



**Desarrollo de un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RPM1 de banano**

Maxi Valarezo, Leiner Steven

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo

Flores Flor, Francisco Javier, Ph.D.

5 de marzo de 2024

## Hoja de resultados de la herramienta antiplagio



Plagiarism and AI Content Detection Report

MAXI\_LEINER\_PROYECTO UIC-CL.docx

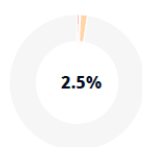
### Scan details

Scan time:  
March 5th, 2024 at 12:24 UTC

Total Pages:  
50

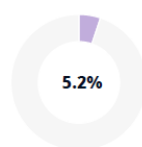
Total Words:  
12457

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.5%	67
Minor Changes	0.2%	30
Paraphrased	1.7%	214
Omitted Words	0%	0

### AI Content Detection



Text coverage		Words
AI text	5.2%	643
Human text	94.8%	11814

[Learn more](#)

.....  
**Flores Flor, Francisco Javier, Ph. D.**

**Director del proyecto de integración curricular**

**C.C: 1713443479**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Desarrollo de un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RPM1 de banano”** fue realizado por el señor **Maxi Valarezo, Leiner Steven**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Sangolquí, 5 de marzo de 2024**

.....  
**Flores Flor, Francisco Javier, Ph. D.**

**Director del proyecto de integración curricular**

**C.C: 1713443479**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Maxi Valarezo, Leiner Steven**, con cédula de ciudadanía n° 0706979382, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Desarrollo de un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RPM1 de banano"** 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, 5 de marzo de 2024**

**Maxi Valarezo, Leiner Steven**

C.C.: 0706979382



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Maxi Valarezo, Leiner Steven**, con cédula de ciudadanía n°0706978382, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: “**Desarrollo de un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RPM1 de banano**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 5 de marzo de 2024

**Maxi Valarezo, Leiner Steven**

C.C.: 0706979382

### **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi familia y a mis queridos padres, Erwin Maxi y Miriam Valarezo, cuyo apoyo inquebrantable y amor incondicional han sido mi mayor fuente de inspiración a lo largo de este camino. Desde muy temprana edad, mis padres me enseñaron a enfrentar los desafíos con determinación y a resolver cualquier obstáculo que se presente. Ellos han sido mis héroes, brindándome su apoyo incondicional en los momentos más difíciles, a pesar de la distancia que nos separa debido a mi búsqueda de una educación más amplia.

Agradezco profundamente a mis hermanos menores, David y Daniel, cuyo constante estímulo me impulsa a ser una mejor persona cada día, sirviendo como ejemplo para ellos y alimentando mi deseo de alcanzar nuevas metas.

Mi familia siempre estuvo presente para guiarme y alentarme en cada paso que daba, recordándome mis metas y apoyándome para que no perdiera el rumbo. Quiero expresar mi gratitud a mi familia de Quito, cuya cercanía y palabras de aliento fueron un sostén fundamental durante este proceso. En particular, agradezco a mi prima Gaby y Mirian, modelos a seguir cuyos logros y consejos me inspiran a superarme cada día. Su presencia en los momentos más importantes de mi vida ha sido invaluable, y espero algún día estar a la altura de su grandeza.

## **Agradecimientos**

Agradezco profundamente a mi tutor de tesis, el Dr. Francisco Flores por su invaluable orientación y apoyo durante todo el proceso de ejecución de este trabajo. Su destacada capacidad profesional y profundos conocimientos han sido una fuente constante de inspiración.

También deseo expresar mi gratitud a la Lic. Silvana Granda por su inestimable paciencia y asistencia en las labores de laboratorio, su colaboración ha sido fundamental para el desarrollo de este trabajo.

Quiero reconocer al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador (INIAP) por su interés en este proyecto y por proporcionar los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación de manera exitosa.

Agradezco a mi querida familia y a mis amados padres por su constante apoyo y aliento que me han brindado en todo momento. Además, a mis amigos de la universidad, quienes han estado a mi lado desde el inicio de la carrera. Su compañía, consejos y momentos de diversión han sido un bálsamo durante este exigente trayecto académico.

Por último, mi profundo agradecimiento a todos los profesores que se han convertido en guías y mentores a lo largo de mi camino en la carrera de Biotecnología. El conocimiento compartido por ellos ha sido invaluable y me ha preparado para destacar como profesional en este fascinante campo de estudio.

## Contenido

Hoja de resultados de la herramienta antiplagio.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	12
Listado de abreviaturas.....	14
Resumen .....	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción .....	17
Formulación del problema .....	17
Justificación del problema .....	18
Objetivos .....	19
Hipótesis .....	19
Capítulo II: Marco teórico .....	20
Banano.....	20
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> tropical raza 4 (Foc R4T).....	20
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	22
Mecanismos de infección y transferencia genética .....	22
Gen RPM1 .....	23
Edición genética con CRISPR-Cas9.....	24
Shock térmico.....	25



Electroporación .....	25
Conservación de <i>Agrobacterium</i> como herramienta genética .....	26
Capítulo III: Metodología .....	27
Zona de estudio.....	27
Identificación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	27
Diseño de primers y condiciones de PCR para <i>E. coli</i> .....	28
Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	30
Condiciones de PCR para el plásmido de <i>E. coli</i> .....	32
Células competentes de <i>A. tumefaciens</i> para choque térmico.....	33
Células competentes de <i>A. tumefaciens</i> para electroporación.....	34
Choque térmico .....	35
Electroporación .....	37
Extracción de ADN genómico de banano Cavendish.....	38
Diseño de primers para identificar la región promotora RPM1 en el banano .....	38
Crioconservación.....	40
Diseño experimental.....	41
Capítulo IV: Resultado .....	44
Identificación molecular de <i>A. tumefaciens</i> AGL1 .....	44
Extracción de ADN plasmídico del vector binario pAGM4723 en <i>E. coli</i> JM109.....	45
Validación del tamaño por PCR.....	46
Siembra de <i>A. tumefaciens</i> transformadas por choque térmico .....	47
Siembra de <i>A. tumefaciens</i> transformadas por electroporación.....	49

PCR del <i>A. tumefaciens</i> AGL1 transformada con el vector binario pAGM4723.....	51
Extracción de ADN genómico de Cavendish .....	52
PCR para identificar la región promotora del gen RPM1 en el banano .....	53
Crioconservación con glicerol.....	54
Crioconservación con DMSO .....	56
Eficiencia de transformación (ET).....	57
Eficiencia de conservación .....	59
Diseño experimental.....	61
Modelo estadístico A.....	62
Modelo estadístico B.....	64
Capítulo V: Discusión.....	66
Capítulo VI: Conclusiones.....	73
Capítulo VII: Recomendaciones.....	74
Capítulo VIII: Bibliografía .....	75
Capítulo IX: Apéndices.....	89

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Primers diseñados en Benchling</i> .....	29
<b>Tabla 2</b> <i>Componentes de PCR para amplificar 1533 pb</i> .....	32
<b>Tabla 3</b> <i>Componentes de PCR para amplificar 1167 pb</i> .....	32
<b>Tabla 4</b> <i>Condiciones de PCR para amplificar 1533 pb</i> .....	33
<b>Tabla 5</b> <i>Primers para amplificar el fragmento de 701 pb del banano</i> .....	40
<b>Tabla 6</b> <i>Cuantificación de ADN plasmídico</i> .....	45
<b>Tabla 7</b> <i>Cuantificación de ADN plasmídico de A. tumefacies transformada</i> .....	51
<b>Tabla 8</b> <i>Cuantificación de ADN genómico Banano Cavendish</i> .....	53
<b>Tabla 9</b> <i>Número de colonias transformadas por Electroporación</i> .....	58
<b>Tabla 10</b> <i>Número de colonias transformadas por choque térmico</i> .....	58
<b>Tabla 11</b> <i>Número de colonias conservadas por glicerol</i> .....	60
<b>Tabla 12</b> <i>Número de colonias conservadas por DMSO</i> .....	60

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Edición genética mediante CRISPR-Cas9 (Zurita, 2021).....	24
<b>Figura 2</b> Diseño de los primers en Benchling y la región a amplificar .....	28
<b>Figura 3</b> Diseño de los primers en Benchling y la región a amplificar .....	29
<b>Figura 4</b> Protocolo de extracción de ADN plasmídico .....	31
<b>Figura 5</b> Protocolo para células quiocompetentes .....	34
<b>Figura 6</b> Protocolo para células electrocompetentes .....	35
<b>Figura 7</b> Protocolo para transformación bacteriana por choque térmico.....	36
<b>Figura 8</b> Protocolo para transformación bacteriana por electroporación.....	38
<b>Figura 9</b> EnsemblPlants identificación de la región Ma09_g28690.....	39
<b>Figura 10</b> Diseño de primers para la región promotora en el programa Benchling .....	39
<b>Figura 11</b> Bacteria Gram-negativa.....	44
<b>Figura 12</b> Se analizó la secuencia utilizando la herramienta BLAST .....	44
<b>Figura 13</b> Confirmación del tamaño del plásmido.....	47
<b>Figura 14</b> Siembra de células transformadas con un total de 98 UFC .....	48
<b>Figura 15</b> Siembra de células transformadas con un total de 175 UFC .....	48
<b>Figura 16</b> Siembra del control negativo .....	49
<b>Figura 17</b> Siembra de células transformadas con un total de 138 UFC .....	50
<b>Figura 18</b> Siembra de células transformadas con un total de 78 UFC .....	50
<b>Figura 19</b> Confirmación del tamaño del plásmido en <i>A. tumefaciens</i> .....	52
<b>Figura 20</b> Presencia de la región promotora del gen <i>RPM1</i> , en el germoplasma de banano...54	
<b>Figura 21</b> Siembra de <i>Agrobacterium</i> criconservada con glicerol 20 % .....	55
<b>Figura 22</b> Siembra de <i>Agrobacterium</i> criconservada con glicerol 30 % .....	55
<b>Figura 23</b> Siembra de <i>Agrobacterium</i> criconservada con glicerol 40 % .....	56
<b>Figura 24</b> Siembra de <i>Agrobacterium</i> criconservada con DMSO 5 %.....	56
<b>Figura 25</b> Siembra de <i>Agrobacterium</i> criconservada con DMSO 10 %.....	57

<b>Figura 26</b> <i>Eficiencia de transformación de los 4 tratamientos</i> .....	59
<b>Figura 27</b> <i>Eficiencia de conservación de los 6 tratamientos</i> .....	61
<b>Figura 28</b> <i>Pruebas no formales de la normalidad</i> .....	62
<b>Figura 29</b> <i>Gráfico del supuesto de normalidad</i> .....	62
<b>Figura 30</b> <i>Prueba de Shapiro Wilks</i> .....	63
<b>Figura 31</b> <i>Prueba de Leven</i> .....	63
<b>Figura 32</b> <i>Pruebas no formales de la normalidad</i> .....	64
<b>Figura 33</b> <i>Gráfico del supuesto de normalidad</i> .....	64
<b>Figura 34</b> <i>Prueba de Shapiro Wilks</i> .....	64
<b>Figura 35</b> <i>Prueba de Leven</i> .....	65

### Listado de abreviaturas

**RPM1:** Resistant to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1.

**CRISPR:** Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**Foc 1:** *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* raza 1

**Foc 1:** *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* raza 2

**FocR4T:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical raza IV.

**MoClo:** Modular Cloning.

**NHEJ:** Unión de Extremos No Homólogos.

**PAM:** Motivo adyacente al protoespaciador.

**LB:** Luria-Bertani

**SOC:** Super Optimal Broth with Catabolite repression.

**PEG:** Polietilenglicol

## Resumen

El banano (*Musa spp.*) se posiciona como el cuarto alimento más consumido a nivel mundial, con Ecuador liderando la producción y exportación global de la variedad Cavendish, abarcando el 29% del mercado internacional. El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (Foc R4T) representa una seria amenaza para la producción bananera en regiones tropicales y subtropicales, persistiendo en el suelo durante décadas y propagándose fácilmente, lo que provoca síntomas devastadores en las plantas.

El objetivo de esta tesis es transferir un vector binario Ti que contiene el gen RPM1, asociado a la resistencia a la fusariosis, desde *E. coli* JM109 a *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. El plásmido pAGM4351, que contiene el sistema CRISPR-Cas9, se utilizará para editar el promotor del gen RPM1 en el genoma del banano. Se compararon dos métodos de transformación bacteriana, Electroporación y Choque térmico, para determinar su eficiencia en la introducción del vector pAGM4351 en *A. tumefaciens*. Además, se desarrolló un protocolo de crioconservación de cepas transformadas, utilizando glicerol y DMSO a diferentes concentraciones, para evaluar su eficacia en la conservación a largo plazo a -80°C. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción genómica del banano Cavendish y se realizó la PCR para amplificar el fragmento diseñado del gen RPM1.

Los resultados mostraron que la electroporación fue el método más eficiente para transformar *Agrobacterium*, mientras que la crioconservación con glicerol demostró ser efectiva para mantener la viabilidad celular a bajas temperaturas. Este proceso sienta las bases para futuras investigaciones que permitan infectar suspensiones celulares de banano y editar la región promotora del gen RPM1 en el genoma, con el fin de obtener variedades resistentes.

*Palabras Clave:* RPM1, CRISPR-Cas9, Electroporación, quimiocompetentes

## Abstract

Banana (*Musa* spp.) is positioned as the fourth most consumed food worldwide, with Ecuador leading the global production and export of the Cavendish variety, covering 29% of the international market. The fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4 Tropical (Foc R4T) represents a serious threat to banana production in tropical and subtropical regions, persisting in the soil for decades and spreading easily, causing devastating plant symptoms.

Translated with DeepL.com (free version)The aim of this thesis is to transfer a binary Ti vector containing the RPM1 gene, associated with fusarium resistance, from *E. coli* JM109 to *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. The plasmid pAGM4351, containing the CRISPR-Cas9 system, will be used to edit the promoter of the RPM1 gene in the banana genome. Two bacterial transformation methods, Electroporation and Heat shock, were compared to determine their efficiency in introducing the pAGM4351 vector into *A. tumefaciens*. In addition, a cryopreservation protocol of transformed strains was developed, using glycerol and DMSO at different concentrations, to evaluate their efficiency in long-term preservation at -80°C. Subsequently, genomic extraction of Cavendish banana was carried out and PCR was performed to amplify the designed fragment of the RPM1 gene.

The results showed that electroporation was the most efficient method to transform *Agrobacterium*, while cryopreservation with glycerol proved to be effective in maintaining cell viability at low temperatures. This process lays the foundation for future research to infect banana cell suspensions and edit the promoter region of the RPM1 gene in the genome to obtain resistant strains.

*Key words:* RPM1, CRISPR-Cas9, Electroporation, chemo-competents



## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

El banano (*Musa* spp.) es una de las frutas económicamente relevantes a nivel mundial debido a su significativa exportación, ocupando la cuarta posición como alimento más consumido a nivel global (Ploetz, 2015). Ecuador se posiciona como líder en la producción y exportación de banano, siendo reconocido en el año 2022 por abarcar el 29% del mercado internacional, con más de 317 millones de cajas anuales (Torres et al., 2022). Los cultivares como Gros Michel y Cavendish, son triploides (AAA) y partenocárpicos (Perrier et al., 2011).

El hongo Foc R4T, conocido como la enfermedad de Panamá o marchitez por *Fusarium* (Zapata et al., 2022). Es una amenaza fitosanitaria que causa severos problemas en la producción de banano en zonas tropicales y subtropicales (Dita et al., 2018). Esta enfermedad inicia al obstruir el sistema vascular (xilema) provocando síntomas como clorosis en las hojas, división del pseudotallo con decoloración vascular interna y provocando la muerte de la planta (Thangavelu et al., 2022).

El Foc R4T puede persistir en el suelo por décadas, reproduciéndose asexualmente mediante microconidios, macroconidios y clamidosporas, las cuales muestran resistencia a herbicidas (Pegg et al., 2019). La gestión de la enfermedad carece de soluciones definitivas, limitándose a medidas de exclusión y cuarentena (Pérez et al., 2014). El patógeno inicia la infección como hemibiotrofo, estableciendo una relación con el huésped, pero luego se transforma en necrotrofo, provocando la muerte del tejido del huésped (Dita et al., 2018). La contaminación del suelo facilita la propagación a través de calzado, llantas de vehículos y aguas superficiales (Nelson, 2013).

El gen RPM1 desencadena resistencia a patógenos como bacterias, hongos, virus, nematodos e insectos al sintetizar proteínas de resistencia con dominios nucleotídicos (NB) y repeticiones ricas en leucina (LRR) en el citoplasma (Bai et al., 2013). Funciona como un sensor que detecta moléculas específicas producidas por bacterias patógenas,

desencadenando una cascada de señales intracelulares. Esto incluye la elevación de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  y la generación de una respuesta inmunitaria en la planta, activando la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) (Grant et al., 2001).

La falta de métodos efectivos contra Foc R4T impulsa la exploración de estrategias de mejoramiento genético mediante la edición genética con CRISPR-Cas9, una herramienta poderosa para introducir cambios precisos en el genoma de las plantas (Tripathi et al., 2020). El cruce convencional, al ser lento e ineficiente en el desarrollo de resistencia a patógenos, se ve limitado por la incompatibilidad genética y la transferencia de genes no deseados (Wang et al., 2021). El uso de métodos como el control químico puede generar riesgos ambientales. Por ello, la implementación de tecnologías modernas para modificar genes específicos en el genoma del banano, como la edición genética, busca mejorar los métodos convencionales y superar estas limitaciones (Viljoen et al., 2020).

El objetivo de esta investigación es transformar *Agrobacterium tumefaciens* mediante la introducción de un vector binario que lleva el sistema CRISPR-Cas9 para editar la región promotora RPM1, asociado a la resistencia de fusariosis en banano. Una vez transformado el *Agrobacterium* con este vector, se busca escalarlo a suspensiones celulares que serán infectadas para desarrollar plantas de banano asociado a la resistencia del patógeno.

### **Justificación del problema**

El banano es esencial para cerca de 400 millones de personas en todo el mundo, el grupo Cavendish contribuye al 47% de la producción mundial, se cultiva en más de 130 países y el marchitamiento por Foc R4T es una enfermedad devastadora que afectaría a la economía de muchos países (Thangavelu et al., 2022). La cepa ha afectado a 27 países y no existe actualmente ningún cultivar de banano comercial con una resistencia a Foc R4T, ni mucho menos algún tratamiento químico capaz de combatirlo (Pegg et al., 2019). Aunque Ecuador aún no se ve afectado, países vecinos como Perú y Colombia ya experimentan el impacto del Foc R4T (Westerhoven et al., 2022).

La amenaza de cepas anteriores como Foc R1 y Foc R2, provocó cambios drásticos en los cultivares de banano debido a una epidemia de marchitez por *Fusarium* que casi eliminó la variedad Gros Michel. La industria bananera cambió de cultivares pasando de Gros Michel a Cavendish para garantizar la continuidad de la producción (Staver et al., 2020). La actual amenaza de Foc R4T presenta desafíos únicos debido a su amplia presencia y rápida propagación (Tripathi et al., 2022). Las herramientas de edición genética y tecnologías modernas surgen como soluciones específicas y eficaces para abordar esta raza (Wang et al., 2021). Esto implica la creación de variedades de banano asociadas a la resistencia del Foc R4T mediante la introducción de un vector plasmídico que contiene el sistema CRISPR-Cas9 para editar el promotor del gen RPM1 presente en el banano. Se emplea *Agrobacterium tumefaciens* para insertar este material genético en las células vegetales del banano.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

- Desarrollo de un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RPM1 de banano.

