento
T4	T5	T6
Glicerol	DMSO	Polietilenglicol
20 %		

Hipótesis Nula: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

No existe diferencia significativa en la media de la viabilidad de crioconservación.

Hipótesis Alternativa: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$

Existe diferencia significativa en la media de la viabilidad de crioconservación.

$$Y_{ij} = \mu + c_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = Viabilidad de crioconservación.

μ = Media de la eficiencia de crioconservación. CFU

c_i = efecto del i-ésimo tratamiento para la crioconservaciónn de *A. tumefaciens*

ε_{ij} = Error experimental asociado a la j-enésima unidad experimental.



Fig 22. Plataforma Infostat.
Tomado de infostat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

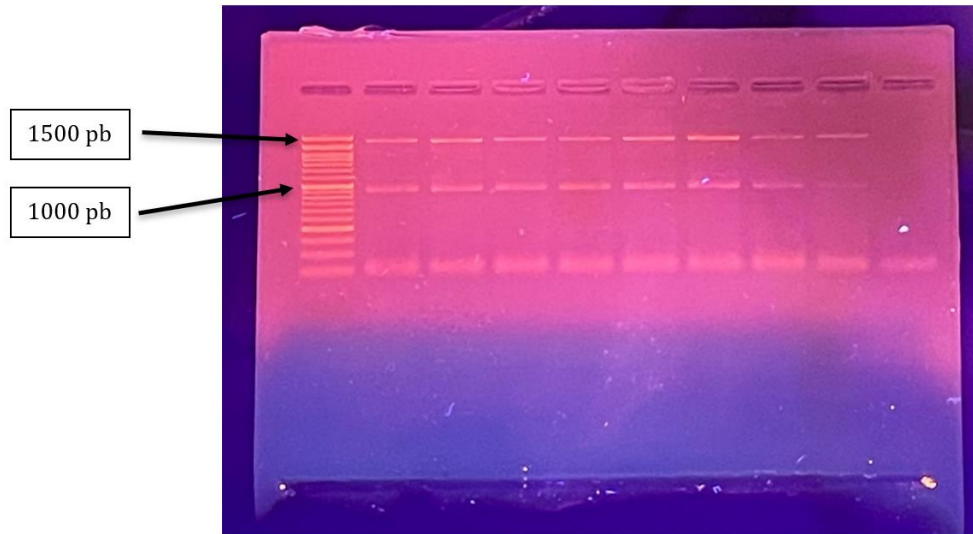
Extracción de ADN plasmídico

Muestra	Concentración (ug/mL)	Pureza (A260/280)	Pureza (A260/230)	Muestra	Concentración (ug/mL)	Pureza (A260/280)	Pureza (A260/230)
Top 10 - T1	2378	2,132	1,965	Top 10 - Tt1	2859,3	1,964	2,137
Top 10 - T2	2423	2,033	2,279	Top 10 - Tt2	3056	1,839	2,245
DH5 α - D1	115,7	1,096	1,896	Top 10 - Tt3	2256,2	2,219	2,034
DH5 α - D2	143,6	1,304	1,637	Top 10 - Tt4	2365,3	2,042	1,968
JM109 - J1	1957	2,032	2,364	Top 10 - Tt5	2459	1,997	1,893
JM109 - J2	1471	2,196	2,362	Top 10 - Ts1	3158,1	2,139	2,101
				Top 10 - Ts2	2365	1,975	2,195
				Top 10 - Te1	3087,2	2,164	1,963

En el caso de la cepa JM109, se observa que el plásmido experimenta degradación durante la aplicación de métodos de transformación, lo que impide su expresión al amplificar ADN. En contraste, la cepa Top 10 no muestra degradación del plásmido en el ADN durante estos procedimientos (Yang, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comprobación de la presencia de la región promotora que contiene el gen RGA2



Según Yang (2012), la expresión de plásmidos en cepas de *E. coli* puede verse afectada según la cepa y el tamaño del plásmido transformado. Según la investigación de Yang et al. (2016), RGA2 amplifica 1523 pb.

