



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



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

PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

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

Autor: Maxi Valarezo, Leiner Steven

Director: Flores Flor, Francisco Javier PhD.

Sangolquí, 8 de marzo 2024





- 1 • Introducción
- 2 • Objetivos e hipótesis
- 3 • Marco teórico
- 4 • Materiales y métodos
- 5 • Resultados y discusión
- 6 • Conclusiones y recomendaciones



FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

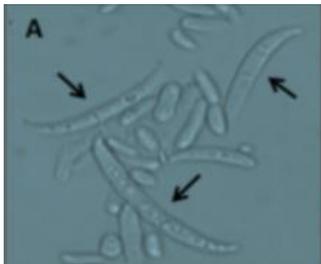
Cavendish (AAA)



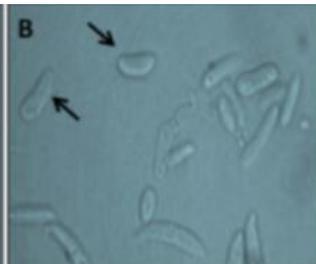
Ecuador líder mundial
en exportación de banano



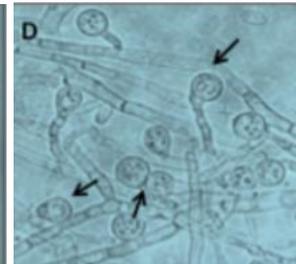
Fusarium oxysporum f.sp. *cubense* raza tropical 4 (Foc R4T)



Macroconidios



Microconidios



Clamidosporas



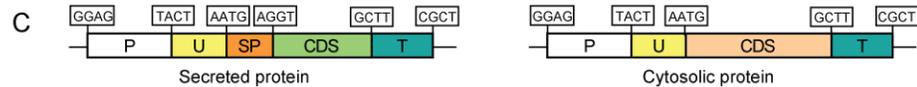
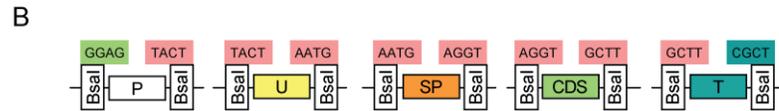
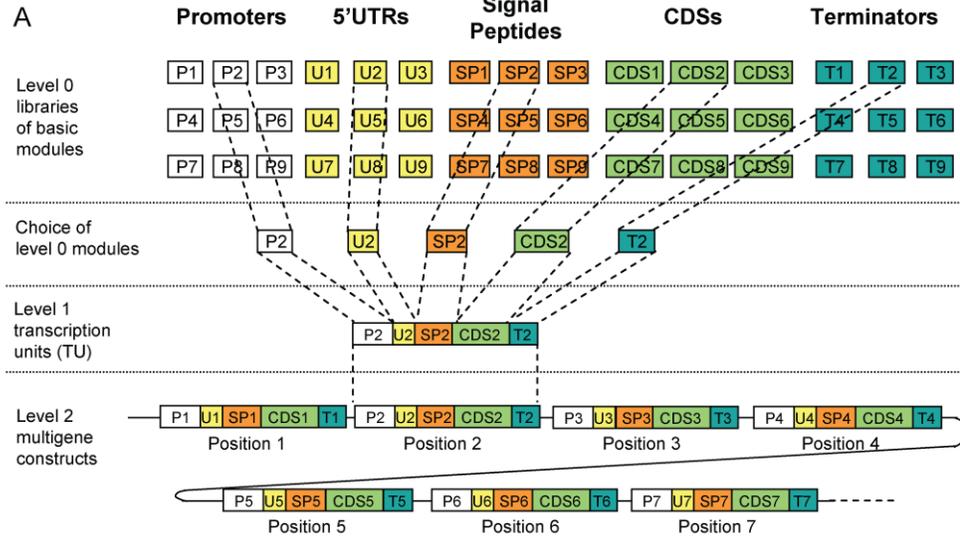
CRISPR-Cas9
altamente eficiente y
especifico



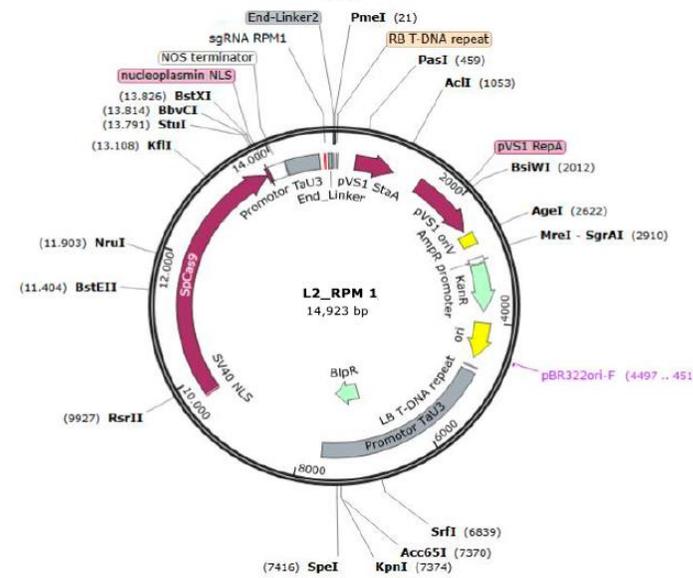
E S P E
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