### ***Objetivo específicos***

- Transformar *Agrobacterium tumefaciens* con un plásmido que contiene el sistema CRISPR-Cas9 para la edición del promotor del gen RPM1, asociado con la resistencia a la fusariosis en banano.
- Confirmar la presencia de la región promotora del gen RPM1, en el germoplasma de banano.
- Estandarizar un protocolo óptimo para la conservación de *Agrobacterium* transformada.

## **Hipótesis**

Existen diferencias significativas en la eficiencia de transformación en *Agrobacterium tumefaciens* para la cepa AGL1 con dos métodos de transformación bacteriana diferentes.

## Capítulo II: Marco teórico

### Banano

El plátano y el banano (*Musa sp.*) son cruciales en la agricultura mundial, contribuyendo con 163 millones de toneladas anuales en 135 países. La diversidad de banano a nivel mundial se centra principalmente en las variedades triploides, que surgen de la hibridación de dos especies diploides silvestres, *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B). Estos cultivos son fundamentales en la vida de más de 400 millones de personas y representan una fuente vital de ingresos en países en desarrollo (Wang et al., 2019). Aunque existen diversas variedades, el grupo Cavendish (AAA) destaca al representar el 47% de la producción mundial, con Ecuador como líder mundial en exportaciones de banano, aportando el 4% al PIB en el país, principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas y El Oro (Dempsey, 2022).

Cavendish destaca por su valioso aporte nutricional y su elevado contenido de almidón. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) los reconoce como el cuarto cultivo alimentario más esencial, superado únicamente por el arroz, el trigo y el maíz (Song et al., 2018). Las musáceas comestibles se consolidan como alimentos clave a nivel mundial, la amenaza de la marchitez por *Fusarium* emerge como un desafío crítico para la seguridad alimentaria y la economía agrícola (Churchill, 2011).

### ***Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* tropical raza 4 (Foc R4T)**

El *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (Foc), responsable del marchitamiento en bananos, es un hongo que exhibe una variedad de razas y grupos genéticos (Meldrum et al., 2012). Las razas Foc 1, Foc 2 y Foc 4 afectan a distintos cultivares de banano, siendo la Foc 4 actualmente la más letal y dañina para Cavendish (Dita et al., 2018). Esta raza se divide en cepas subtropicales y tropicales, presentando un riesgo global para la producción de banano (Fourie et al., 2009).

El Dr. Joseph Bancroft informó el primer caso de marchitamiento por *Fusarium* en Australia en 1874, marcando el inicio de una amenaza persistente para la industria bananera (Bancroft, 1876). La raza 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, desató pérdidas en el mercado internacional de banano en la década de 1950. El reemplazo del clon Gros Michel por clones Cavendish, que representan el 40 % de la producción mundial, fue una respuesta exitosa (Bubici et al., 2019). Ante la posibilidad de una segunda epidemia por la raza 4, las pérdidas económicas podrían ser mayores, estimadas en 2.3 billones de USD (Ploetz, 2005).

La marchitez por *Fusarium*, también llamada enfermedad de Panamá puede ser causada por cualquiera de las razas Foc, se caracteriza por la producción de microconidios, macroconidios y clamidosporas como estructuras de supervivencia (Mostert et al., 2017). Estas estructuras de resistencia permiten al hongo adaptarse y subsistir en el suelo durante más de veinte años sin hospederos alcanzando temperaturas superiores a 24 °C (Arie, 2019). Transmitido a través del suelo, este afecta las raíces, obstruyendo los vasos del xilema y causando una coloración marrón rojiza en el rizoma y pseudotallo, lo que finalmente resulta en la muerte de la planta (Ordoñez et al., 2015). Las hojas adquieren un tono amarillo brillante, marchitan y colapsan alrededor del pseudotallo. Las plantas enfermas suelen perecer antes de producir racimos, disminuyendo el rendimiento en campos afectados (Pegg et al., 2019). Tras la contaminación del suelo con Foc, los cultivares susceptibles no pueden ser replantados con éxito hasta después de al menos 30 años (García-Bastidas et al., 2014).

Las clamidosporas de *Fusarium*, una forma de espora resistente, germinan en respuesta a nutrientes en los exudados de raíces de banano. Este evento desencadena la formación de micelio y conidios en un período de seis y ocho horas. Posteriormente, se forman nuevas clamidosporas en un lapso de dos a tres días después de la germinación inicial (Guo et al., 2015). El Foc R4T al infectar las puntas de las raíces secundarias y terciarias del banano

penetran la cofia radicular y la zona de elongación, estableciendo una relación parasitaria intercelular hemibiotrófica en la corteza de la raíz antes de ingresar al xilema (Dita et al., 2018). En el xilema, el *Fusarium* coloniza en forma de conidios y se mueve a través de la corriente de transpiración hasta que es bloqueado (Li et al., 2017). Una vez bloqueado, los conidios germinan y crecen a través de las placas del xilema, lo que permite que el hongo esporule rápidamente y cause daño al huésped (Pegg et al., 2019).

### ***Agrobacterium tumefaciens***

*A. tumefaciens* es un grupo de bacterias del suelo Gram-negativas perteneciente a la familia Rhizobiaceae, mide aproximadamente 1-3  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5-1  $\mu\text{m}$  de ancho (Aminedi et al., 2013). Causa tumores de agalla en la corona en plantas al introducir su ADN-T en el genoma, se ha estudiado como patógeno e importante herramienta biotecnológica (Gohlke & Deeken, 2014). Su morfología en la pared celular incluye una membrana externa de lipopolisacárido, exhibe resistencia a ciertos antibióticos (Matthysse, 2006).

En el campo de la ingeniería genética, se emplean diversas cepas de *A. tumefaciens* para llevar a cabo la transferencia de genes en plantas (Sun et al. 2006). Las cepas más utilizadas con este propósito se encuentran GV3101, EHA105, AGL1 y MP90, destacándose por su eficacia en el proceso de transferencia de material genético (Chetty et al., 2013).

### ***Mecanismos de infección y transferencia genética***

La ingeniería genética vegetal involucra la transferencia e integración de genes de interés en el cromosoma de la célula vegetal (Sun et al. 2006). Existen métodos de transformación bacteria como la biolística, electroporación, transformación con polietilenglicol (PEG) y la transformación mediada por *A. tumefaciens* (Díaz, 2005).

A través de un plásmido (Ti-plásmido), *A. tumefaciens* transfiere un segmento de ADN plasmídico (ADN-T) a la célula huésped. En los plásmidos Ti recombinantes, se inserta un marcador seleccionable en el genoma de la célula huésped para facilitar la selección de transformantes (Ozyigit, 2020). La transferencia de T-DNA ocurre cuando se mezclan las

bacterias con los explantes vegetales durante la etapa de infección, y luego continúa durante el proceso de co-cultivo. Durante este período, se espera que el T-DNA se transfiera y se integre en los cromosomas de las células vegetales. Después de esta etapa, se realiza un proceso de lavado para eliminar las bacterias restantes de los explantes, lo que permite que las células vegetales infectadas con el T-DNA sigan creciendo y desarrollándose (Matthysse, 2006).

Los protocolos eficientes y de alto rendimiento para la transformación en células vegetales con la intervención de *A. tumefaciens*, empleando cepas como GV3101, EHA105, AGL1 y MP90, aún no han permitido determinar cuál de ellas es la más efectiva pero permiten transferir material genético (Dan et al. 2006). La falta de un análisis sistemático que compare las eficiencias de transformación entre las diversas cepas y su capacidad para incorporar números específicos de copias del transgén en las plantas es evidente (Cruz-Mendivil et al. 2011). Este aspecto es de gran importancia, dado que la cantidad de copias de transgenes puede tener un impacto significativo en los niveles de expresión genética, el fenómeno de silenciamiento de genes y la estabilidad del material genético (Chetty et al., 2013).

### **Gen RPM1**

El gen RPM1, asociado a la resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, codifica una proteína con características de un receptor citoplasmático clásico, presentando un dominio amino terminal en espiral, un sitio de unión de nucleótidos central (NB) y un dominio LRR carboxilo terminal. Fue uno de los primeros genes de resistencia de plantas molecularmente caracterizados en *Arabidopsis thaliana*, marcando un hito en la investigación (Tian et al., 2003).

La caracterización funcional de RPM1 y sus interacciones, especialmente con la proteína interactuante (RIN4) en presencia de las proteínas efectoras bacterianas AvrRpm1 o AvrB, ha proporcionado una comprensión de los mecanismos de resistencia a enfermedades en plantas (Mackey et al., 2002). La interacción entre la proteína AvrRpm1 y el gen RPM1 desencadena una respuesta de defensa en la planta contra *P. syringae* (Rose et al., 2012).

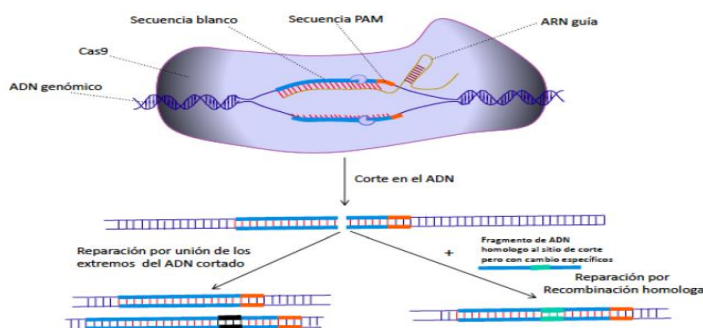
## Edición genética con CRISPR-Cas9

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) son secuencias de ADN que colaboran con genes asociados para modelar enfermedades y mejorar características deseables (Sameeullah et al., 2018). La modificación del genoma se lograba por la recombinación homóloga en células madre embrionarias en ratas como modelos animales de experimentación, pero recientemente, las nucleasas diseñadas, como las nucleasas con dedos de zinc y el sistema CRISPR-Cas9, han simplificado y abaratado procesos. Estas nucleasas diseñadas generan roturas de doble cadena en el genoma, activando vías de reparación propensas a errores o dirigidas por homología (Lino et al., 2018).

El CRISPR-Cas9 consta de tres componentes principales: la proteína Cas9, el ARN guía único (sgRNA) y los sitios objetivo situados aguas arriba de un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) presentes en el plásmido utilizado para la transformación bacteriana con el gen de resistencia RPM1 (Sameeullah et al., 2018). El complejo Cas9/sgRNA tiene la capacidad de buscar y reconocer eficientemente secuencias de ADN genómico diana cercanas a un PAM. Una vez localizado el sitio objetivo, Cas9 induce una rotura de doble hebra (DSB) tres bases aguas arriba del PAM, generando así una DSB de extremos romos. La reparación del DSB puede producirse mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) o mediante reparación dirigida por homología (HDR) (Xing et al., 2014).

### Figura 1

*Edición genética mediante CRISPR-Cas9 (Zurita, 2021)*





## **Shock térmico**

La transformación bacteriana por choque térmico, se basa en la introducción de material genético externo, como plásmidos, en células bacterianas por medio de la formación de poros (Patel et al., 2013). Este método es comúnmente empleado en laboratorios para manipulaciones genéticas y la producción de organismos modificados genéticamente (Wise et al., 2006). La eficiencia de la transformación por condiciones óptimas, como la temperatura y el tiempo de choque térmico, pueden variar según la cepa bacteriana específica (Merdekawati et al., 2023).

El proceso de transformación por choque térmico inicia con la preparación de células químicamente competentes, las cuales se exponen a una solución de cloruro de calcio para contrarrestar la repulsión electrostática entre el ADN plasmídico y la membrana celular bacteriana. Posteriormente, las células se someten a un choque térmico, implicando un breve aumento de la temperatura a alrededor de 42-45 °C durante unos pocos minutos. Este proceso debilita temporalmente la membrana celular, facilitando la entrada de moléculas de ADN (Rahimzadeh et al., 2016). Patigu et al. descubrieron que una temperatura de choque térmico de 55 °C con un tiempo de 60 segundos era la mejor condición para transformar el plásmido en *E. coli*, aunque esto puede variar según la cepa bacteriana (Patigu et al., 2021).

## **Electroporación**

La electroporación es una técnica que implica la aplicación de un campo eléctrico para crear poros transitorios en las membranas plasmáticas de células procarióticas y eucariotas (Meijerink et al., 2018). La electroporación se ha utilizado ampliamente en biología, medicina y biotecnología debido a su rápida aplicación, rentabilidad, aplicabilidad a varios tipos de células, idoneidad para aplicaciones a gran escala y la capacidad de lograr un alto porcentaje de transformación estable (Yarmush et al., 2014).

La electroporación de células implica varios pasos. Inicialmente, se preparan las células competentes a través de su cultivo y el tratamiento con los plásmidos deseados (Kumar et al., 2019). Posteriormente, estas células competentes, junto con el plásmido de interés, se colocan dentro de una celda de electroporación y se exponen a pulsos eléctricos bajo condiciones controladas de voltaje, capacitancia y resistencia (Kotnik et al., 2012). El campo eléctrico genera poros iniciales hidrofóbicos inestables en la bicapa lipídica, lo que conduce a la formación de poros temporales que facilitan la entrada del ADN plasmídico en las células (Kotnik & Weaver, 2016).

Sin embargo, corrientes eléctricas excesivas, especialmente campos de alta intensidad, pueden causar sobrecalentamiento y la muerte celular, impidiendo la recuperación y la transformación celular deseada (Ozyigit, 2020).

### **Conservación de *Agrobacterium* como herramienta genética**

La congelación de cultivos bacterianos a temperaturas de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , es una práctica común para la crioconservación de cepas en laboratorios, y diversos crioprotectores se han utilizado a lo largo del tiempo. Desde 1913, se ha observado que aditivos como el azúcar, la leche o el glicerol protegen a las bacterias de la muerte celular durante ciclos repetitivos de congelación/descongelación (Jyothishwaran et al., 2007).

El glicerol es comúnmente utilizado como agente crioprotector en la preservación de cultivos bacterianos, con métodos convencionales que involucran la suspensión de las cepas en una solución de glicerol al 15%, aunque esta concentración puede variar hasta alcanzar un 25%, dependiendo de la cepa bacteriana (Wise et al., 2006). Sin embargo, alternativas como la leche desnatada al 10% o el DMSO al 5% han demostrado mejorar la viabilidad de varias cepas, como *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Borrelia burgdorferi*, en comparación con el glicerol, especialmente después de la descongelación y la incubación prolongada a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Cody et al., 2008).

### Capítulo III: Metodología

#### Zona de estudio

El trabajo de titulación se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, situado en el cantón Rumiñahui de la ciudad de Quito, en la provincia Pichincha. El proyecto tuvo una duración de 6 meses, desde su planteamiento en octubre de 2023 hasta su presentación en marzo de 2023.

#### Identificación de *Agrobacterium tumefaciens*

En el laboratorio, se mantuvieron cepas de *A. tumefaciens* en glicerol durante un período prolongado de cinco años. Se realizó un análisis para determinar la viabilidad celular, es decir, se evaluó si las células seguían siendo viables con el propósito de transformarlas posteriormente con un vector plasmídico que contiene el sistema CRISPR-Cas9.

Se tomó un tubo que contenía la cepa crioconservada, se descongeló y luego se sembró utilizando hisopos estériles en medio sólido Luria-Bertani. Posteriormente, se incubó a la temperatura adecuada, generalmente entre 28-30 °C, y se esperó observar crecimiento visible dentro de 3 a 5 días. Una vez que se detectó la presencia de colonias en la placa, se procedió a realizar pruebas bioquímicas, microbiológicas y moleculares para caracterizar la cepa.

Se utilizó la prueba bioquímica de la catalasa, la cual implica la aplicación de agua oxigenada (peróxido de hidrógeno al 3%) sobre una colonia bacteriana. En el caso de *A. tumefaciens*, se observó efervescencia o liberación de burbujas de oxígeno en la zona de aplicación del peróxido de hidrógeno, lo que indica un resultado positivo para la prueba de catalasa.

En la prueba microbiológica, se lleva a cabo la tinción de Gram siguiendo el protocolo de Merck Millipore (2007), dado que la bacteria es gram negativa (Anexo 1). Durante la tinción de Gram, el *A. tumefaciens* retiene el colorante de contraste (safranina o fucsina) después de

ser tratada con alcohol o acetona, lo que le confiere un color rosado o rojo en contraste con las bacterias gram positivas, que retienen el color violeta-azulado del cristal violeta.

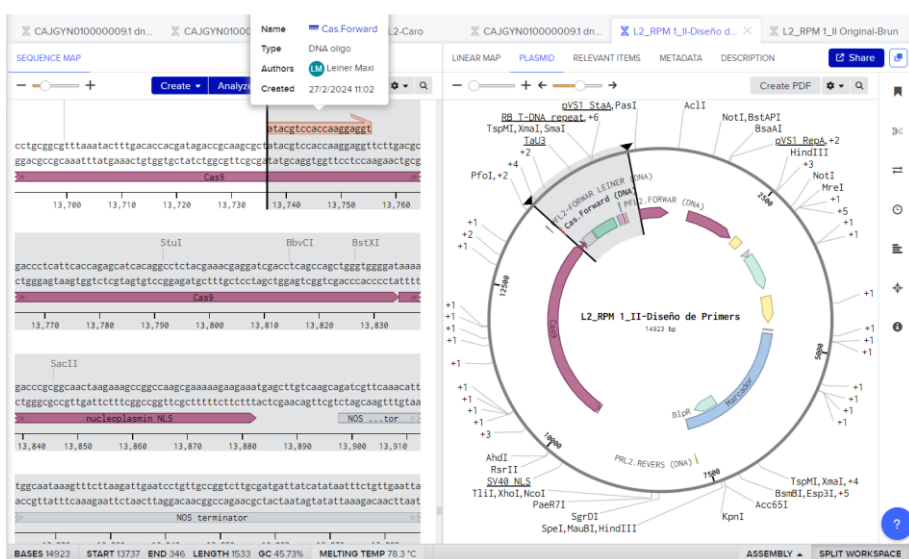
Las pruebas moleculares comenzaron con la extracción de ADN genómico de *A. tumefaciens* utilizando el protocolo descrito por Cheng & Jiang (2006). Posteriormente, se llevó a cabo una PCR universal dirigida al gen 16S, el cual contiene regiones conservadas en bacterias (Moorlag et al., 2023). Los productos de PCR fueron secuenciados y las secuencias resultantes fueron comparadas con la herramienta bioinformática BLAST.

### Diseño de primers y condiciones de PCR para *E. coli*

Los primers diseñados para amplificar el plásmido dentro de *E. coli* se generaron utilizando el programa Benchling. Se diseñaron primers Forward y Reverse que amplifican un fragmento de 1533 pares de bases (pb) para confirmar la presencia de la Cas en el plásmido mediante una PCR *in silico* en Benchling (Figura 2). Además, se diseñaron otro par de primers para identificar la región de la Cas y el ARN guía, amplificando un tamaño de 1167 pb en Benchling (Figura 3).