Fig 23. Electroforesis de ADN plasmídico.
Tomado por: Pachala Dustin (2023)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ADN de banano

Muestra	Concentración (ug/mL)	Pureza (A260/280)	Pureza (A260/230)
BD1	758,4	2,013	1,665
BD2	563,6	2,236	1,596
BM1	1554,8	1,863	1,657
BL1	1468	1,849	1,733

Según la investigación de Yang et al. (2016), la región promotora que contiene el gen de resistencia de banano RGA2 para FOC R4T debe amplificar 426 pb aproximadamente.

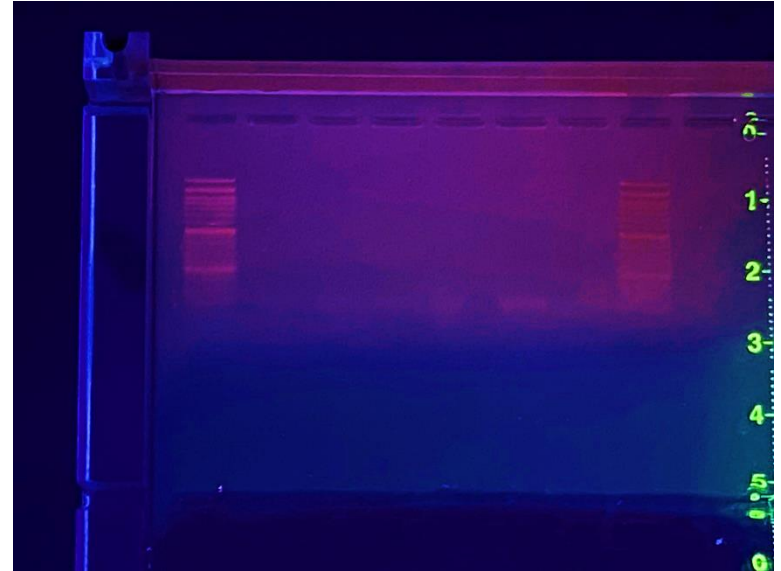


Fig 24. Electroforesis de confirmación de la región de interés en ADN de banano. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ADN de banano

Muestra	Concentración (ug/mL)	Pureza (A260/280)	Pureza (A260/230)
BD1	758,4	2,013	1,665
BD2	563,6	2,236	1,596
BM1	1554,8	1,863	1,657
BL1	1468	1,849	1,733

Según la investigación de Yang et al. (2016), la región promotora que contiene el gen de resistencia de banano RGA2 para FOC R4T debe amplificar 426 pb aproximadamente.

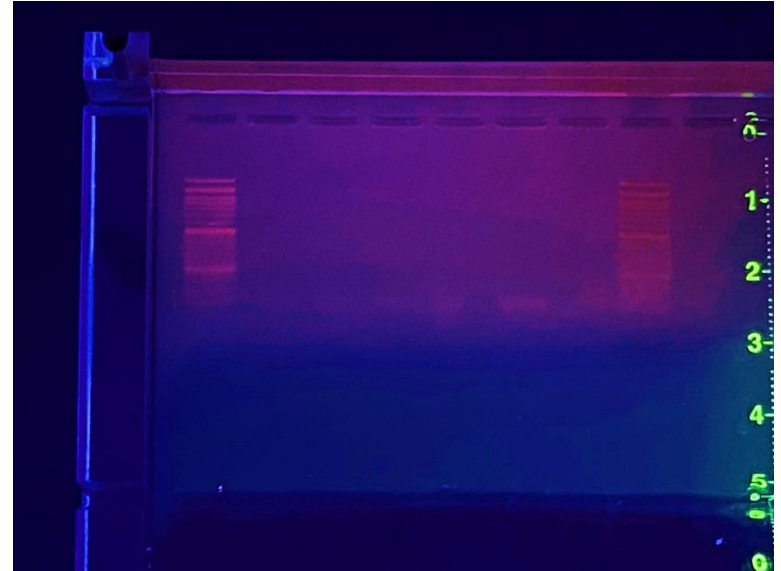


Fig 24. Electroforesis de confirmación de la región de interés en ADN de banano. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Eficiencia de transformación – Choque térmico

Tratamientos	Repetición	Plásmido (ug)	# de colonias	CFU (cfu/ml)	ET (cfu/ug)
TC1	1	3	162	64800000	78072289,2
TC1	2	3	173	69200000	8337349,4
TC1	3	3	179	71600000	86265060,2
TC2	1	5	164	65600000	79036144,6
TC2	2	5	153	61200000	73734939,8
TC2	3	5	217	86800000	104578313