### Figura 2

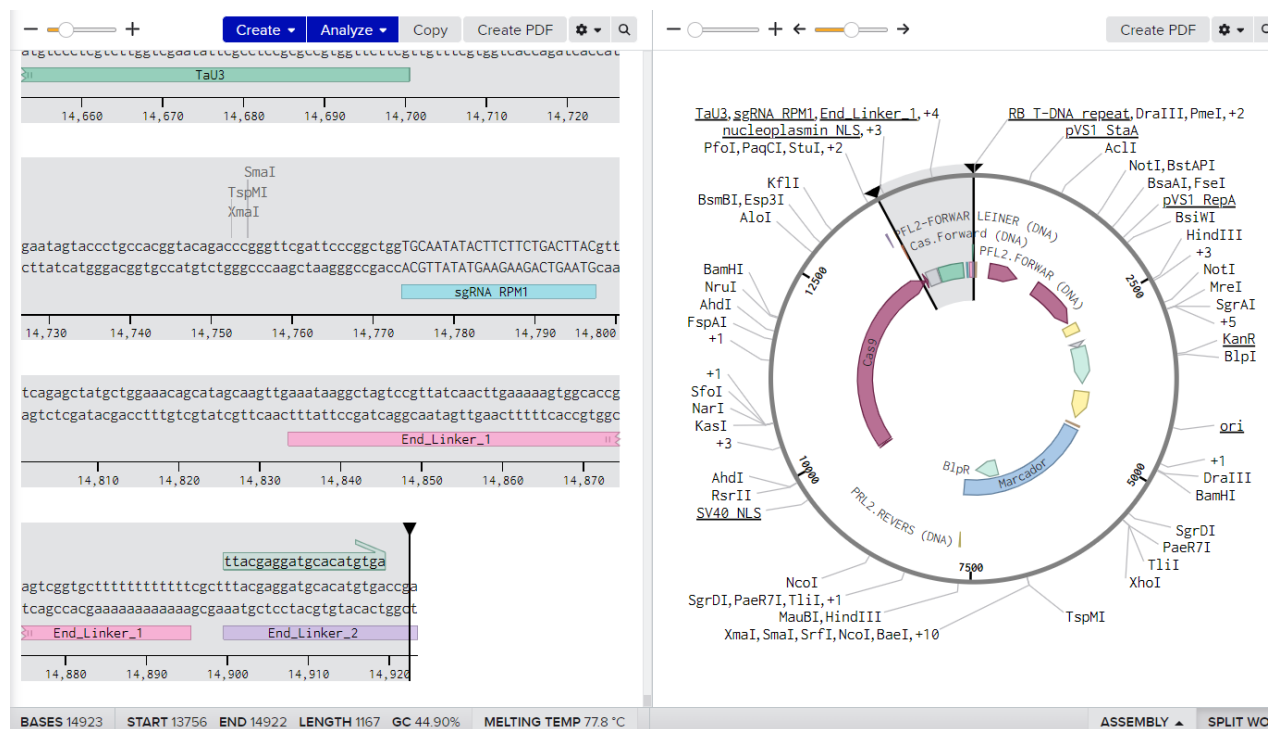
#### Diseño de los primers en Benchling y la región a amplificar



Nota. Los primers Cas.Forward y Bac.Reverse, amplifican 1533 pb.

### Figura 3

Diseño de los primers en Benchling y la región a amplificar



Nota. Los primers Cas.Forward y L2.2.Reverse, amplifican 1167 pb.

### Tabla 1

Primers diseñados en Benchling

Primers	Secuencia	GC%	Tm	Tamaño amplificar
Cas.Forward	5'-ATACGTCCACCAAGGAGGTT-3'	50	61	1533 pb
Bac.Reverse	5'-CCTTCATGCGTTCCCCTTGC-3'	60	64.8	
Cas.Forward	5'-ATACGTCCACCAAGGAGGTT-3'	50	61	1167 pb
L2.2.Reverse	5'-TCGGTCACATGTGCATCCTCT-3'	55	62,4	

Una vez que llegan los primers de la empresa Macrogen, junto con las distintas especificaciones del oligo, como la temperatura de melting y el porcentaje de Guanina-Citosina,

procedemos a determinar la temperatura de annealing para la PCR. Esto implica realizar un promedio de las temperaturas de los primers forward y reverse para determinar la temperatura optima de annealing que se debe programar en el termociclador. Este paso es crucial para garantizar la eficacia y la especificidad de la amplificación durante el proceso de PCR.

$$T_{\text{annealing}} = (0.3 \times T_m \text{ primer}) + (0.7 \times T_m \text{ producto}) - 14.9$$

**Donde:**

**Tm primer=** Temperatura del primer Forward o Reverse enviados por MacroGen.

**Tm producto=** Temperatura del punto de fusión del producto.

Después de calcular las dos temperaturas de anillamiento tanto para forward y reverse, se realiza un promedio entre ellas para programar el termociclador a la temperatura adecuada, permitiendo que los primers se unan específicamente a sus sitios de reconocimiento.

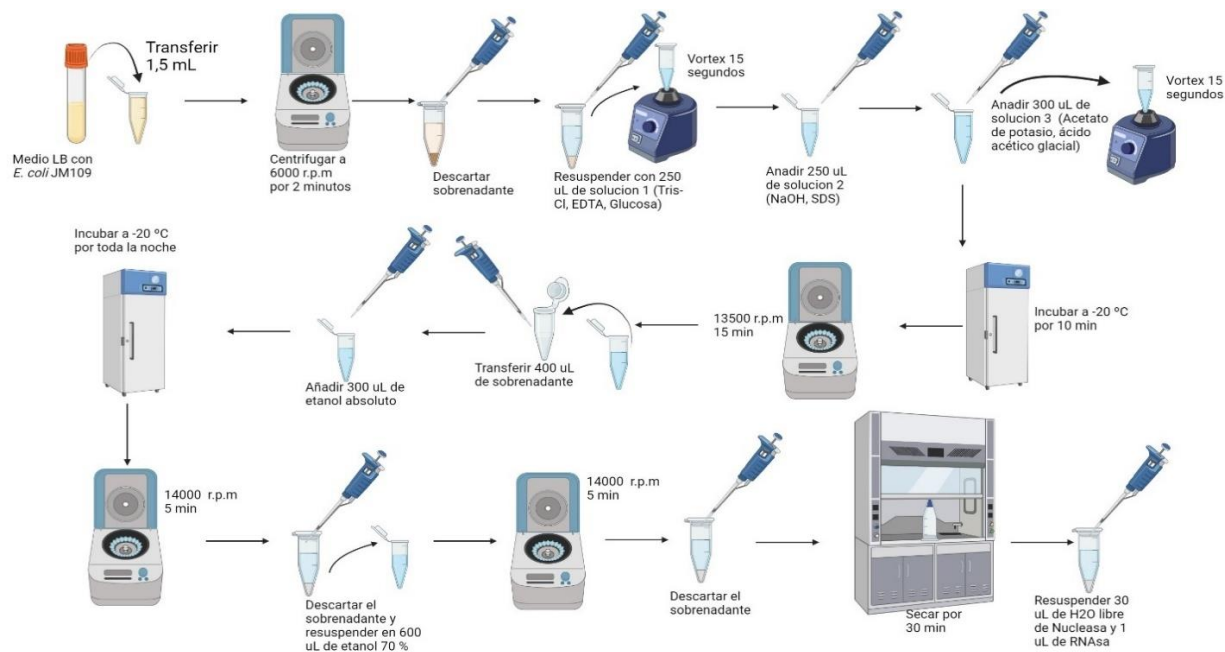
### **Extracción de ADN plasmídico de *E. coli***

Las cepas de *E. coli* esta crioconservaron en glicerol al 25%. Posteriormente, se sembraron en medio sólido LB y se incubaron durante 24 horas para permitir el crecimiento de colonias aisladas. Una vez desarrolladas las colonias, se seleccionó una y se sembró en medio líquido LB en un volumen de 6 mL. La incubación se realizó a 200 revoluciones por minuto a temperatura ambiente durante 20 horas. Seguidamente, se midió la densidad óptica (OD) del medio para garantizar que las cepas estuvieran en la fase exponencial, con un valor dentro del rango de 0.5 a 1.

Una vez confirmada la fase de crecimiento, se procede a la extracción del ADN plasmídico. Se emplearon dos protocolos: el de extracción Miniprep PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification de Invitrogen™ y el protocolo de extracción de plásmido basado en lisis alcalina propuesto por International Genetically Engineered Machine (iGEM), basado en Sambrook, et al., (1989).

Figura 4

## Protocolo de extracción de ADN plasmídico



*Nota.* Elaborado con Biorender.

En el protocolo iGEM se realizaron modificaciones específicas para mejorar los rendimientos en la extracción y obtener concentraciones más altas con una mayor pureza del ADN. Por ejemplo de acuerdo al Anexo 2, en el paso 2, se incrementó el tiempo a 2 minutos, y en el paso 11, se incubó toda la noche a -80 °C para mejor precipitación del ADN plasmídico. Finalmente, el ADN se resuspendió en 30 uL de agua libre de nucleasas. Se cuantificó el ADN para conocer la pureza y la concentración mediante espectrofotometría UV-Vis, utilizando el equipo Thermo Scientific™ µDrop Plate. Se colocaron 2 µL de ADN plasmídico extraído en cada pocillo del equipo y 2 µL de agua libre de nucleasas como blanco, que sirvió como buffer de elución. La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis horizontal en gel al 1.5% con un voltaje de 80 V por 40 minutos utilizando SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™) y se visualizó mediante transiluminador (Owl™ EasyCast™ B1-BP Electrophoresis Systems).

### Condiciones de PCR para el plásmido de *E. coli*

Antes de iniciar la PCR, se realizaron las diluciones necesarias del ADN plasmídico cuantificado para alcanzar una concentración de 60 ng/μL. Los primers, previamente fueron reconstituidos con agua libre de nucleasa siguiendo las instrucciones de MacroGen (2023).

**Tabla 2**

*Componentes de PCR para amplificar 1533 pb*

<b>Componente</b>	<b>Volumen (μL)</b>
2X BlasTaq PCR Master Mix	12,5
Cas.Forward (10 μM)	1
Bac.Reverse (10 μM)	1
Dimetilsulfóxido (5%)	1
Plantilla ADN plasmidico (60 ng)	1
Agua Libre de Nucleasa	8,5
Volumen Total	25

*Nota.* Los componentes Cas. Forward y Bac. Reverse son los primers (oligos) que fueron sintetizados por MacroGen

**Tabla 3**

*Componentes de PCR para amplificar 1167 pb*

<b>Componente</b>	<b>Volumen (μL)</b>
2X BlasTaq PCR Master Mix	12,5
Cas.Forward (10 μM)	1
L2.2.Reverse (10 μM)	1
Dimetilsulfóxido (5%)	1,5
Plantilla ADN plasmidico (80 ng)	1



Agua Libre de Nucleasa	8
Volumen Total	25

*Nota.* Los componentes Cas. Forward y L2.2 Reverse son los primers (oligos).

Para realizar la PCR, después de preparar todos los componentes en un tubo de PCR (0.2 mL) se coloca en el termociclador las siguientes condiciones:

#### **Tabla 4**

*Condiciones de PCR para amplificar 1533 pb*

<b>Etapas de la PCR</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Duración</b>	<b>Ciclos de PCR</b>
Desnaturalización Inicial	95 °C	4 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	
Hibridación	T <sub>m</sub> -5°C	15 segundos	35
Extensión	72 °C	30 segundos	
Extensión final	72 °C	1 minuto	1

*Nota.* Se presentan las condiciones de PCR convencional conforme al Kit 2X BlasTaq™ PCR (abm, 2016). "T<sub>m</sub>" se refiere a la temperatura de melting de los primers.

Para amplificar 1167 pb se trabaja con las mismas condiciones, solo que se ajusta la temperatura de hibridación, debido que los primers tienen otras temperaturas. Una vez completado el proceso en el termociclador, se obtienen los amplicones. La visualización del tamaño para cada amplicón se lleva a cabo mediante electroforesis en gel al 1.5% a 90 V durante 40 minutos, utilizando el marcador molecular 100 bp Opti.DNA Marker (abm, 2019).

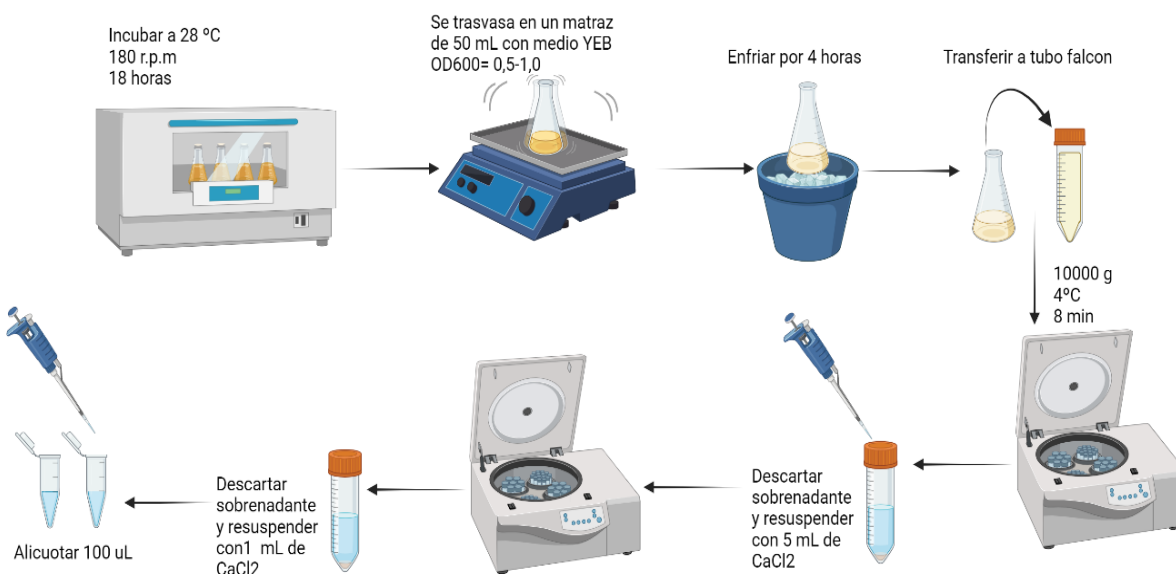
#### **Células competentes de *A. tumefaciens* para choque térmico**

Para preparar células quimiocompetentes, se inició inoculando 2 mL de medio líquido YEB con Kanamicina a una concentración de 0,05 mg/mL para la cepa de *A. tumefaciens* (AGL1), y se cultivaron durante la noche con agitación a 25-28°C (Chang et al., 2017). Posteriormente, se extrajeron 2 mL del medio YEB sembrado el día previo para inocular un

matraz conteniendo 50 mL de medio YEB líquido sin antibiótico, y se incubó hasta que las células alcanzaron un OD600 entre 0,5 y 1,0. El medio se enfrió en hielo durante aproximadamente 4 horas, y luego se transfirió a tubos Falcon estériles de 50 mL, los cuales se centrifugaron a 4°C durante 8 minutos a 10,000 g. Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células con 5 mL de CaCl<sub>2</sub> a una concentración de 20 mM frío. Luego, se repite la centrifugación y se descarta el sobrenadante. Después, se resuspenden las células en 1 mL de 20 mM de CaCl<sub>2</sub> frío y se alíquotan 100–150 µL de la solución celular en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Se almacenan los tubos a -80°C para uso futuro (Wyrzykowska et al., 2016).

### Figura 5

#### Protocolo para células quiocompetentes



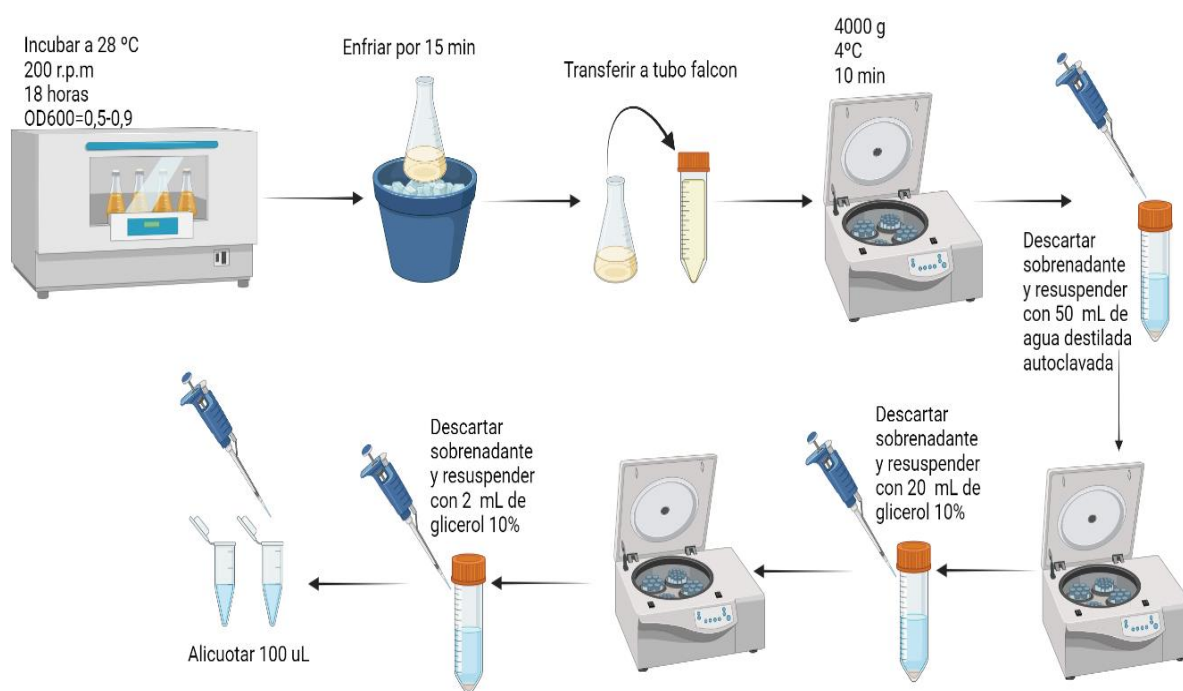
#### Células competentes de *A. tumefaciens* para electroporación

Para preparar células electrocompetentes, se toma una colonia de *A. tumefaciens* AGL1 se añade a 20 ml de medio LB en un matraz Erlenmeyer de 100 ml y se deja crecer durante la noche en un agitador giratorio a 28 °C y 200 rpm (McCormac et al., 1998). Se controla el crecimiento hasta que el OD600 alcance un valor de 0,5 a 0,9. Luego, se enfría el matraz en

hielo durante 15 minutos y se centrifuga a 4000 x g durante 10 minutos a 4 °C para obtener un pellet de células. El sedimento se lava dos veces con 100 ml de agua destilada autoclavada fría y se centrifuga a 4000 xg durante 10 minutos a 4°C. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en 20 ml de glicerol frío al 10%. Se centrifuga a 4000 xg durante 10 minutos a 4°C; se retira y desecha el sobrenadante. Finalmente, se resuspenden las células en un volumen final de 2 ml de glicerol frío al 10% (Kámán-Tóth et al., 2018).

## Figura 6

### Protocolo para células electrocompetentes



*Nota.* Elaborado en Biorender

### Choque térmico

La transformación bacteriana de *A. tumefaciens* se realizó siguiendo los procedimientos detallados en los protocolos de Wise et al. (2006) y Wyrzykowska et al. (2016). Se emplearon 3 tubos Eppendorf que contenían células químicamente competentes, los cuales se descongelaron durante 20 minutos. Una vez descongeladas, se añadieron 3 y 5 µl de ADN a

diferentes tubos que contenían 100 µl de células competentes, mientras que en el tercer tubo se agregó agua como control negativo. Se efectuó un movimiento de "flicking" en cada tubo para facilitar la resuspensión de los microorganismos.

Luego, las células se colocaron a -20°C durante 5 minutos y se transfirieron a -80°C durante 10 minutos. Posteriormente, se llevaron a un baño María con una temperatura de 40°C durante 8 minutos.

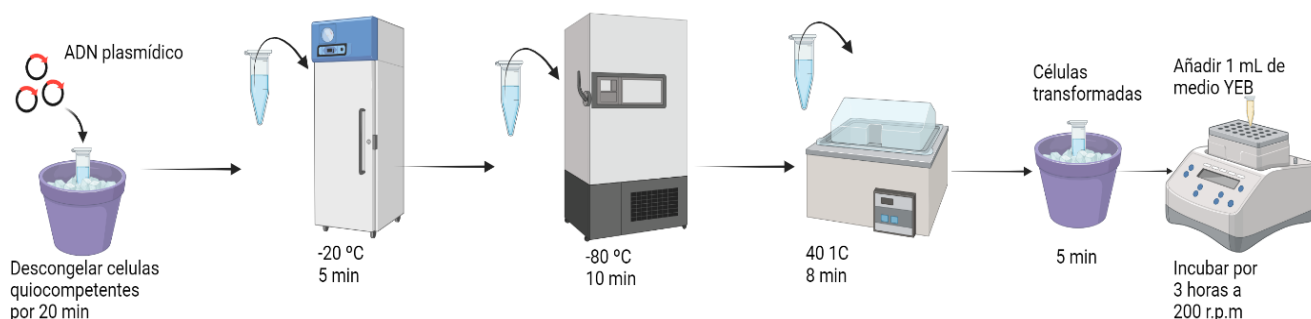
Las muestras se incubaron durante 5 minutos en hielo y luego se añadió 1 ml de medio YEB líquido. Se incubaron durante 3 horas y 30 minutos con una agitación de 200 rpm a temperatura ambiente.

Después de la incubación, se centrifugó la muestra a 13000 r.p.m durante 2 minutos y se resuspendieron en 1 ml de cultivo YEB líquido con antibiótico de selección, en este caso, tetraciclina a 1.5 µg/ml.

Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 100 µl de la cuarta dilución ( $10^{-4}$ ) en placas con medio YEB suplementado con tetraciclina a 10 µg/ml.

## Figura 7

### *Protocolo par transformación bacteriana por choque térmico*



Se realiza la siembra de las bacterias transformadas y un control negativo, donde no debe existir crecimiento. Se contaron las colonias obtenidas en las cajas Petri con bacterias transformadas. Posteriormente, se calculó la eficiencia de transformación siguiendo la fórmula de Liu et al. (2018):

$$\text{Eficiencia de Transformación (TE)} = \frac{\#UFC \text{ (Unidades Formadoras de Colonias)}}{\text{DNA sembrado en la caja } (\mu\text{g})}$$

$$\#UFC = \frac{\#Colonias \text{ Transformadas} \times \text{Tasa Dilución} \times \text{Volumen de transformación } (\mu\text{L})}{\text{Volumen sembrado } (\mu\text{L})}$$

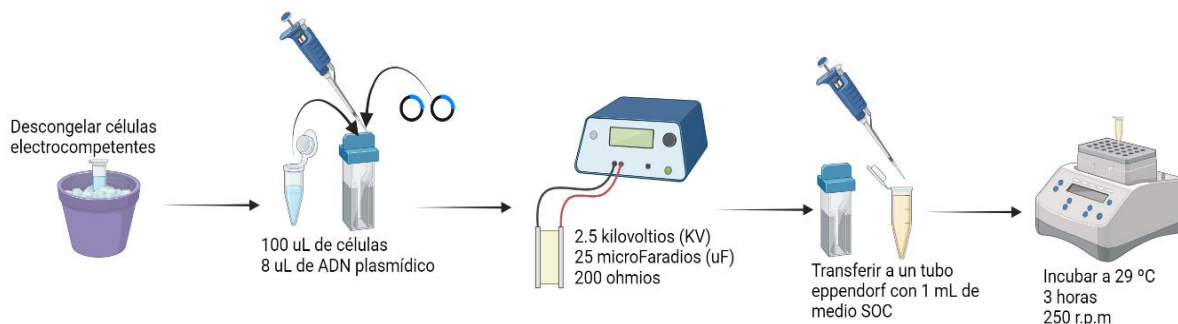
$$\text{DNA Sembrado en la Caja } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Volumen Sembrado } (\mu\text{L}) \times \text{DNA Plasmídico } (\mu\text{g})}{\text{Volumen de Transformación } (\mu\text{L})}$$

## Electroporación

La electroporación se llevó a cabo en los laboratorios de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (BIO-RAD, 2024). Se utilizaron dos tipos de celdas de electroporación, una con tamaño de 0,2 cm y otra de 0,4 cm.

En la celda de 0,2 cm, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de células competentes y luego se añadieron 8  $\mu\text{L}$  a una concentración de 100 ng de ADN plasmídico que es el vector binario pAGM4723 (addgene, 2024). La celda se introdujo en el electroporador con las siguientes condiciones: 2.5 kilovoltios (KV) de voltaje, 25 microFaradios ( $\mu\text{F}$ ) de capacitancia, 200 ohmios de resistencia y el tiempo se ajustó automáticamente por el equipo. La electroporación se realizó durante aproximadamente 5 milisegundos (ms). Posteriormente, el medio de la cubeta electroporada se transfirió a 1 mL de medio SOC y se incubó a 29°C en un termobloque a 250 rpm durante 3 horas. Pasado este tiempo, se sembraron las células en placas con medio sólido LB suplementado con tetraciclina a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Nagel et al., 1990).

En la celda de 0,4 cm, se colocaron 150  $\mu\text{L}$  de células competentes y se añadieron 8  $\mu\text{L}$  de ADN plasmídico a una concentración de 150 ng/ $\mu\text{L}$ . La celda se introdujo en el electroporador con las siguientes condiciones: 3 kilovoltios (KV) de voltaje, 25 microFaradios ( $\mu\text{F}$ ) de capacitancia y 300 ohmios de resistencia. La electroporación se llevó a cabo durante aproximadamente 9.9 milisegundos (ms). Posteriormente, el medio de la cubeta electroporada se transfirió a medio SOC y se incubó a 28°C en un termobloque a 250 rpm durante 3 horas. Después de este período, se sembraron las células en placas con medio sólido LB suplementado con tetraciclina a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (McCormac et al., 1998).

**Figura 8****Protocolo par transformación bacteriana por electroporación**

*Nota.* Elaborado en Biorender.

**Extracción de ADN genómico de banano Cavendish**

Se realizó la extracción de ADN genómico conforme al protocolo de IDgen (Anexo 3), con algunas modificaciones. Por ejemplo, en el paso A, se incluyó una etapa de lavado con agua corriente del material vegetal de 100 mg (hoja de banano joven) para eliminar impurezas. Luego, el explante se sumergió en una solución de 500 mL de hipoclorito de sodio al 1%, con la adición de 3 gotas de Tween-20, durante 10 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo un lavado con agua destilada dos veces y, finalmente, con agua estéril autoclavada durante 5 minutos (Jadán et al., 2016). La muestra se colocó junto a un mortero en la ultracogeladora durante 18 horas. En el paso C, se añadieron 5 uL de proteinasa K; luego, se continuó con el protocolo según IDgen y se cuantificó el ADN utilizando un equipo MultiScan para determinar las purezas y concentraciones del ADN genómico.

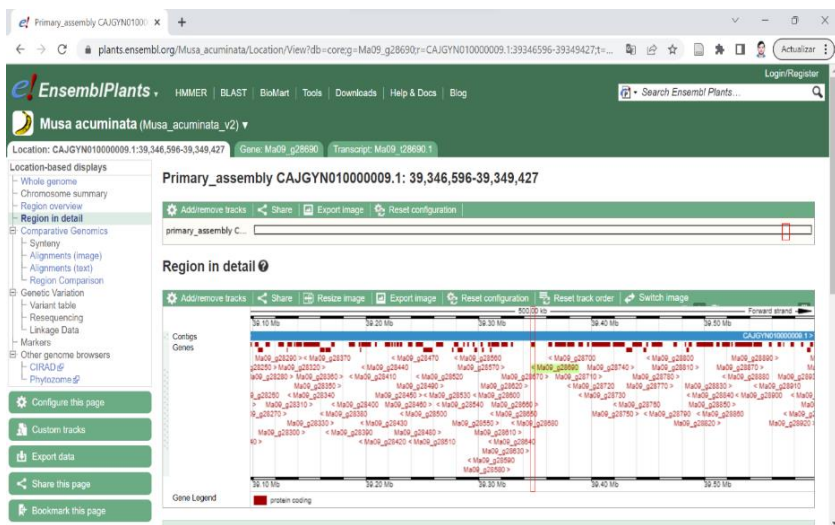
**Diseño de primers para identificar la región promotora RPM1 en el banano**

El programa bioinformático Ensembl constituye una base de datos genómica y una plataforma de anotación que ofrece información sobre los genomas de diversas especies. Para identificar la secuencia genética de RPM1 presente en el genoma de *Musa acuminata*, se descargó del cromosoma 9 (Ma09\_g28690), seleccionado por el tesista anterior. Dentro del

programa, se localizó el gen que alberga la secuencia de RPM1 (Figura 9) y posteriormente se descargaron 1000 pares de bases aguas abajo (EnsemblPlants, 2024).

**Figura 9**

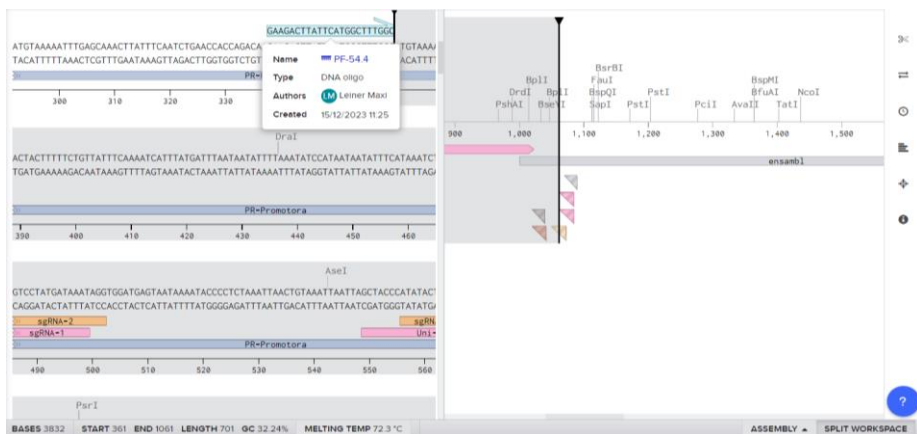
*EnsemblPlants identificación de la región Ma09\_g28690*



Luego, se cargó la secuencia en el programa Benchling con el fin de identificar las posibles regiones promotoras previamente diseñadas por el tesista anterior. Se procedió a identificar las diversas secuencias del gen RPM1 y se diseñaron los primers Forward y Reverse para amplificar 701 pb del ADN genómico del banano.

**Figura 10**

*Diseño de primers para la región promotora en el programa Benchling*



Las secuencias fueron enviadas a la empresa MacroGen para sintetizar los oligos, los cuales se utilizarán posteriormente en la PCR.

**Tabla 5**

*Primers para amplificar el fragmento de 701 pb del banano*

<b>Primers</b>	<b>Secuencia</b>	<b>GC%</b>	<b>Tm</b>	<b>Tamaño amplificar</b>
PF.RMP1	5'-GAAGACTTATTCATGGCTTTGGC-3'	43	58.1	701 pb
PR.RPM1	5'-CTTATGTCGAGCCTTGAAGGAGA-3'	48	61	

### **Crioconservación**

Se llevó a cabo la crioconservación de *A. tumefaciens* transformada utilizando glicerol. Las cepas se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar un OD de 0,7. Luego, se tomó 1,5 mL del medio con la cepa en criotubos y se centrifugaron para eliminar el medio de cultivo, ya que podría afectar las condiciones de crioconservación. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 1 mL de glicerol al 20% en un tubo. Se repitió el mismo procedimiento en otros tubos, variando el porcentaje de glicerol, que fue del 30% y 40% (Wise et al., 2006).

Después, se procedió a la crioconservación de las células utilizando DMSO como crioprotector para *A. tumefaciens* transformada. Se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar la fase exponencial con un OD de 0,7. Luego, se transfirió un volumen de 1,5 mL del medio a criotubos, se centrifugó y se resuspendió la cepa en concentraciones de DMSO del 5% en un tubo, del 10% en otro, y finalmente del 20% en un tercero.

Se realizaron triplicados de cada concentración tanto para glicerol y DMSO, se almacenaron en el ultracongelador a -80°C durante 3 meses para evaluar la viabilidad posteriormente (Tzfira & Citovsky, 2007).



## Diseño experimental

Para analizar los datos experimentales, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software GraphPad Prism™ con un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0,05$ ). El objetivo fue determinar la eficiencia óptima de transformación mediante dos métodos: choque térmico y electroporación.

Además, se implementó otro diseño experimental para evaluar la viabilidad celular de *A. tumefaciens* transformadas a diferentes concentraciones de crioconservantes.

*tumefaciens* transformadas a diferentes concentraciones de crioconservantes.

Se emplearon los modelos estadísticos A y B para determinar si la hipótesis sería nula o alternativa. Se realizaron diversas pruebas estadísticas, incluyendo el test de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad, la prueba de Levene para analizar la homogeneidad de varianzas, además de la exploración de supuestos mediante histogramas y gráficos Q-Q plot.

- **Modelo estadístico A**

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

$Y_{ij}$  = Eficiencia de transformación de *A. tumefaciens* por diferente método de transformación.

$\mu$  = Media de la eficiencia de transformación calculada en AGL1

$c_i$  = Efecto de la i-enésima cepa de AGL1

$\epsilon_{ij}$  = Error experimental asociado a la j-enésima unidad experimental

- **Tratamientos**

T1: *A. tumefaciens* AGL1 en cubeta de electroporación de 0.2 cm

T2: *A. tumefaciens* AGL1 en cubeta de electroporación de 0.4 cm

T3: *A. tumefaciens* AGL1 para choque térmico con 3uL ADN plasmídico

T4: *A. tumefaciens* AGL1 para choque térmico con 5uL ADN plasmídico

- **Unidades experimentales**

Se llevaron a cabo tres repeticiones para cada uno de los tratamientos, obteniendo un total de 12 unidades experimentales. Cada unidad experimental concierne a una caja Petri que contenía aproximadamente 20 mL de agar LB donde fueron sembradas células transformadas de *A. tumefaciens* que contienen el ADN plasmídico.

- **Variables e indicadores**

- a. Variable Dependiente: Colonias de *A. tumefaciens* transformadas eficazmente
- b. Variable Independiente: Método de transformación

- **Hipótesis**

- a. **Nula:**  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

No existe diferencia significativa en la medida de la eficiencia de la transformación bacteriana

- b. **Alternativa:**  $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$

Existe diferencia significativa en la eficiencia de la transformación en la cepa de *A. tumefaciens*

- **Modelo estadístico B**

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

$Y_{ij}$  = Eficiencia de crioconservación de *A. tumefaciens* para diferentes crioconservantes con diferentes concentraciones

$\mu$  = Media de la eficiencia de conservación calculada en AGL1

$c_i$  = Efecto de la i-enésima cepa de AGL1

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental asociado a la j-enésima unidad experimental

- **Tratamientos**

T1: *A. tumefaciens* AGL1 con glicerol al 20%.

T2: *A. tumefaciens* AGL1 con glicerol al 30%.

T3: *A. tumefaciens* AGL1 con glicerol al 40%.

T4: *A. tumefaciens* AGL1 con DMSO al 5%.

T5: *A. tumefaciens* AGL1 con DMSO al 10 %

T6: *A. tumefaciens* AGL1 con DMSO al 20 %

- **Unidades experimentales**

Se llevaron a cabo tres repeticiones para cada uno de los tratamientos, lo que resultó en un conjunto total de 18 unidades experimentales. Cada una de estas unidades experimentales concierne a una caja Petri que contenía aproximadamente 20 mL de agar LB donde fueron sembradas las células criconservadas de *A. tumefaciens* transformadas que contenían el ADN plasmídico.

- **Variables e indicadores**

- a. Variable Dependiente: Colonias viables de *A. tumefaciens* transformadas tras la conservación.
- b. Variable Independiente: Cantidad del agente crioprotector.

- **Hipótesis**

- a. **Nula:**  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

No existe diferencia significativa en la medida de la conservación de bacterias transformadas.

- b. **Alternativa:**  $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$

Existe diferencia significativa con la conservación del agente crioprotector en la cepa de *A. tumefaciens*

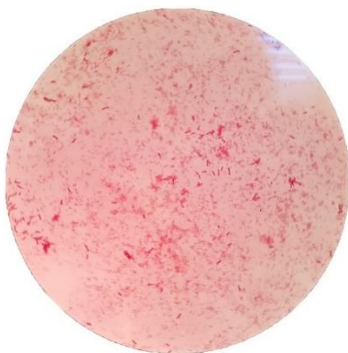
## Capítulo IV: Resultado

### Identificación molecular de *A. tumefaciens* AGL1

Se sembró *A. tumefaciens* y se comprobó mediante pruebas bioquímicas y microbiológicas, dado que estaba conservada en glicerol por 5 años.

#### Figura 11

*Bacteria Gram-negativa*



*Nota.* Se observaron bacterias gram-negativas

Las pruebas realizadas nos permitieron identificar el grupo al que pertenecía la cepa para precisar la especie bacteriana, se realizaron pruebas moleculares. La PCR 16S, dirigida al gen específico 16S ARNr (ARN ribosomal), que es una región altamente conservada del ADN bacteriano (Costechareyre et al., 2010). El amplicón resultante fue secuenciado y su secuencia fue analizada mediante un BLAST para confirmar que se trataba de *A. tumefaciens*.

#### Figura 12

*Se analizó la secuencia utilizando la herramienta BLAST*

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Agrobacterium sp. CGMCC 11546 chromosome 2, complete sequence</a>	<a href="#">Agrobacterium sp. CGMC...</a>	1290	2580	100%	0.0	100.00%	1926885	<a href="#">gij1860276756 CP047388.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Agrobacterium sp. CGMCC 11546 chromosome 1, complete sequence</a>	<a href="#">Agrobacterium sp. CGMC...</a>	1290	2580	100%	0.0	100.00%	3036316	<a href="#">gij1860273785 CP047387.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Agrobacterium fabrum strain BG-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Agrobacterium fabrum</a>	1290	1290	100%	0.0	100.00%	1061	<a href="#">gij1853540996 MT605454.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Agrobacterium fabrum strain cosD1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Agrobacterium fabrum</a>	1290	1290	100%	0.0	100.00%	1429	<a href="#">gij1784143441 MN626531.1</a>

*Nota.* La secuencia cargada en la base de datos resultó ser de *A. tumefaciens*.

### Extracción de ADN plasmídico del vector binario pAGM4723 en *E. coli* JM109

El protocolo de extracción plasmídica que proporciona un mayor rendimiento de material genético, con purezas dentro del rango óptimo, es el de lisis alcalina propuesto por iGEM™. En la Tabla 6 se presentan los valores de concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) y pureza obtenidos mediante la cuantificación con el equipo Thermo Scientific™  $\mu\text{Drop Plate}$ . Las concentraciones bajas, inferiores a  $40 \mu\text{g/mL}$ , y las purezas inferiores a 1 indican contaminación por fenoles, alcoholes, ARN o proteínas, obtenidas mediante el kit de extracción Miniprep PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification. En contraste, el protocolo de iGEM™ proporcionó concentraciones superiores a  $800 \mu\text{g/mL}$  y purezas dentro del rango óptimo.