Fig 25. Cepas de *A. tumefaciens* transformadas por choque térmico. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Eficiencia de transformación – Electroporación

Tratamientos	Repetición	Celda (mm)	# de colonias	CFU (cfu/ml)	ET (cfu/ug)
TE1	1	2	270	108000000	216000000
TE1	2	2	263	105200000	210400000
TE1	3	2	282	112800000	225600000
TE2	1	4	245	98000000	118072289
TE2	2	4	313	125200000	150843373
TE2	3	4	264	105600000	12722891,6

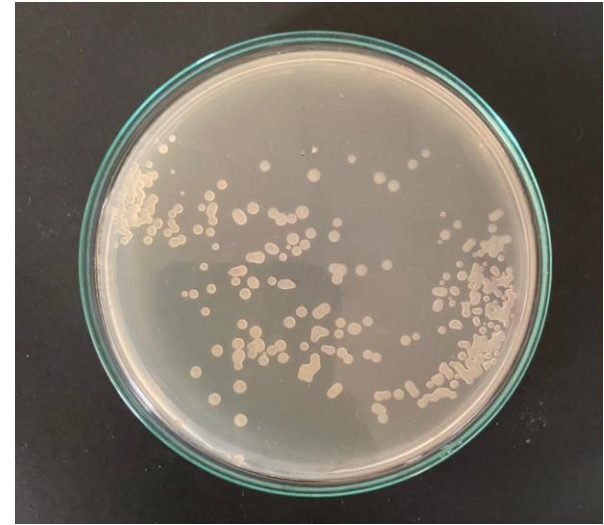


Fig 26. Cepas de *A. tumefaciens* transformadas por Electroporación. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comprobación de transformación

Muestra	Concentración (ug/mL)	Pureza (A260/280)	Pureza (A260/230)
ATE1	1268	2,115	2,056
ATE2	980,3	2,087	1,931
ATC1	1339,7	2,163	1,784
ATC2	1279	1,971	1,867

Sin embargo, no todas las cepas en medio con tetraciclina contienen el fragmento de interés, ya que la tetraciclina no indica su presencia. Además, mutaciones inespecíficas pueden resultar en cepas transformadas que crecen en medio con tetraciclina pero no contienen el fragmento deseado (Luo & Farrand, 1999).

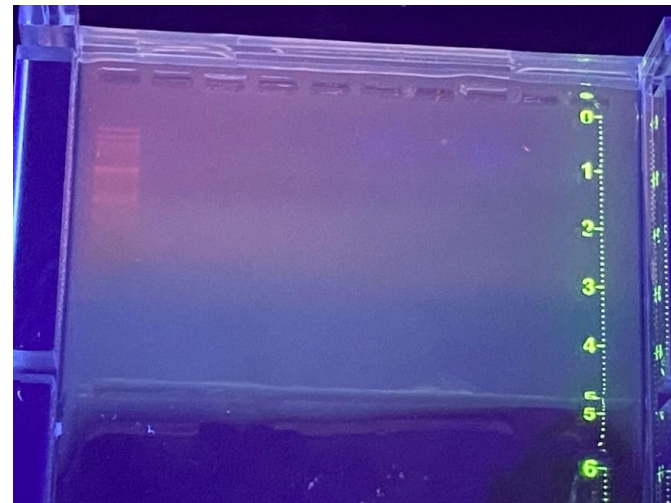


Fig 29. Electroforesis de confirmación de transformación. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Eficiencia de transformación

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ET	12	0,75	0,66	37,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	45191861068941500,00	3	15063953689647200,00	8,17	0,0081
Tratamientos	45191861068941500,00	3	15063953689647200,00	8,17	0,0081
Error	14746299035534200,00	8	1843287379441770,00		
Total	59938160104475700,00	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=112258688,34202
Error: 1843287379441769,2500 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.
TE1	217333333,33	3	24787680,94 A
TE2	93879517,87	3	24787680,94 B
TC2	85783132,47	3	24787680,94 B
TC1	57558232,93	3	24787680,94 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fig 27. ANOVA de eficiencia de transformación. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

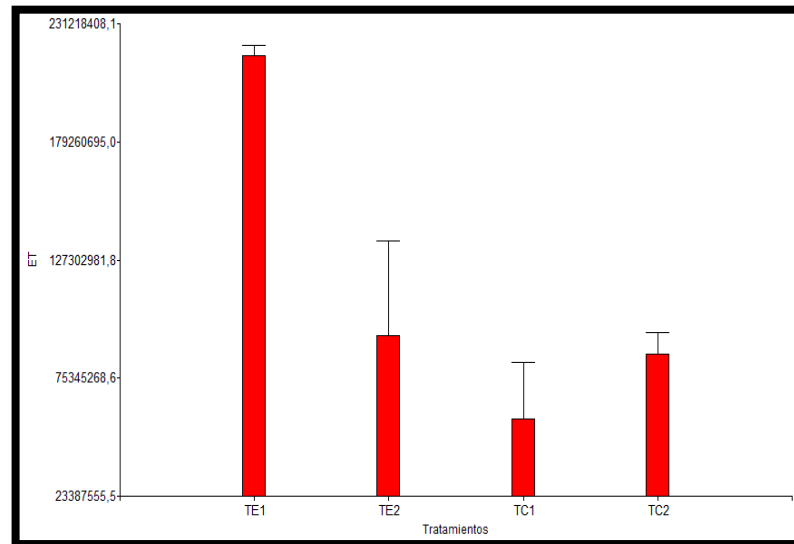


Fig 28. Gráfico de barras de eficiencia de transformación. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La eficiencia de transformación fue de 8.6×10^7 CFU/ug con 5 ug de ADN plasmídico en el choque térmico, mientras que en la electroporación con celdas de 2 mm y 5 ug de ADN plasmídico fue de 2.1×10^8 CFU/ug. En comparación con estudios previos, la electroporación demostró ser más efectiva que el choque térmico para transformar cepas de *A. tumefaciens*.

Comparando los métodos de transformación genética, se destacan diferencias significativas en la eficiencia, como el voltaje en electroporación y el tiempo de cambios de temperatura en choque térmico. Gómez et al. (2018) sugiere que la electroporación, al ofrecer un mejor control en la permeabilidad de la membrana, es más efectiva en la introducción de material genético en células, atribuyendo su eficacia al voltaje aplicado. Aunque el choque térmico es más práctico, García (2015) señala su menor efectividad debido a la estructura de tres capas en la pared celular de *A. tumefaciens*, que limita la formación de poros para la entrada de ADN plasmídico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Viabilidad de crioconservación

Tratamientos	Repetición	# de colonias	CFU (cfu/ml)
T1	1	226	90400000
T1	2	257	102800000
T1	3	239	95600000
T2	1	296	118400000
T2	2	267	106800000
T2	3	253	101200000
T3	1	135	54000000
T3	2	158	63200000
T3	3	162	64800000

Tratamientos	Repetición	# de colonias	CFU (cfu/ml)
T4	1	216	86400000
T4	2	237	94800000
T4	3	251	100400000
T5	1	257	102800000
T5	2	285	114000000
T5	3	246	98400000
T6	1	133	53200000
T6	2	149	59600000
T6	3	106	42400000

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Viabilidad de crioconservación



Fig 30. Viabilidad de crioconservación en glicerol. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

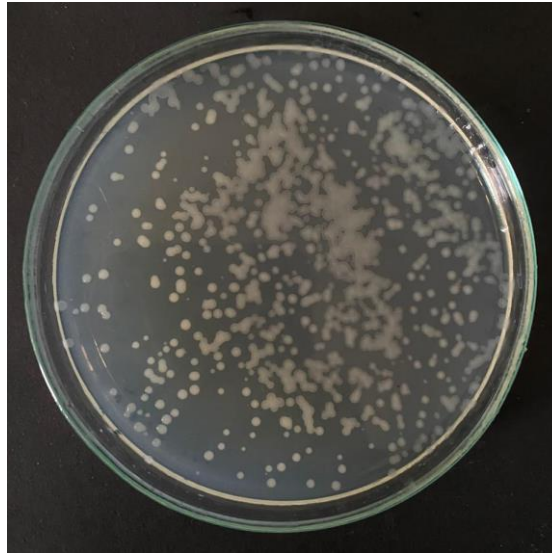


Fig 31. Viabilidad de crioconservación en DMSO. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