**Tabla 6**

*Cuantificación de ADN plasmídico*

Fecha	Protocolo	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/230)
18/09/2023	Miniprep	15	1,12	0,91
	PureLink	5	0,83	1,12
19/09/2023	Miniprep	18	0,54	0,93
	PureLink	10	0,75	1,14
22/09/2023	Miniprep	40	1,47	0,75
	PureLink	25	1,22	0,87
		18	0,43	0,82
		16	0,7	1,12
12/10/2023	iGEM™	3042	1,11	1,13
		3276	1,26	1,13
		3462	1,31	1,19
16/10/2023	iGEM™	2593	2,01	1,85

		1059	1,94	1,66
		1516	1,93	1,80
		961,4	1,920	1,719
23/10/2023	iGEM™	1580	1,82	1,74
		1360	1,93	1,88
		3150	2,04	1,96
		2543	1,62	1,71
23/10/2023	iGEM™	3100	1,98	1,32
		2567	1,98	1,55
		1800	1,83	1,69
		1954	1,73	1,99
		2543	1,86	1,89

---

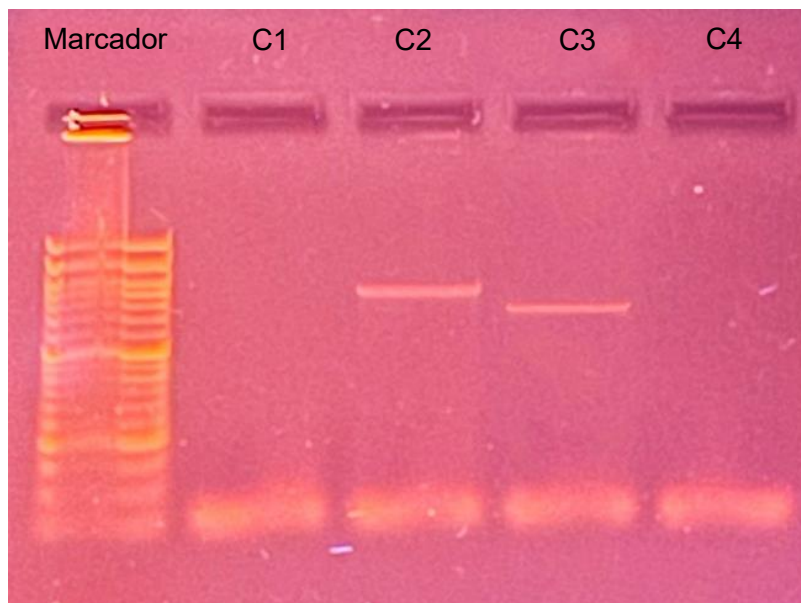
*Nota.* Los datos fueron tomados con el equipo Thermo Scientific™  $\mu$ Drop Plate, en el anexo 4 se puede evidenciar los valores obtenidos

Los plásmidos con las mejores purezas se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realizar posteriormente la PCR, lo que nos permitirá determinar el tamaño que fue diseñado *in silico*.

#### Validación del tamaño por **PCR**

Para validar el tamaño adecuado de los plásmidos ensamblados, se selecciona un plásmido con una concentración de  $1360\ \mu\text{g/mL}$ , según se indica en la tabla 6. Posteriormente, se lleva a cabo una dilución hasta alcanzar una concentración de  $65\ \text{ng/mL}$  en un tubo específico, con el fin de realizar la PCR que amplificará un segmento de  $1533\ \text{pb}$  y otra que amplificará  $1167\ \text{pb}$ .

Con el propósito de determinar el tamaño preciso del amplicón, se procede a correr la muestra en un gel de agarosa al  $1,5\ \%$  durante 40 minutos, utilizando un marcador molecular de  $100\text{bp}$  Opti-DNA Marker.

**Figura 13***Confirmación del tamaño del plásmido*

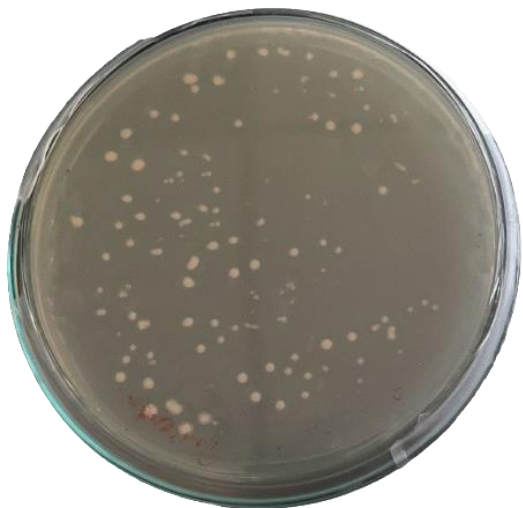
*Nota.* En el gel de electroforesis, el carril 1 (C1) y carril 4 (C4) representa un control negativo, mientras que el carril 2 (C2) corresponde a un tamaño de 1000 pb y el carril 3 (C3) corresponde a un tamaño de 800 pb.

**Siembra de *A. tumefaciens* transformadas por choque térmico**

Después de someter las células a una transformación por choque térmico y permitir su recuperación durante 3 horas en incubación, se sembraron en placas con medio YEB. Las placas se incubaron durante 24 horas para observar el crecimiento de colonias con una concentración de tetraciclina de 5 µg/ml. Se observó crecimiento en todas las muestras tratadas, excepto en el control negativo donde se realizó la transformación con agua estéril en lugar de ADN plasmídico. Este resultado se debe a que *A. tumefaciens* no es resistente a la tetraciclina; por lo tanto, solo lograron crecer las células que habían adquirido el plásmido de resistencia a dicho antibiótico.

**Figura 14**

*Siembra de células transformadas con un total de 98 UFC*



*Nota. Resultado de la transformación por choque térmico con 100 uL de células competentes y 3 uL de ADN plasmídico a una concentración de 100 ng/mL*

**Figura 15**

*Siembra de células transformadas con un total de 175 UFC*





*Nota.* Resultado de la transformación por *choque térmico* con 100  $\mu\text{L}$  de células competentes y 5  $\mu\text{L}$  de ADN plasmídico a una concentración de 100 ng/mL

### **Figura 16**

*Siembra del control negativo*



*Nota.* Resultado de la transformación por *choque térmico* con 100  $\mu\text{L}$  de células competentes y agua destilada, donde no hubo crecimiento de colonias

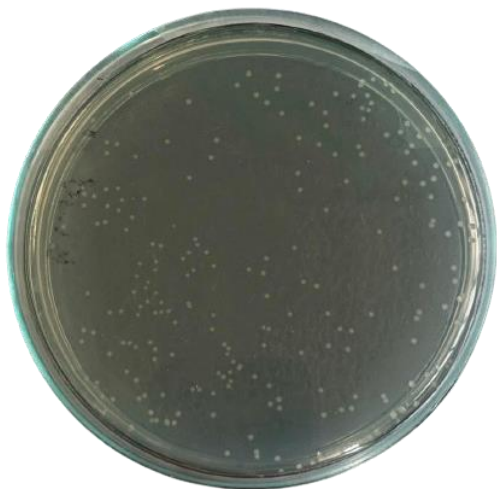
### **Siembra de *A. tumefaciens* transformadas por electroporación**

Las células fueron transformadas por electroporación y se les permitió recuperarse durante 3 horas en incubación con 1 mL de medio SOC. Tanto las muestras sometidas a la cubeta de electroporación de 0,2 cm como las de 0,4 cm fueron tratadas de esta manera. Después de este período, se sembraron 40  $\mu\text{L}$  del medio SOC diluido cinco veces ( $10^{-5}$ ) en placas con medio LB sólido conteniendo tetraciclina a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Se observó crecimiento de colonias en todas las muestras electroporadas que fueron tratadas con diferentes tamaños de cubeta, excepto en el control negativo donde se realizó la electroporación con agua estéril en

lugar de ADN plasmídico. Este resultado se atribuye a que *A. tumefaciens* no es resistente a la tetraciclina, por lo tanto, solo lograron crecer las células que habían adquirido el plásmido de resistencia.

**Figura 17**

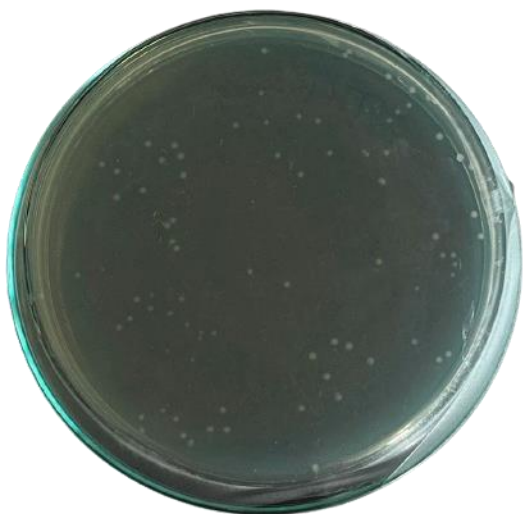
*Siembra de células transformadas con un total de 138 UFC*



*Nota.* Resultado de la transformación por electroporación con cubeta de 0,2 cm

**Figura 18**

*Siembra de células transformadas con un total de 78 UFC*



*Nota.* Resultado de la transformación por electroporación con cubeta de 0,4 cm

### PCR del *A. tumefaciens* AGL1 transformada con el vector binario pAGM4723

Se selecciona una única colonia que creció en medio con tetraciclina a una concentración de 10 µg/mL. Esta colonia se inocula en 5 mL de medio líquido LB y se incuba durante 24 horas para permitir que las células se multipliquen. Posteriormente, se extrae el plásmido de estas células siguiendo el protocolo de iGEM™.

#### Tabla 7

*Cuantificación de ADN plasmídico de A. tumefaciens transformada*

Fecha	Protocolo	Concentración (µg/mL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/230)
04/12/2023	iGEM™	600	1,18	1,16
		200	0,73	0,86
		350	1,24	1,16
06/12/2023	iGEM™	1250	2,01	1,85
		2400	1,94	1,66
		2156	1,93	1,80
		2318	1,92	1,71

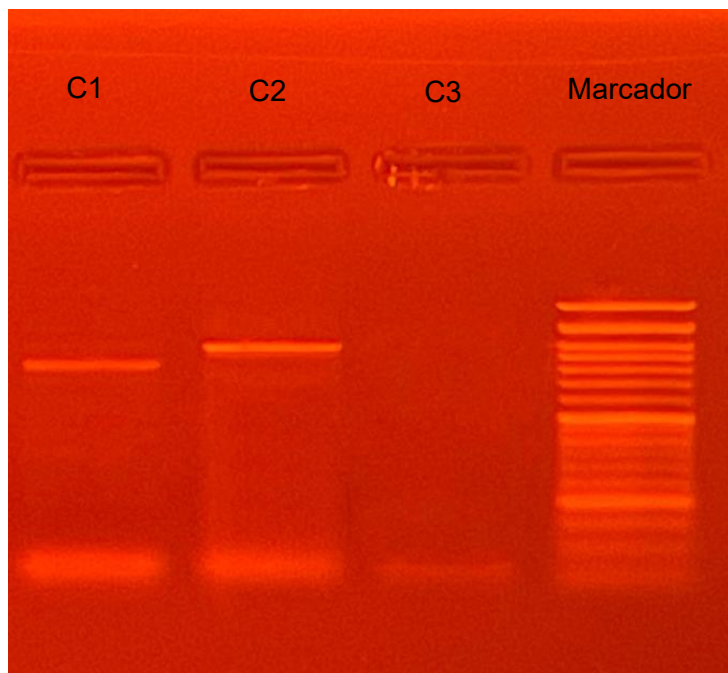
*Nota.* Los datos fueron tomados con el equipo Thermo Scientific™ µDrop Plate

Acorde a la tabla 7, se selecciona el tubo que contiene una concentración de 1250 µg/mL y se diluye hasta alcanzar una concentración de 65 µg/mL para llevar a cabo la PCR, siguiendo las condiciones descritas en las tablas 2 y 3. Con la finalidad de verificar que los amplicones tengan el mismo tamaño, según se muestra en la figura 13, para así confirmar que el plásmido efectivamente ingresó en *A. tumefaciens*.

Con el propósito de determinar el tamaño preciso del amplicón, se procede a correr la muestra en un gel de agarosa al 1,5 % durante 40 minutos, utilizando un marcador molecular de 100bp Opti-DNA Marker.

**Figura 19**

*Confirmación del tamaño del plásmido en A. tumefaciens*



*Nota.* En el gel de electroforesis, el C1 corresponde al tamaño de 800 pb, el C2 a un tamaño de 1000 pb y el C3 representa el control negativo.

**Extracción de ADN genómico de Cavendish**

La extracción de ADN genómico se realizó conforme al protocolo de IDgen (Anexo 3) , pero se implementaron algunas modificaciones necesarias (Wilson, 2001). Estas adaptaciones fueron indispensables debido a las purezas iniciales muy bajas, originadas por contaminantes presentes en la muestra, lo que podría haber afectado la calidad de la PCR. En la tabla 8 se detallan los valores de concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y pureza obtenidos mediante la cuantificación con el equipo Thermo Scientific™  $\mu\text{Drop Plate}$ .

**Tabla 8***Cuantificación de ADN genómico Banano Cavendish*

<b>Fecha</b>	<b>Protocolo</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Pureza (A260/A280)</b>	<b>Pureza (A260/230)</b>
08/12/2024	IDgen	360	1,18	0,92
		130	1,43	0,86
		410	1,36	0,74
		30	0,82	0,93
10/01/2024	IDgen	1220	1,53	1,12
		1234	1,66	1,45
		960	1,43	1,32
		843	1,23	1,12
15/12/2024	IDgen	2134	1,96	1,72
		1784	1,94	1,59
		1954	1,93	1,67
		2165	1,92	1,78

**PCR para identificar la región promotora del gen RPM1 en el banano**

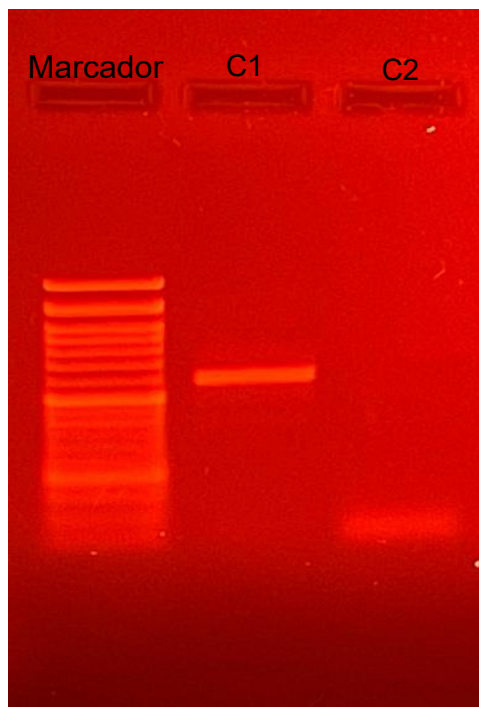
De acuerdo con los resultados de la tabla 8, se seleccionó el tubo que presentaba una concentración de 2134  $\mu\text{g/mL}$  y se diluyó hasta alcanzar una concentración de 95  $\mu\text{g/mL}$  para realizar la PCR.

Se determinó el tamaño del fragmento de 701 pb que fue previamente amplificado *in silico*, y en este caso, la PCR amplificó el mismo fragmento para el cual fue diseñada.

Posteriormente, la muestra se sometió a electroforesis en gel al 2 % durante 35 minutos, utilizando un marcador molecular de 100bp Opti-DNA Marker.

**Figura 20**

*Presencia de la región promotora del gen RPM1, en el germoplasma de banano*



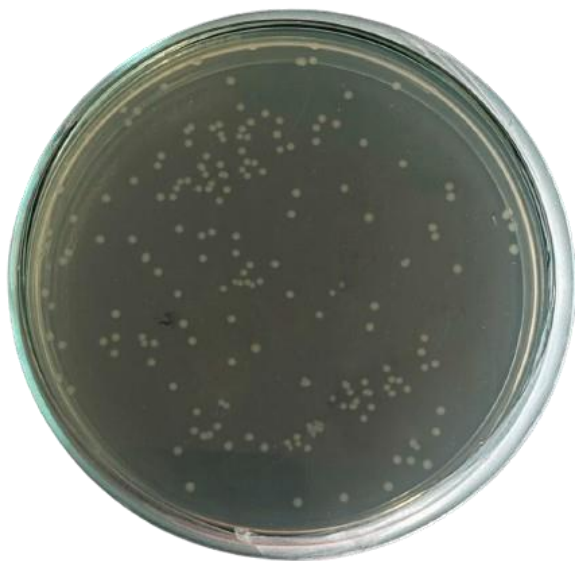
*Nota.* Para visualizar las bandas de ADN, se realiza mediante el equipo UV transiluminador, donde el C1 corresponde al tamaño de 701 pb, el C2 representa el control negativo (blanco).

**Crioconservación con glicerol**

Después de la crioconservación de la cepa de *A. tumefaciens* transformada durante un período de 2 meses con glicerol como crioprotector, en concentraciones del 20%, 30% y 40%, se llevó a cabo la siembra en placas para evaluar su viabilidad celular en diferentes concentraciones. Se realizaron diluciones seriadas a partir del criotubo con glicerol para obtener colonias y facilitar el recuento. Esta técnica se empleó debido a que sembrar directamente cualquier volumen del criotubo dificultaría un recuento preciso de colonias debido al crecimiento masivo. El factor de dilución para la siembra en medio LB fue de seis ( $10^{-6}$ ), y se consideró un recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) significativo dentro del rango de 30 a 300 colonias.

**Figura 21**

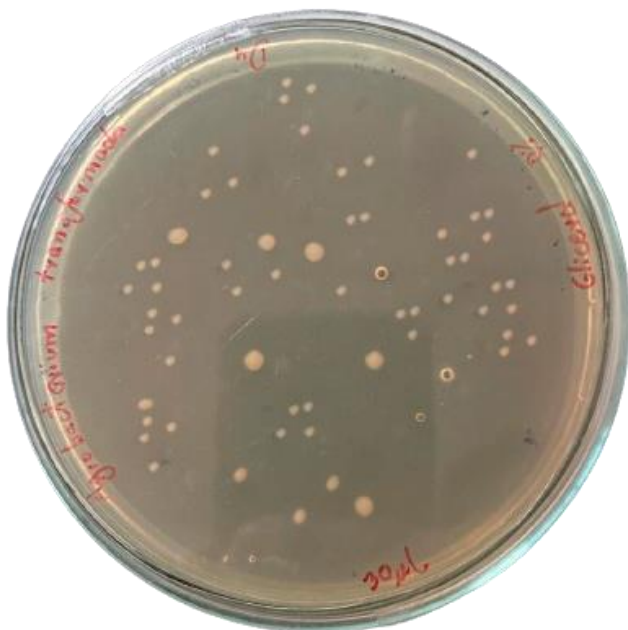
*Siembra de Agrobacterium criconservada con glicerol 20 %*



*Nota.* En el conteo bacteriano en placa fue de 264 UFC

**Figura 22**

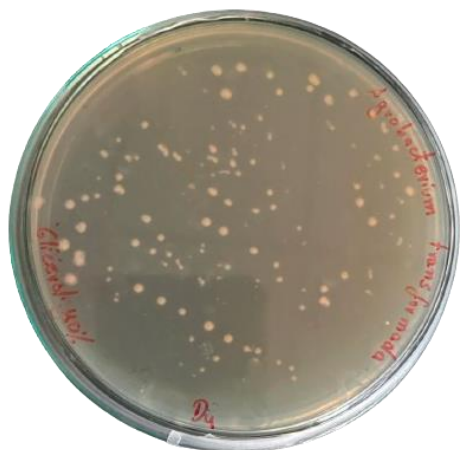
*Siembra de Agrobacterium criconservada con glicerol 30 %*



*Nota.* En el conteo bacteriano en placa fue de 58 UFC

**Figura 23**

*Siembra de Agrobacterium criconservada con glicerol 40 %*



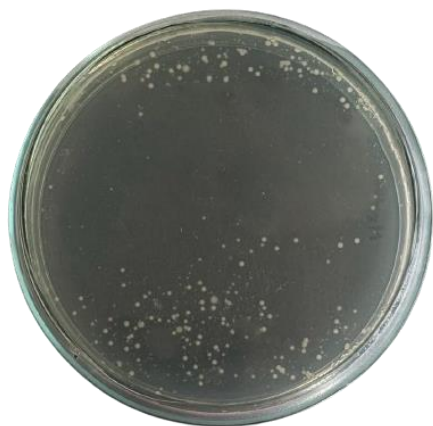
*Nota.* En el conteo bacteriano en placa fue de 108 UFC

**Crioconservación con DMSO**

El *A. tumefaciens* transformado se crioconservó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 meses, utilizando DMSO en concentraciones del 5%, 10% y 20%. Después de este período, se realizaron diluciones seriadas con un factor de  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en los criotubos de cada concentración para facilitar el recuento de las colonias.

**Figura 24**

*Siembra de Agrobacterium criconservada con DMSO 5 %*

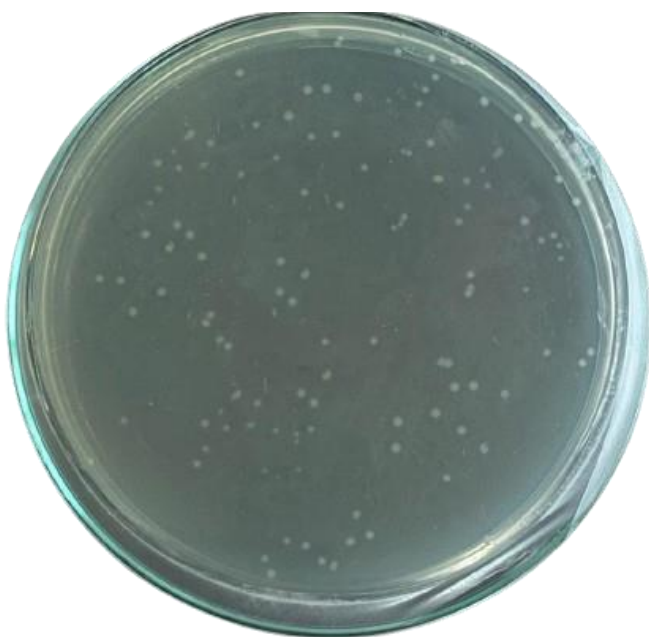




*Nota.* En el conteo bacteriano en placa fue de 57 UFC

### **Figura 25**

*Siembra de Agrobacterium criconservada con DMSO 10 %*



*Nota.* En el conteo bacteriano en placa fue de 165 UFC

### **Eficiencia de transformación (ET)**

El cálculo de la eficiencia de transformación para *A. tumefaciens* mediante los métodos de choque térmico y electroporación se basa en los siguientes parámetros:

- Tasa de Dilución=  $10^{-5}$
- Volumen de Siembra para 0.2 cm= 30 uL
- Volumen de Siembra para 0.4 cm= 40 uL
- Volumen de Transformación= 128 uL
- ADN Sembrado = 100 ug

**Tabla 9***Número de colonias transformadas por Electroporación*

<b>Tamaño de cubeta de electroporación</b>	<b>Réplica</b>	<b>Nº Colonias</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>TE (UFC ug)</b>
0.2 cm	1	102	43520000	1.85x10 <sup>6</sup>
	2	138	58880000	2.51x10 <sup>6</sup>
	3	135	57600000	2.46x10 <sup>6</sup>
0,4 cm	1	65	20800000	6.6x10 <sup>5</sup>
	2	78	24960000	7.9x10 <sup>5</sup>
	3	96	30720000	9.8x10 <sup>5</sup>

*Nota.* Se calcularon para un volumen de 1 mL

- Tasa de Dilución= 10<sup>-4</sup>
- Volumen de Siembra = 40 uL
- Volumen de Transformación= 103 uL y 105 uL
- ADN Sembrado = 100 ug

**Tabla 10***Número de colonias transformadas por choque térmico*

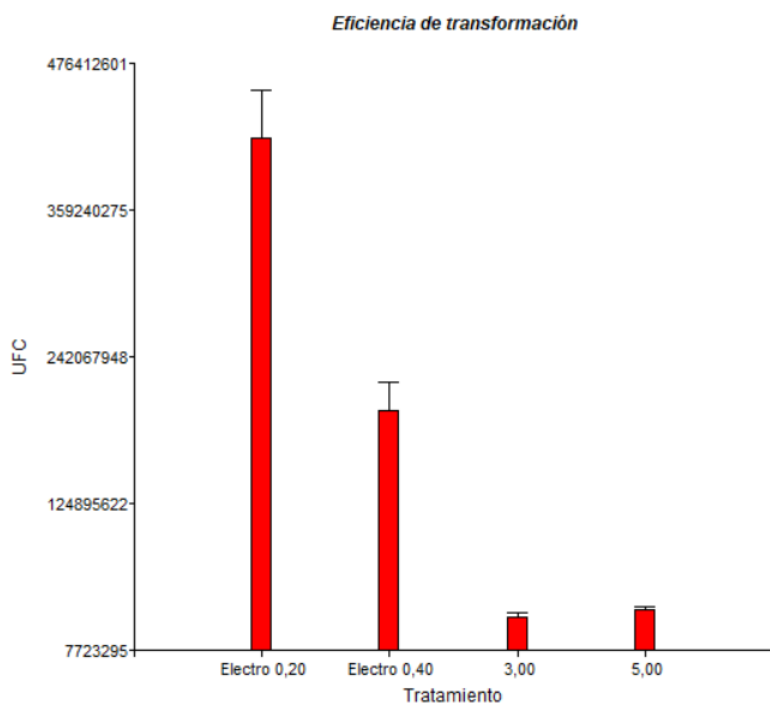
<b>Volumen de ADN plasmídico</b>	<b>Réplica</b>	<b>Nº Colonias</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>TE (UFC ug)</b>
3 uL	1	98	2523500	6.4x10 <sup>4</sup>
	2	150	3862500	9.9x10 <sup>4</sup>
	3	155	3991250	1.02x10 <sup>4</sup>
5 uL	1	175	4593750	1.2x10 <sup>5</sup>

2	138	3622500	$9.5 \times 10^4$
3	164	4305000	$1.1 \times 10^5$

*Nota.* Se calcularon para un volumen de 1 mL

## Figura 26

*Eficiencia de transformación de los 4 tratamientos*



El gráfico de barras revela las diferencias significativas entre los tratamientos, demostrando que la mayor eficiencia de transformación se logra mediante el tratamiento de electroporación utilizando la celda de electroporación de tamaño 0,2 cm.

### **Eficiencia de conservación**

El cálculo de la eficiencia de crioconservación para *A. tumefaciens* transformada mediante crioconservantes como glicerol y DMSO se basa en las siguientes tablas:

**Tabla 11***Número de colonias conservadas por glicerol*

<b>Concentración</b>	<b>Réplica</b>	<b>Nº</b>	<b>UFC</b>
<b>Colonias</b>			
20 %	1	285	9500000000
	2	47	1550000000
	3	264	8800000000
30 %	1	288	9600000000
	2	180	6000000000
	3	51	1680000000
40 %	1	108	3600000000
	2	84	2800000000
	3	105	3500000000

*Nota.* Volumen de siembra en placa es 0,03 uL con una dilución de  $10^{-6}$

**Tabla 12***Número de colonias conservadas por DMSO*

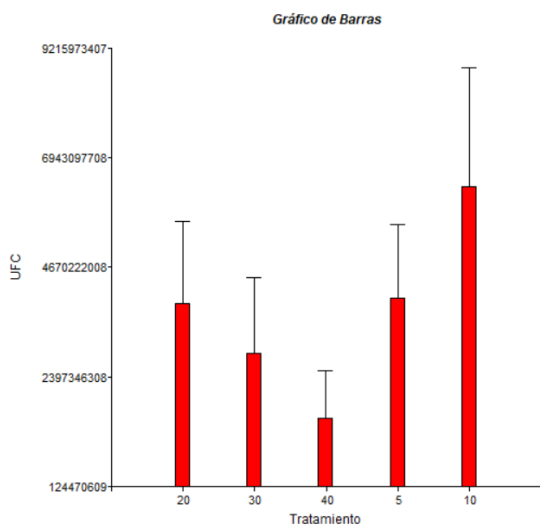
<b>Concentración</b>	<b>Réplica</b>	<b>Nº</b>	<b>UFC</b>
<b>Colonias</b>			
5 %	1	57	190000000
	2	45	150000000
	3	39	150000000
10%	1	288	960000000
	2	197	656000000
	3	165	550000000

20%	1	36	120000000
	2	57	190000000
	3	63	210000000

*Nota.* Volumen de siembra en placa es 0,03 uL con una dilución de  $10^{-5}$

## Figura 27

### Eficiencia de conservación de los 6 tratamientos



## Diseño experimental

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas en la eficiencia de transformación entre los distintos métodos de transformación bacteriana, con un nivel de significancia establecido en 0,05. Los resultados obtenidos fueron corroborados mediante una prueba de Tukey, que revela diferencias significativas entre los tratamientos.

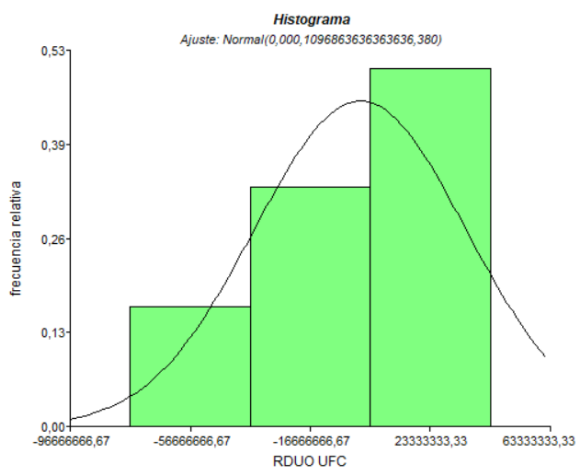
Al observar las medias de las eficiencias de transformación mediante un gráfico de barras (figura 26), se aprecia claramente que *A. tumefaciens* fue más eficiente en la transformación por electroporación utilizando una celda de 0,2 cm. Esto sugiere que las condiciones del electroporador fueron óptimas para la transformación bacteriana, lo que influyó en su mayor capacidad para aceptar y expresar el material genético transformado.

## Modelo estadístico A

Antes de llevar a cabo una prueba de Varianza y Tukey, es crucial verificar los supuestos para asegurarnos de que contamos con datos válidos y representativos. Esto implica examinar la distribución de los datos mediante histogramas, Q-Q plots y la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de la muestra. Estas herramientas nos permiten confirmar si nuestros datos se ajustan a una distribución normal.

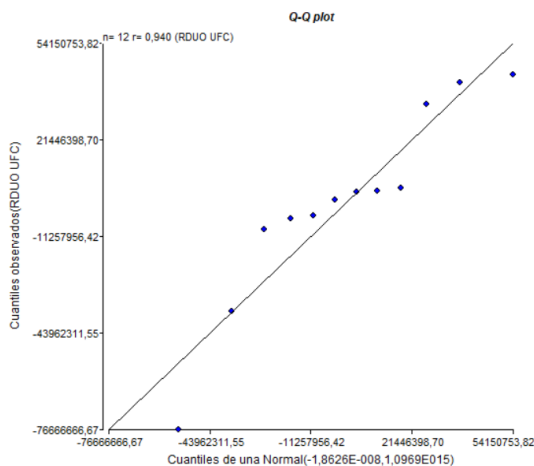
### Figura 28

#### Pruebas no formales de la normalidad



### Figura 29

#### Gráfico del supuesto de normalidad



### Figura 30

#### Prueba de Shapiro Wilks

##### Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO UFC	12	-1,9E-08	33118931,69	0,90	0,2696

### Figura 31

#### Prueba de Leven

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS UFC	12	0,70	0,59	69,37

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4413601851851850,00	3	1471200617283950,00	6,33	0,0166
Tratamiento	4413601851851850,00	3	1471200617283950,00	6,33	0,0166
Error	1858555555555560,00	8	232319444444445,00		
Total	6272157407407410,00	11			

La prueba de Levene nos ayuda a determinar qué tipo de hipótesis se selecciona, ya que un valor de p menor a 0,05 indica que la diferencia entre las varianzas es significativa. Con un valor de p de 0,0166, se acepta la hipótesis alternativa y se descarta la nula, es decir que existe diferencia significativa en la eficiencia de la transformación en la cepa de *A. tumefaciens*.

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
UFC	12	0,96	0,95	22,54

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	291746104166667000,00	3	97248701388888900,00	64,48	<0,0001
Tratamiento	291746104166667000,00	3	97248701388888900,00	64,48	<0,0001
Error	1206550000000000,00	8	1508187500000000,00		
Total	303811604166667000,00	11			

##### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=101543261,19155

Error: 1508187500000001,0000 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
3,00	33583333,33	3	22421622,75 A
5,00	39750000,00	3	22421622,75 A
0,40	19916666,67	3	22421622,75 B
0,20	41666666,67	3	22421622,75 C

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

## Modelo estadístico B

Figura 32

Pruebas no formales de la normalidad

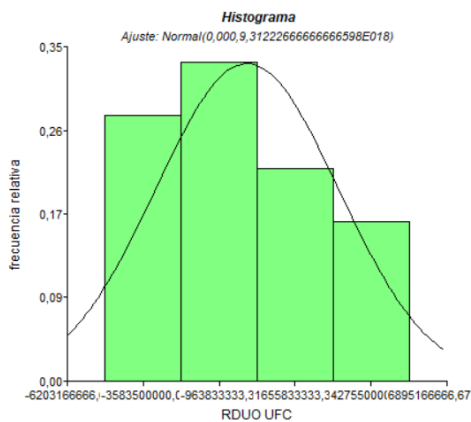


Figura 33

Gráfico del supuesto de normalidad

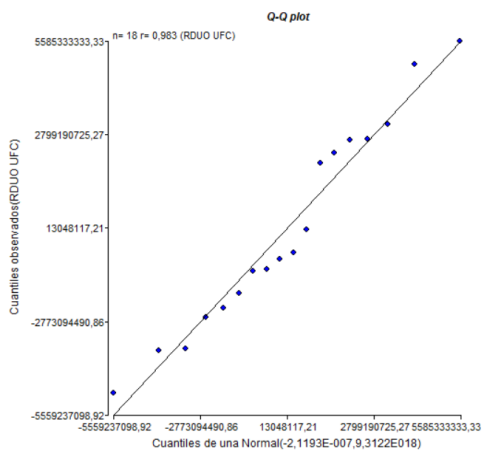


Figura 34

Prueba de Shapiro Wilks

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO UFC	18	-2,1E-07	3051594118,93	0,93	0,3968



**Figura 35***Prueba de Leven***Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS UFC	18	0,35	0,15	54,65

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,38548456296296E19	4	3,46371140740741E18	1,76	0,1977
Tratamiento	1,38548456296296E19	4	3,46371140740741E18	1,76	0,1977
Error	2,56264797037037E19	13	1,97126766951567E18		
Total	3,94813253333333E19	17			

La prueba de Levene con un valor de p de 0,1977 siendo mayor a 0,05; se acepta la hipótesis nula y se descarta la alternativa, es decir que no existe diferencia significativa entre los métodos de crioconservación para *A. tumefacies* transformada.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
UFC	18	0,19	0,00	92,55

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,77283671111111E19	4	9,43209177777778E18	0,77	0,5610
Tratamiento	3,77283671111111E19	4	9,43209177777778E18	0,77	0,5610
Error	1,58307853333333E20	13	1,21775271794872E19		
Total	1,96036220444444E20	17			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8511061340,64566**

Error: 1,21775271794871808E0019 gl: 13

Tratamiento	Medias	n	E.E.
40	1533333333,33	3	2014739617,54 A
30	2880000000,00	3	2014739617,54 A
20	3914666666,67	6	1424636045,89 A
5	4026666666,67	3	2014739617,54 A
10	6353333333,33	3	2014739617,54 A

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

## Capítulo V: Discusión

La cepa de *A. tumefaciens* es una bacteria natural que infecta a las plantas y transfiere ADN a las células vegetales (Spiegel et al., 2019). En el caso de la transformación bacteriana de *A. tumefaciens* que ha sido crioconservado, es crucial evaluar su viabilidad y estabilidad genética (Wang et al., 2016). En un estudio de Li y colaboradores (2019) mencionan que, la importancia de la viabilidad celular después de la criopreservación a largo plazo es fundamental para tener éxito en los métodos de transformación (Wise et al., 2006). Diversos estudios han demostrado que la viabilidad de bacterias criopreservadas puede variar según el método de conservación y las condiciones de almacenamiento (Popova et al., 2020). En nuestro estudio, evaluamos la viabilidad del *Agrobacterium* que había sido crioconservado durante 5 años en glicerol mediante pruebas microscópicas, bioquímicas y moleculares (Al-Karablieh et al., 2006). La realización de un BLAST de la cepa secuenciada, como se muestra en la Figura 12, confirmó que se trataba de la misma cepa, asegurando trabajar con una cepa viable y genéticamente estable.

Los protocolos de extracción de ADN plasmídico que se ocuparon fue el Kit Miniprep y Aislamiento de plásmido de ADN mediante el método de lisis alcalina obtenido de IGEM para obtener muestras de alta calidad y pureza. La eficacia de un protocolo de extracción de ADN plasmídico puede verse afectada por varios aspectos, como el método de lisis celular, la liberación del ADN plasmídico y la eliminación de contaminantes (Williams et al., 2009). El kit Miniprep se basa en un protocolo estandarizado, los resultados no eran idóneos debido a la posible presencia de contaminantes en los reactivos utilizados, condiciones específicas del entorno de laboratorio o reactivos con fecha caduca (Williams et al., 2015). Según Zhang et al. (2010) menciona que, los valores inferiores de 1.6 en la relación 260/280 podrían indicar la presencia de ARN y proteínas, mientras que valores inferiores a 1,7 en el índice 260/230 podrían relacionarse con la contaminación por solventes orgánicos y sales. Estos parámetros son indicadores clave de la pureza del ADN obtenido y pueden afectar significativamente la

calidad de las muestras. Durante la extracción de ADN plasmídico se optó por el método de lisis alcalina, ya que se ajusta a las recomendaciones de Zhang (2010) y demostró ser más efectivo en términos de pureza y concentración.