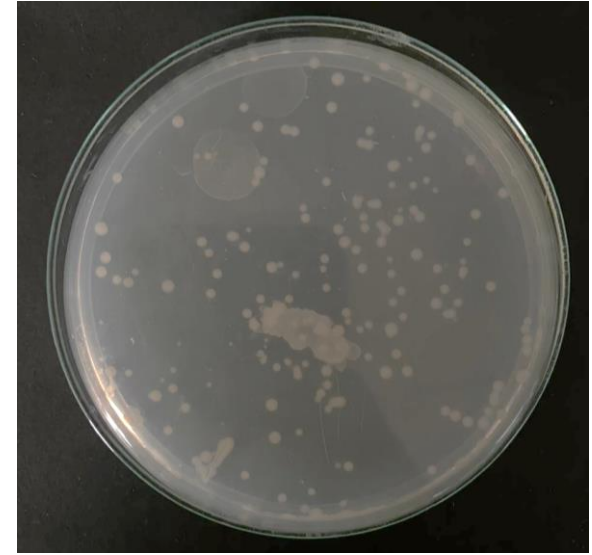


Fig 32. Viabilidad de crioconservación en polietilenglicol. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Viabilidad de crioconservación

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CFU	18	0,93	0,90	8,74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8599866666666670,00	5	171997333333330,00	30,39	<0,0001
Tratamientos	8599866666666670,00	5	171997333333330,00	30,39	<0,0001
Error	67925333333333,00	12	5660444444444,40		
Total	927912000000000,00	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=20633809,14522
Error: 5660444444444,4141 gl: 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.
T2	108800000,00	3	4343748,17 A
T5	105066666,67	3	4343748,17 A
T1	96266666,67	3	4343748,17 A
T4	93866666,67	3	4343748,17 A
T3	60666666,67	3	4343748,17 B
T6	51733333,33	3	4343748,17 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fig 33. ANOVA de viabilidad de crioconservación. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

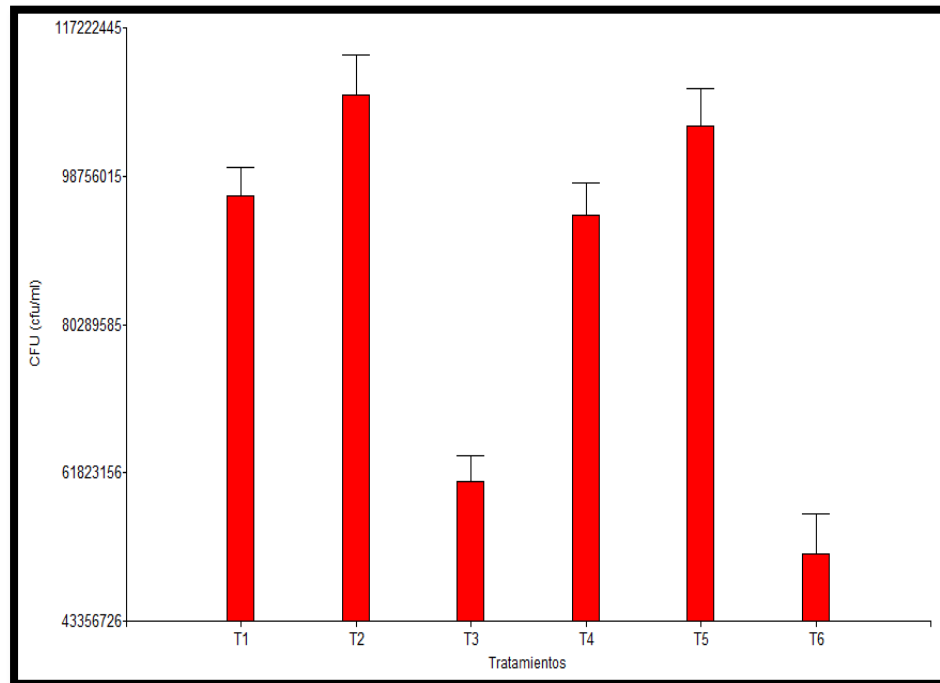


Fig 34. Gráfico de barras de viabilidad de crioconservación. Tomado por: Pachala Dustin (2023)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis estadístico de la viabilidad de crioconservación, se encontró que el DMSO al 10% de concentración, crioconservado durante 2 meses, fue el agente crioprotector más eficiente según las CFU calculadas, superando al Glicerol y al polietilenglicol. Se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos y los agentes crioprotectores.

Investigaciones previas, como la de Ozuna et al. (2019), respaldan que el DMSO en concentraciones de 12,5% a 25% actúa mejor que el glicerol como agente crioprotector. Aunque el glicerol es menos tóxico, el DMSO penetra mejor en la célula, lo que contribuye a una mejor crioconservación (Farrant, 1980). Ahn et al. (2021) informa que tanto el DMSO como el glicerol son eficientes como agentes crioprotectores en comparación con el polietilenglicol, y sugiere la posibilidad de combinarlos con otros agentes para mejorar su efectividad.

CONCLUSIONES

La extracción de ADN plasmídico es esencial en la transformación genética para prevenir contaminantes y fenoles que podrían interferir en el proceso. En este estudio, se seleccionaron plásmidos de la cepa Top 10 de *E. coli* debido a su concentración más alta y mejor pureza en comparación con otras cepas utilizadas.

La transformación bacteriana utilizando un plásmido CRISPR-Cas con ARN guía dirigido a la región promotora del gen RGA2 fue exitosa mediante dos métodos establecidos. Se observaron diferencias significativas entre los métodos, destacando la electroporación como más efectiva que el choque térmico.

Se confirmó la eficacia de los agentes crioprotectores, especialmente el DMSO, para preservar la viabilidad de cepas de *A. tumefaciens*, transformadas y no transformadas. Aunque el glicerol mostró menor viabilidad en comparación con el DMSO, sigue siendo una opción viable para la conservación de cepas.

RECOMENDACIONES

Al realizar los diseños de primers in silico, se debe tener en cuenta las condiciones a las que se trabajará. Mantener una temperatura de melting entre 45°C - 55°C y un contenido de CG% entre 40% - 50% para que sea más estable al eyecturarse la PCR. Además, se debe considerar un tamaño de los primers entre 18 pb a 25 pb.

Se debe ser aséptico en toda el área de trabajo y todos los procesos ejecutados para obtener resultados favorables, ya que, si existe una contaminación desde la extracción del plásmido, las cepas transformadas pueden estar contaminadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahn, H. T., Jang, I. S., Dang, T. V., Kim, Y. H., Lee, D. H., Choi, H. S., . . . Kim, M. I. (2021). Effective Cryopreservation of a Bioluminescent Auxotrophic Escherichia coli-Based Amino Acid Array to Enable Long-Term Ready-to-Use Applications. *Biosensors*, 11(8), 252. doi:10.3390/bios11080252

Farrant, J. (1980). General observations on cell preservation. *Preservation in Medicine and Biology*. Pitman Medical. , 1-18.

Florencio, J., Alarcón, A., García, C., Ferrera, R., Quezada, A., Almaraz, J., . . . Hernández, L. (2023). Inhibición in vitro de bacterias contra *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 2. *Revista mexicana de fitopatología*, 41(1), 126-142. doi:10.18781/r.mex.fit.2207-2

Luo, Z., & Farand, S. (1999). Cloning and Characterization of a Tetracycline Resistance Determinant Present in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *J Bacteriol*, 181. doi:doi.org/10.1128/jb.181.2.618-626.1999

Martínez, G., Rey, J., Pargas, R., & Manzanilla, E. (2020). Marchitez por *Fusarium* raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano. *Agronomía Mesoamericana*, 31(1), 259-276. doi:10.15517/am.v31i1.37925

Yang, J., & Yang, Y. (2012). Plasmid size can affect the ability of *Escherichia coli* to produce high-quality plasmids. 34(11), 2017-2022. doi:10.1007/s10529-012-0994-4

Yang, C., Hamid, S., & Wong, M. (2016). Characterisation of pathogenesis-related genes and resistance gene candidates in banana (*Musa acuminata*) and their expression during host-pathogen interaction. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 39 (1), 55-72.

GRACIAS.