La bacteria *E. coli* JM109, previamente conservada con glicerol, fue sembrada en placas para llevar a cabo la extracción del plásmido nivel 2 ensamblado con el método Golden Gate (Janjua et al., 2013). Se diseñaron los primers en el programa Benchling, donde se amplificaría un fragmento de 1533 pb y otro fragmento de 1167 pb. En un estudio de Fernández (2013), establece criterios esenciales para el diseño óptimo de primers, que incluyen especificidad, longitud de 18 a 30 nucleótidos, un contenido de GC entre 40-60%, puntos de fusión ( $T_m$ ) similares entre los primers y la evitación de secuencias repetitivas. En este contexto, se diseñaron los primers forward y reverse cumpliendo con los requisitos para el diseño, con el objetivo de amplificar el fragmento de interés. Posterior a la extracción del plásmido de la cepa *E. coli*, se llevó a cabo la PCR para confirmar los tamaños de los fragmentos. Sin embargo, en la figura 13, tras la electroforesis, los resultados no coincidieron con lo esperado, ya que los fragmentos tenían un tamaño menor. Según el marcador molecular, el fragmento que debía tener 1533 pb tiene un tamaño de 1000 pb, y el fragmento de 1167 pb tenía un tamaño de 800 pb. El plásmido presente en la *E. coli* no era el esperado, lo que sugiere que en alguna etapa del ensamblaje Golden Gate, en las reacciones de corte y ligación, no se realizó correctamente la unión (Bird et al., 2022).

La transformación bacteriana permite la introducción de ADN exógeno en las células de interés (Lessard, 2013). Entre los diferentes métodos de transformación disponibles se encuentran el tratamiento químico, la electroporación, la utilización de una pistola biolística, polietilenglicol, ultrasonido, microondas e hidrogel (Singh et al., 2010). La electroporación ha demostrado ser una forma altamente eficiente, rápida y conveniente de lograr la transformación bacteriana (Tu et al., 2016; Kámán-Tóth et al., 2018).

La electroporación es un método que se aplica pulsos eléctricos breves y de alta intensidad, en el caso de *A. tumefaciens* aumenta la permeabilidad de la membrana celular y facilita la absorción de ADN (Hellens et al., 2000). En nuestro estudio, se empleó la electroporación como método de transformación bacteriana, siguiendo condiciones específicas descritas en la metodología 3.7.

Se evaluaron dos tamaños de celdas de electroporación, 0,2 cm y 0,4 cm, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Bio-rad), ajustando los parámetros como voltaje, ohmios y capacitancia para cada tipo de celda. Según un estudio de Milestone y colaboradores (2023), el rango óptimo de voltaje varía según el tipo de células y el tamaño de la celda. Voltajes superiores a 3 kV para una celda de 0,2 cm podrían resultar en daños tanto en la celda como en las muestras, dado que el rango recomendado se encuentra entre 1,8 kV y 2,5 kV. Los resultados, como se muestra en la figura 26, indicaron que la eficiencia de transformación fue significativamente mayor con la cubeta de 0,2 cm. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que sugieren que las condiciones de electroporación pueden influir en la eficiencia de transformación bacteriana (Kámán-Tóth et al., 2018). La elección del tamaño de la celda de electroporación es crucial para optimizar la eficiencia de transformación y garantizar resultados reproducibles.

El choque térmico se basa por los cambios bruscos de temperatura a las células bacterianas con el fin de permeabilizar la membrana celular y permitir la entrada del ADN exógeno (Yhiset et al., 2018). A pesar de ser una técnica económica y simple, que no demanda equipamiento costoso, presenta limitaciones en cuanto a eficacia y reproducibilidad comparada con métodos más avanzados como la electroporación (Hwang et al., 2015). Investigaciones realizadas por Rahimzadeh y sus colegas (2016) indican que la eficiencia de transformación está influenciada por varios factores, incluyendo la calidad del ADN exógeno, la fase de crecimiento celular y agentes permeabilizantes como el polietilenglicol (PEG) y el cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>).

El CaCl<sub>2</sub> se emplea para la preparación de células competentes en bacterias, a diferencia del PEG, que se utiliza en levaduras y células eucariotas (Chang, 2017). El tiempo óptimo de tratamiento con CaCl<sub>2</sub> se sitúa entre 10-20 minutos, con concentraciones de 10-100 mM (Asif et al., 2017). Estudios de Yaman y colaboradores (2014) sugieren que tiempos menores a 10 minutos o mayores a 30 minutos pueden disminuir la competencia. Además, la fase de crecimiento celular también es crucial, dado que las células en fase logarítmica son más susceptibles a la transformación que las células en fase estacionaria (Lozada, 2018). En este sentido, se prepararon células químicamente competentes cuando alcanzaron un OD de 0.7, indicando una fase exponencial completa, y fueron tratadas con CaCl<sub>2</sub> a una concentración de 20 mM. El ADN plasmídico utilizado para la transformación se mantuvo a una concentración de 100 µg/mL, asegurando la pureza y ausencia de contaminantes. De acuerdo a la figura 26, reveló que no existió diferencias significativas entre los volúmenes de ADN plasmídico integrado, ya sea 3 µL o 5 µL para transformación, dando una similitud en el número de colonias obtenidas. Sin embargo, se observó que el choque térmico fue menos efectivo que la electroporación.

Para conocer que el vector binario fue exitosa su introducción en *A. tumefaciens*, se realiza PCR (Lee & Gelvin, 2008). El vector binario pAGM4723 insertado contiene un marcador de selección, el operón cantaxantina, que permite distinguir las cepas transformadas por su color rojo, además de conferir resistencia a la Kanamicina a 50 µg/ml (Weber et al., 2011). Según Lee y Gelvin (2008), las cepas de *Agrobacterium* AGL1 es un derivado de *A. tumefaciens* C58 (Anexo 5), derivación del plásmido Ti (pTiBo542) presentando una mutación cromosómica que les confiere resistencia en niveles bajo de diversos antibióticos como la rifampicina (Lazo et al., 1991), tetraciclina (Luo & Farrand, 1999) y Kanamicina. La selección de bacterias transformadas resultó compleja, ya que la cepa AGL1 no transformada porta un vector de virulencia que le otorga resistencia a la tetraciclina a 2 µg/mL (Lee et al., 2013).

Después de cultivar las células en medio LB con tetraciclina a 10 ug/mL, se observó crecimiento bacteriano tras 30 horas, lo que sugiere que la alta concentración de antibiótico favoreció la selección de bacterias transformadas. Sin embargo, en las figuras 14 y 15, se detectaron tanto cepas transformadas como no transformadas. La resistencia parcial de *Agrobacterium* a la tetraciclina puede explicar esta coexistencia. Esto se respalda al observar el crecimiento de cepas no transformadas en el control negativo a las 48 horas, lo que concuerda con el argumento de Lee & Gelvin (2008) sobre la capacidad de *Agrobacterium* para mutar y adaptarse a la concentración del antibiótico.

Para identificar las cepas transformadas, se extrajeron los plásmidos de las colonias transformadas para la PCR. La figura 19 mostró que los fragmentos tenían los tamaños esperados; sin embargo, algunas colonias no amplificaron debido a que no se introdujo el plásmido. Además, se realizó PCR de las colonias del control negativo después de 48 horas, pero no se observó amplificación en ninguna cepa seleccionada.

La criopreservación de células y tejidos conlleva a enfriar las muestras a temperaturas extremadamente bajas para reducir el daño celular, mantener su viabilidad y funcionalidad durante el almacenamiento (Brian, 2007). Se utilizan diversos crioprotectores como el glicerol, el DMSO, el etilenglicol (EG) y el propilenglicol (PG). Según Martínez, el glicerol es el crioprotector más utilizado debido a su relativa falta de toxicidad, su capacidad para penetrar las membranas celulares y su compatibilidad con varias cepas bacterianas (Wise et al., 2006). Anežka Málková (2023) señala que, el DMSO puede ser tóxico; sin embargo, trabajar en combinación con glicerol proporciona una forma más eficaz de penetrar las células. Por otro lado, Zhang y colaboradores (2023) argumentan que el EG y el PG son crioprotectores, pero no se utilizan con frecuencia debido a su toxicidad y baja permeabilidad, lo que puede causar la formación de cristales de hielo y la muerte celular. En la criopreservación, las células deben

estar en fase de crecimiento exponencial, con un OD entre 0.4 y 0.8, para lograr una conservación exitosa (Wise et al., 2006). En nuestro estudio, realizamos la criopreservación con glicerol y DMSO, con un OD de 0.7 durante un período de 2 meses. Luego de este tiempo, se sembraron en placas con LB para evaluar su viabilidad. La figura 27 muestra que no hay diferencias significativas al usar diferentes crioprotectores en diferentes concentraciones, aunque el glicerol resulta estadísticamente superior al DMSO.

La extracción de ADN genómico del banano para la identificación de la región promotora puede ser afectada por varios factores, como la variedad de banano, el estado de maduración de los tejidos y la eficacia de la lisis celular (Omara & Barugahare, 2022). En nuestro estudio, implementamos el protocolo de biología molecular propuesto por Wilson (2001) para la preparación de ADN genómico. Este protocolo, sugiere que la mayoría de los procedimientos para la preparación de ADN genómico involucran una etapa de lisis celular, seguida por la incubación con una proteasa inespecífica. Además de seguir este protocolo estándar, añadimos un paso adicional que consistió en la incorporación de proteinasa K para mejorar la eficiencia de la lisis celular. La proteinasa K, una enzima proteolítica, degrada las proteínas presentes en la muestra, facilitando la liberación del ADN y mejorando las concentraciones y purzas del ADN genómico (Sheng et al., 2015). En estudios previos, Li et al. (2019) también resaltaron la importancia de una lisis celular eficiente en la extracción de ADN de plantas, empleando la adición de proteinasa K y observando mejoras en las concentraciones y purzas del ADN extraído. En contraste, Chen et al. (2018) sugirieron que la variedad de banano y el estado de maduración de los tejidos pueden influir en la calidad del ADN extraído, encontrando que los tejidos menos maduros producían ADN de mayor calidad y cantidad. En la tabla 8 de nuestro estudio, se observan concentraciones y purzas de ADN genómico de banano óptimas, en línea con las recomendaciones de los autores mencionados anteriormente.

Se diseñaron primers para la identificación y amplificación de la región promotora RMP1 en el banano Cavendish. Se utiliza la secuencia de la especie *Musa Acuminata* descargada de Ensembl y luego la cargamos en el programa Benchling para identificar la región promotora RPM1 con ID 103978139 del cromosoma 9 y diseñar los primers para amplificar un fragmento de 701 pb en el banano. Los resultados, como se muestra en la figura 20, demostraron que el fragmento amplificado coincidía con el tamaño esperado, lo que indica una exitosa amplificación de la región promotora RMP1 en el banano Cavendish.



## Capítulo VI: Conclusiones

La transformación de *A. tumefaciens* con el plásmido que alberga el sistema CRISPR-Cas9 tuvo éxito mediante dos métodos de transformación: electroporación y choque térmico. Los resultados indican que la electroporación es el método más eficiente en términos de la tasa de transformación. A pesar de ser un proceso más rápido, es importante destacar que la electroporación puede resultar costosa debido al limitado acceso a celdas de electroporación y a los equipos especializados requeridos.

El método de choque térmico es un proceso de transformación más lento, pero también fue capaz de lograr insertar el plásmido en *Agrobacterium*. Se obtuvo menor eficiencia de transformación en comparación con la electroporación, sin embargo, el choque térmico sigue siendo una alternativa válida, especialmente en entornos donde los recursos técnicos y financieros pueden ser limitados.

Se confirmó la presencia de la región promotora del gen RPM1 en el germoplasma de banana Cavendish. Tras el proceso de extracción de ADN genómico, se llevó a cabo la PCR, resultando en la amplificación exitosa del fragmento previamente diseñado in silico de 701 pb. La observación a través del gel y el equipo transiluminador reveló que las muestras poseían el tamaño esperado del fragmento amplificado.

Se desarrolló un protocolo óptimo para la conservación de *Agrobacterium* transformada utilizando glicerol y DMSO. Los resultados indican que las diferentes concentraciones de glicerol no afectan significativamente la viabilidad ni la capacidad de conservación. Sin embargo, se observó una disminución en la eficiencia de la conservación con DMSO, lo que se reflejó en la obtención de menores colonias. Por tanto, se establece un protocolo estándar que simplifica la manipulación y el almacenamiento a largo plazo de cepas bacterianas.

## Capítulo VII: Recomendaciones

Secuenciar el plásmido pAGM4723 que se encuentra dentro de la *E. coli* para identificar específicamente qué partes faltan o qué modificaciones no se han introducido durante el proceso de ensamblaje Golden Gate. Este análisis detallado habría permitido identificar los puntos de fallo sea en el nivel 1 o 2 para así optimizar el protocolo de ensamblaje para futuros experimentos, mejorando así la eficiencia y precisión del proceso de transformación.

Se debe trabajar con tejidos jóvenes durante el proceso de extracción de ADN genómico en banano, ya que se observó que en plantas maduras no se obtenían buenas concentraciones de ADN genómico. Esto asegurará una mejor calidad y cantidad de ADN extraído.

Secuenciar el plásmido insertado en el *A. tumefaciens* luego del proceso de transformación bacteriana.

Se sugiere considerar la optimización de los protocolos de transformación bacteriana mediante la exploración de diversas variables como los tiempos, la utilización de diferentes agentes que permeabilicen la membrana y la variación en las concentraciones de ADN.

## Capítulo VIII: Bibliografía

- abm. (2016). *BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix - Fast and Reliable Taq qPCR Master Mix* | Applied Biological Materials Inc. Abmgood.com. <https://www.abmgood.com/blastaq-2x-qpcr-mastermix.html>
- abm. (2019). 100bp Opti-DNA Marker | Applied Biological Materials Inc. Abmgood.com. <https://www.abmgood.com/100bp-opti-dna-marker-g016.html>
- addgene. (2024). *Addgene: pAGM4723*. Addgene.org. <https://www.addgene.org/48015/>
- Álvarez-Fernández, R. (2013a). Chapter One - Explanatory Chapter: PCR Primer Design. En J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 1-21). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00001-X>
- Al-Karablieh, N., Khlaif, H., & Al-Banna, L. (2006). *Identification of Agrobacterium tumefaciens Strains by PCR-RFLP Analysis of the 16S-rDNA*. ResearchGate; unknown. [https://www.researchgate.net/publication/265266305\\_Identification\\_of\\_Agrobacterium\\_tumefaciens\\_Strains\\_by\\_PCR-RFLP\\_Analysis\\_of\\_the\\_16S-rDNA](https://www.researchgate.net/publication/265266305_Identification_of_Agrobacterium_tumefaciens_Strains_by_PCR-RFLP_Analysis_of_the_16S-rDNA)
- Aminedi, R., Wadhwa, G., Das, N., & Pal, B. (2013). Shape-dependent bactericidal activity of TiO<sub>2</sub> for the killing of Gram-negative bacteria *Agrobacterium tumefaciens* under UV torch irradiation. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(9), 6521–6530. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1717-7>
- Anežka Málková, Filipp Georgijevič Savvulidi, Ptáček, M., Karolína Machová, Janošíková, M., Nagy, S., & Luděk Stádník. (2023). Glycerol-Free Equilibration with the Addition of Glycerol Shortly before the Freezing Procedure: A Perspective Strategy for Cryopreservation of Wallachian Ram Sperm. *Animals*, 13(7), 1200–1200. <https://doi.org/10.3390/ani13071200>
- Arie, T. (2019). Fusarium diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *Journal of Pesticide Science*, 275-281. <https://doi.org/10.1584/jpestics.J19-03>

- Bancroft, J. (1876). *Report of the Board Appointed to Enquire into the Cause of Disease Affecting Livestock and Plants. Queensland, 1876. Votes and Proceedings, 3, 1011-1038.*  
- References - Scientific Research Publishing. Scirp.org.  
<https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1426304>
- BIO-RAD. (2024). *Gene Pulser Xcell Electroporation Systems*. Bio-Rad Laboratories.  
<https://www.bio-rad.com/es-ec/product/gene-pulser-xcell-electroporation-systems?ID=b1a35eb3-d55c-47b3-aaf3-95e4d1d85848>
- Bird, J. E., Marles-Wright, J., & Giachino, A. (2022). A User's Guide to Golden Gate Cloning Methods and Standards. *ACS Synthetic Biology*, 11(11), 3551–3563.  
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00355>
- Brian. (2007). Cryopreservation of Plant Cell Suspensions. *Methods in Molecular Biology*, 153–161. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_11)
- Chang, A., Chau, V., & Landas, J. (2017). *Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation. 1.* <https://static.igem.org/mediawiki/2018/d/d2/T--NYMU-Taipei--protocol-competent-cell.pdf>
- Cheng, H.-R., & Jiang, N. (2006). Extremely Rapid Extraction of DNA from Bacteria and Yeasts. *Biotechnology Letters*, 28(1), 55–59. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4688-z>
- Chetty, V. J., Ceballos, N., Garcia, D., Narváez-Vásquez, J., Lopez, W., & Orozco-Cárdenas, M. L. (2013). Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Reports*, 32(2), 239–247. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1358-1>
- Churchill, A. C. (2011). "Mycosphaerella fijiensis, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control." *Molecular plant pathology* 12(4): 307-328.
- Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., Mclver, K. S., Hagman, K. E., C. Mark Ott, Nickerson, C. A., & Schurr, M. J. (2008). Skim milk enhances the preservation of thawed

-80 °C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 135–138.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.006>

Costechareyre, D., Rhouma, A., Céline Lavire, Portier, P., Chapulliot, D., Franck Bertolla, Boubaker, A., Yves Dessaux, & Nesme, X. (2010). Rapid and Efficient Identification of *Agrobacterium* Species by *recA* Allele Analysis. *Microbial Ecology*, 60(4), 862–872.

<https://doi.org/10.1007/s00248-010-9685-7>

Cruz-Mendivil A, Rivera-Lopez J, German-Baez LJ, Lopez-Meyer M, Hernandez-Verdugo S, Lopez-Valenzuela JA, Reyes-Moreno C, Valdez-Ortiz A (2011) A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of Tomato cv. Micro-Tom from leaf explants. *Hort Sci* 46:1660–1665

Dan Y, Yan H, Munyikwa T, Dong J, Zhang J, Armstrong CL (2006) Micro-Tom—a high-throughput model transformation system for functional genomics. *Plant Cell Rep* 25:432–441. doi: 10.1007/s00299-005-0084-3

Díaz, S. (2005). Transformación genética en trigo común (*Triticum aestivum* L.) y triticale (xTriticosecale Wittmack) mediante biolística y *Agrobacterium tumefaciens*. *Dialnet*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/dctes?info=link&codigo=1576&orden=0>

Dempsey, C. (2022, February 17). *Exports of Ecuador Bananas Set to Leap*. Biz Latin Hub. <https://www.bizlatinhub.com/exports-ecuador-bananas/>

Dita, M., Staver, C., Mizubuti, E., Heck, D., & Barquero, M. (2018). Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>

EnsemblPlants. (2024). *Ma09\_g28690 - Search results for “Ma09\_g28690” - Oryza\_sativa - Ensembl Genomes 58*. Ensembl.org.

[https://plants.ensembl.org/Multi/Search/Results?species=all;idx=;q=Ma09\\_g28690;site=ensemblunit](https://plants.ensembl.org/Multi/Search/Results?species=all;idx=;q=Ma09_g28690;site=ensemblunit)

- Fourie, G., Steenkamp, E., Gordon, T., & Viljoen, A. (2009). *Evolutionary Relationships among the Fusarium oxysporum f. sp. cubense Vegetative Compatibility Groups | Applied and Environmental Microbiology*. Applied and Environmental Microbiology.  
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.00370-09>
- García-Bastidas, F., Ordóñez, N., Konkol, J., Al-Qasim, M., Naser, Z., Abdelwali, M., et al. (2014). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 associated with Panama disease of banana outside Southeast Asia. *Plant Dis. Notes*. 98:694. doi: 10.1094/PDIS-09-13-0954-PDN
- Gohlke, J., & Deeken, R. (2014). *Sci-Hub | Plant responses to Agrobacterium tumefaciens and crown gall development. Frontiers in Plant Science, 5 | 10.3389/fpls.2014.00155*. Sci-Hub.se. <https://sci-hub.se/https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00155/full>
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., & Mansfield, J. (2001). The *RPM1* plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal*, 23(4), 441–450. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00804.x>
- Hellens, R., Mullineaux, P., & Klee, H. (2000). Technical Focus: A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10), 446–451. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01740-4](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01740-4)
- Hwang, H., Liu, Y., Huang, S., Tung, C., Huang, F., Tsai, Y., Cheng, T., & Lai, E. (2015). *Overexpression of the HspL Promotes Agrobacterium tumefaciens Virulence in Arabidopsis Under Heat Shock Conditions | Phytopathology®*. *Phytopathology®*.  
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-05-14-0133-R>
- Jadán, M., Basantez, K., Gómez, R., & Bermúdez, I. (2016). *Establecimiento in vitro de brotes de Vasconcellea x helbornii (Badillo) Badillo*. *Ibp.co.cu*.  
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/rt/printFriendly/511/html>

- Janjua, S., Younis, S., Deeba, F., & Naqvi, S. (2013). Study on the electro-transformation conditions of improving transformation efficiency for *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 55(1), 9–14. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2012.03249.x>
- Jyothishwaran, G., Kotresha, D., Selvaraj, T., Srideshikan, S., Rajvanshi, P., & Jayabaskaran, C. (2007). A modified freeze–thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* on JSTOR. Jstor.org. <https://www.jstor.org/stable/24099118>
- Kámán-Tóth, E., Miklós Pogány, Titanilla Dankó, Ágnes Szatmári, & Zoltán Bozsó. (2018). A simplified and efficient *Agrobacterium tumefaciens* electroporation method. 3 *Biotech*, 8(3). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1171-9>
- Kotnik, T., Kramar, P., Gorazd Pucihar, Damijan Miklavčič, & Mounir Tarek. (2012). Cell membrane electroporation- Part 1: The phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 28(5), 14–23. <https://doi.org/10.1109/mei.2012.6268438>
- Kotnik, T., & Weaver, J. C. (2016). Abiotic Gene Transfer: Rare or Rampant? *The Journal of Membrane Biology*, 249(5), 623–631. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9897-y>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2019). Electroporation. *CSH Protocols*, 2019(7), pdb.top096271–pdb.top096271. <https://doi.org/10.1101/pdb.top096271>
- Lazo, G. R., Stein, P. A., & Ludwig, R. A. (1991). A DNA Transformation–Competent *Arabidopsis* Genomic Library in *Agrobacterium*. *Bio/Technology*, 9(10), 963–967. <https://doi.org/10.1038/nbt1091-963>
- Lee, S., Su, G., Lasserre, E., & Murai, N. (2013). Tetracycline-Based Binary Ti Vectors pLSU with Efficient Cloning by the Gateway Technology for *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Higher Plants. *American Journal of Plant Sciences*, 04(07), 1418–1426. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.47173>
- Lee, L.-Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325–332. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113001>

- Lessard, J. C. (2013). Transformation of *E. coli* Via Electroporation. *Methods in Enzymology*, 321–327. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00027-6>
- Li, Y., Zhang, X., Wang, X., Zhao, Y., & Gong, Y. (2019). Effects of cryopreservation on cell viability, cell membrane integrity, and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology*, 19(1), 1-8.
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, 25(1), 1234–1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Lozada Cruz, M. P. (2018). Mejoramiento genético de *Solanum tuberosum* mediante edición de genomas (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.).
- Luo, Z.-Q., & Farrand, S. K. (1999, February). *Cloning and Characterization of a Tetracycline Resistance Determinant Present in Agrobacterium tumefaciens C58*. ResearchGate; American Society for Microbiology. [https://www.researchgate.net/publication/13405695\\_Cloning\\_and\\_Characterization\\_of\\_a\\_Tetracycline\\_Resistance\\_Determinant\\_Present\\_in\\_Agrobacterium\\_tumefaciens\\_C58](https://www.researchgate.net/publication/13405695_Cloning_and_Characterization_of_a_Tetracycline_Resistance_Determinant_Present_in_Agrobacterium_tumefaciens_C58)
- Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A. y Dangl, J. L. (2002). Rin4 interactúa con *Pseudomonas syringae* moléculas efectoras de tipo III y es necesario para la resistencia mediada por RPM1 en *Arabidopsis*. 108, 743–754. *Celular*
- macrogen. (2023). *마크로젠*. Macrogen.com. <https://www.macrogen.com/en/business/research/oligo>
- Matthysse, A. G. (2006). The Genus *Agrobacterium*. *Springer EBooks*, 91–114. [https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1\\_5](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_5)
- Meijerink, M., Scheffer, H., & Narayanan, G. (2018). Irreversible Electroporation in Clinical Practice. *SpringerLink*. <https://doi.org/10.1007-978-3-319-55113-5>



- Meldrum RA, Fraser-Smith S, Tran-Nguyen LTT, Daly AM, Aitken EAB. Presence of putative pathogenicity genes in isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Australia. *Australas Plant Path.* 2012; 41: 551–557.
- Merdekawati, F., Manurung, J., & Nurhayati, B. (2023). Temperature and Time Optimization of pGEM-T Plasmid Transformation in *Escherichia coli* JM109. *Gaceta Médica de Caracas*, 131(4S). [http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_gmc/article/view/27109](http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_gmc/article/view/27109)
- Marck Millipore. (2007). *Gram Staining for Bacteriology | IVD/OEM Materials and Reagents | Merck*. Merckmillipore.com. <https://www.merckmillipore.com/INTL/en/products/ivd-oem-materials-reagents/microscopy/bacteriology/gram-bacteria-staining/GWCb.qB.DegAAAFAWuhkiQpx.nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>
- McCormac, A. C., Elliott, M. C., & Chen, D. F. (1998). A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. *Molecular Biotechnology*, 9(2), 155–159. <https://doi.org/10.1007/bf02760816>
- Milestone, W., Hu, Q., Garner, A. L., & Joshi, R. P. (2023). Sinusoidal RF simulations for optimized electroporation protocols. *Journal of Applied Physics*, 133(17). <https://doi.org/10.1063/5.0149241>
- Moorlag, S., Coolen, J., Bosch, B., & Jin, E. (2023). *Targeting the 16S rRNA Gene by Reverse Complement PCR Next-Generation Sequencing: Specific and Sensitive Detection and Identification of Microbes Directly in Clinical Samples | Microbiology Spectrum*. Microbiology Spectrum. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.04483-22>
- Mostert, D., Molina, A. B., Daniells, J., Fourie, G., Catur Hermanto, Chao, C.-P., E.G. Fabregar, V.G.O. Sinohin, N.H. Nik Masdek, R Thangavelu, Li, C., Yi, G., Mostert, L., & Viljoen, A. (2017). The distribution and host range of the banana Fusarium wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, in Asia. *PLOS ONE*, 12(7), e0181630–e0181630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181630>

- 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>
- Nelson, S. (2013). *Plant Disease Bacterial Wilt of Edible Ginger in Hawai'i*. <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-99.pdf>
- Omara, D., & Barugahare, B. (2022). Protocol Optimization of DNA Extraction from Banana Fruits. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 1–5. <https://doi.org/10.9734/jabb/2022/v25i430274>
- Ozyigit, I. I. (2020). Gene transfer to plants by electroporation: methods and applications. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 3195–3210. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05343-4>
- Patel, M., Dewey, R. E., & Qu, R. (2013). Enhancing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency of perennial ryegrass and rice using heat and high maltose treatments during bacterial infection. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 114(1), 19–29. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0301-7>
- Pegg, K., Coates, L., O'Neill, W., & Turner, D. (2019). The Epidemiology of Fusarium Wilt of Banana. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01395>
- Pérez, L., Dita, M., & Martinez, E. (2014, May). *Technical Manual Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama Disease) of banana caused by Fusarium...* ResearchGate; unknown. [https://www.researchgate.net/publication/273632807\\_Technical\\_Manual\\_Prevention\\_and\\_diagnostic\\_of\\_Fusarium\\_WiltPanama\\_Disease\\_of\\_banana\\_caused\\_by\\_Fusarium\\_oxysporum\\_f\\_sp\\_cubense\\_Tropical\\_Race\\_4TR4](https://www.researchgate.net/publication/273632807_Technical_Manual_Prevention_and_diagnostic_of_Fusarium_WiltPanama_Disease_of_banana_caused_by_Fusarium_oxysporum_f_sp_cubense_Tropical_Race_4TR4)
- Perrier, X., Edmond De Langhe, Donohue, M., Lentfer, C., Luc Vrydaghs, Frédéric Bakry, Françoise Carreel, Hippolyte, I., Horry, J.-P., Jenny, C., Lebot, V., Ange-Marie Risterucci, Kodjo Tomekpé, Hugues Doutrelepont, T. Blake Ball, Manwaring, J., Pierre de Maret, &

- Denham, T. (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11311–11318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102001108>
- Ploetz, R. (2005). *Panama Disease: An Old Nemesis Rears Its Ugly Head Part 1: The Beginnings of the Banana Export Trades*. Panama Disease: An Old Nemesis Rears Its Ugly Head Part 1: The Beginnings of the Banana Export Trades; Panama Disease: An Old Nemesis Rears Its Ugly Head Part 1: The Beginnings of the Banana Export Trades. <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/PanamaDiseasePart1.aspx>
- Ploetz, R. (2015). *Fusarium Wilt of Banana | Phytopathology®*. Phytopathology. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>
- Popova, E., Shukla, M., Kim, H.-H., & Saxena, P. K. (2020). Root cryobanking: an important tool in plant cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144(1), 49–66. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01859-6>
- Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., & Arab, S. (2016). Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Molecular Biology Research Communications*, 5(4), 257–261. <https://doi.org/10.22099/MBRC.2016.3915>
- Rose, L., Atwell, S., Grant, M., & Holub, E. B. (2012). Parallel Loss-of-Function at the RPM1 Bacterial Resistance Locus in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00287>
- Sameeullah, M., Khan, F. A., Özer, G., Aslam, N., Gurel, E., Waheed, M. T., & Karadeniz, T. (2018). CRISPR/Cas9-Mediated Immunity in Plants Against Pathogens. *Current Issues in Molecular Biology*, 55–64. <https://doi.org/10.21775/cimb.026.055>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Dan Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual Second edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schu, P., & Reith, M. (1995). Evaluation of Different Preparation Parameters for the Production and Cryopreservation of Seed Cultures with Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology*, 32(4), 379–388. <https://doi.org/10.1006/cryo.1995.1038>
- Sheng, O., Deng, G., Wei, Y., & Ruibin, K. (2015, September 9). *Method for extracting genomic DNA of different tissues of banana*. SciSpace - Paper. <https://typeset.io/papers/method-for-extracting-genomic-dna-of-different-tissues-of-i0gxmyl8zr>
- Song, S., Xu, Y., Huang, D., Miao, H., Liu, J., Jia, C., et al. (2018). Identification of a novel promoter from banana aquaporin family gene (MaTIP1;2) which responses to drought and salt-stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 128, 163–169. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.05.003
- Spiegel, H., Boes, A., Camil Perales Morales, Rademacher, T., & Buyel, J. F. (2019). Ready-to-Use Stocks of *Agrobacterium tumefaciens* Can Simplify Process Development for the Production of Recombinant Proteins by Transient Expression in Plants. *Biotechnology Journal*, 14(10). <https://doi.org/10.1002/biot.201900113>
- Staver, C., Pemsli, D., Scheerer, L., Vicente, L., & Dita, M. (2020). Ex Ante Assessment of Returns on Research Investments to Address the Impact of Fusarium Wilt Tropical Race 4 on Global Banana Production. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00844>
- Sun HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H (2006) A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol* 47:426–431. doi: 10.1093/pcp/pci251
- Thangavelu, R., Edwinraj, E., Gopi, M., Pushpakanth, P., Sharmila, K., Prabaharam, M., Loganathan, M., & Uma, S. (2022). Development of PCR-Based Race-Specific Markers for Differentiation of Indian *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the Causal Agent of Fusarium Wilt in Banana. *Journal of Fungi*, 8(1), 53–53. <https://doi.org/10.3390/jof8010053>

- Tian, D., Traw, M. B., Chen, J. Q., Kreitman, M. y Bergelson, J. (2003). Costos de aptitud física de la resistencia mediada por el gen R en *Arabidopsis thaliana*. *Naturaleza* 423, 74–77.
- Torres, L., Centanaro, P., Raffo, L., & Nava, J. (2022). Factores Limitantes del Desarrollo Agroecológico en el Cultivo de Banano (*Musa AAA*), Provincia del Guayas, Ecuador. *Revista Tecnica de La Facultad de Ingenieria Universidad Del Zulia*, e234601–e234601. <https://doi.org/10.22209/rt.v46a01>
- Tripathi, L., Ntui, S. V., & Tripathi, J. (2020). CRISPR/Cas9-based genome editing of banana for disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.05.003>
- Tripathi, L., Ntui, V., & Tripathi, J. (2022). Control of Bacterial Diseases of Banana Using CRISPR/Cas-Based Gene Editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3619–3619. <https://doi.org/10.3390/ijms23073619>
- Tu, Q., Yin, J., Fu, J., Herrmann, J., Li, Y., Yin, Y., A. Francis Stewart, Müller, R., & Zhang, Y. (2016). Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep24648>
- Tzfira, T., & Citovsky, V. (2007). *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. Google Books. [https://books.google.com.ec/books?id=aC6j7TL0UxYC&lr=&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=aC6j7TL0UxYC&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Viljoen, A., Mostert, D., Chiconela, T., Beukes, I., Fraser, C., Dwyer, J., Murray, H. W., Amisse, J., Matabuana, E., Tazan, G., Amugoli, O., Mondjana, A., Vaz, A., Pretorius, A. E., Bothma, S., Rose, L., Beed, F., Dusunceli, F., Chao, C., & Molina, A. (2020). Occurrence and spread of the banana fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 in Mozambique. *South African Journal of Science*, 116(11/12). <https://doi.org/10.17159/sajs.2020/8608>

- Wang, Z., Miao, H., Liu, J., Xu, B., Yao, X., Xu, C., et al. (2019). Musa balbisiana genome reveals subgenome evolution and functional divergence. *Nat. Plants* 5, 810–821. doi: 10.1038/s41477-019-0452-6
- Wang, X., Yu, R., & Li, J. (2021). Using Genetic Engineering Techniques to Develop Banana Cultivars With Fusarium Wilt Resistance and Ideal Plant Architecture. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617528>
- Wang, Y., Ho, S., Natarajan, R., Heindl, J., Bruger, E., Waters, C., Michael, A., & Fuqua, C. (2016). Spermidine Inversely Influences Surface Interactions and Planktonic Growth in *Agrobacterium tumefaciens* | *Journal of Bacteriology*. *Journal of Bacteriology*. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.00265-16>
- Westerhoven, A., Meijer, H., Seidl, M., & Kema, G. (2022). Uncontained spread of Fusarium wilt of banana threatens African food security. *PLOS Pathogens*, 18(9), e1010769–e1010769. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010769>
- Williams, J., Hodgson, C., & Carnes, A. (2015). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- Williams, J. A., Carnes, A. E., & Hodgson, C. P. (2009). Plasmid DNA vaccine vector design: Impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnology Advances*, 27(4), 353–370. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.02.003>
- Wise, A. A., Liu, Z., & Binns, A. N. (2006). Culture and Maintenance of *Agrobacterium* Strains. *Humana Press EBooks*, 3–14. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:3>
- Wise, A. A., Liu, Z., & Binns, A. N. (2006). Culture and Maintenance of *Agrobacterium* Strains. *Humana Press EBooks*, 3–14. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:3>

- Wilson, K. (2001, November). *Preparation of Genomic DNA from Bacteria*. ResearchGate; Wiley.  
[https://www.researchgate.net/publication/227984031\\_Preparation\\_of\\_Genomic\\_DNA\\_from\\_Bacteria](https://www.researchgate.net/publication/227984031_Preparation_of_Genomic_DNA_from_Bacteria)
- Wyrzykowska, A., Pieczynski, M., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2016). Construction of Artificial miRNAs to Prevent Drought Stress in *Solanum tuberosum*. *Methods in Molecular Biology*, 271–290. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3356-3\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3356-3_21)
- Xing, H., Li, D., Zhi Ping Wang, Hai Yan Zhang, Han, C., Liu, B., Xue Chen Wang, & Qi Jun Chen. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
- Yaman, E., Sony Suhandono, & Agus Chahyadi. (2014, March 3). *Optimization of genetic transformation of Artemisia annua L. Using Agrobacterium for Artemisinin production*. ResearchGate; EManuscript Services.  
[https://www.researchgate.net/publication/263015354\\_Optimization\\_of\\_genetic\\_transformation\\_of\\_Artemisia\\_annua\\_L\\_Using\\_Agrobacterium\\_for\\_Artemisinin\\_production](https://www.researchgate.net/publication/263015354_Optimization_of_genetic_transformation_of_Artemisia_annua_L_Using_Agrobacterium_for_Artemisinin_production)
- Yarmush, M., Golberg, A., Sersa, G., Kotnik, T., & Miklavcic, D. (2014). *Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges*. Annual Reviews. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-bioeng-071813-104622>
- Yhisset, L., Daza, G., Núñez Zarrantes, Víctor, Yhisset, L., Daza, G., & Núñez Zarrantes, Víctor. (2018). Estandarización de protocolos de transformación genética en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* para la generación de una colección de constructos génicos. *Ciencia En Desarrollo*, 9(2), 9–16.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-74882018000200009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-74882018000200009&script=sci_arttext)
- Zapata, E., Aguirre, C., Aragón, L., Rodríguez, M., Osh, C., Aguilera, G., Domínguez, M., Salado, A., Méndez, C., Jiménez, N., Urías, C., & Gómez, R. (2022). Análisis geoespacial fitosanitario de la Fusariosis de las Musáceas a nivel global, con énfasis en América

Pantropical. *Investigaciones Geográficas, Boletín Del Instituto de Geografía*, 106.

<https://doi.org/10.14350/rig.60466>

Zhang, Q., Yuan, W., Sun, H., Hou, S., & Zhu, H. (2010). The technology of large-scale pharmaceutical plasmid purification by cetyltrimethylammonium bromide and Tritonx-114. *African Journal of Biotechnology*, 9(1). <https://doi.org/10.4314/AJB.V9I1>

114. *African Journal of Biotechnology*, 9(1). <https://doi.org/10.4314/AJB.V9I1>

Zurita, M. (2021). El sistema CRISPR/Cas, crónica de un premio Nobel anunciado. *Educación*

*Química*, 32(3), 3. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2021.3.79714>



## Capítulo IX: Apéndices