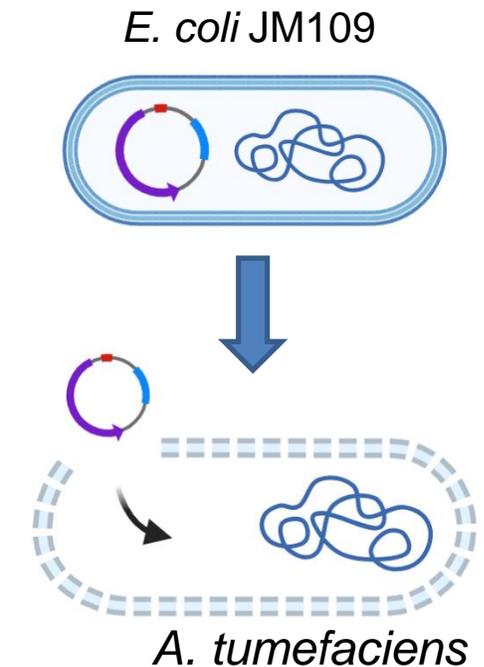
Clonación Modular



Plásmido ensamblado en L2



Presenta sgRNA (RPM1), el promotor TaU3, nucleasa SpCas9.





- 1 • Introducción
- 2 • Objetivos e hipótesis
- 3 • Marco teórico
- 4 • Materiales y métodos
- 5 • Resultados y discusión
- 6 • Conclusiones y recomendaciones

Objetivo General

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

Objetivos 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

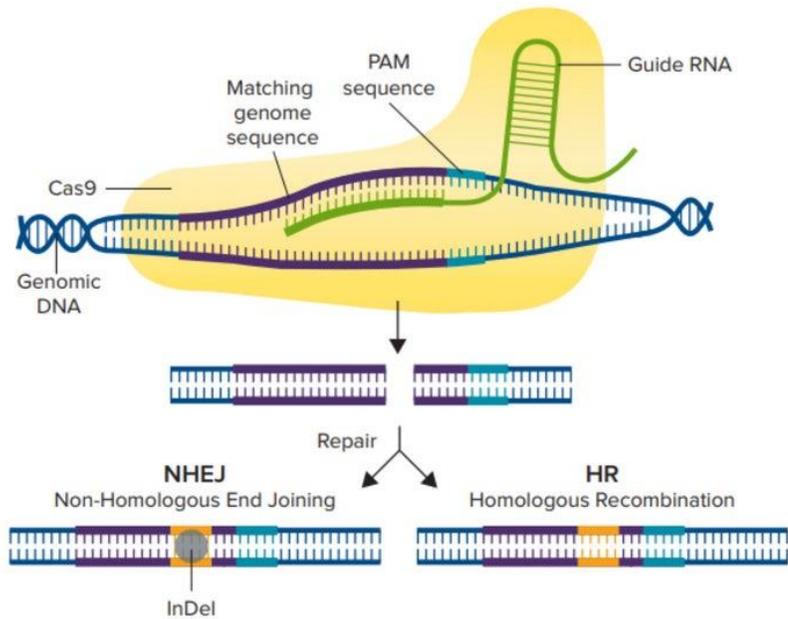
Hipótesis

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

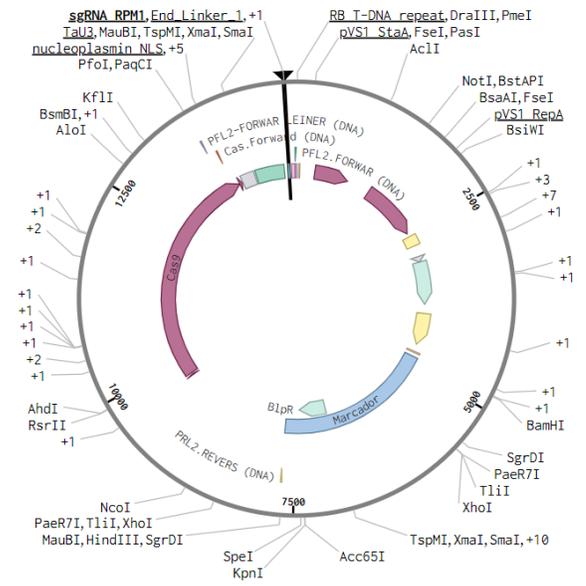


- 1 • Introducción
- 2 • Objetivos e hipótesis
- 3 • Marco teórico
- 4 • Materiales y métodos
- 5 • Resultados y discusión
- 6 • Conclusiones y recomendaciones

CRISPR-Cas9



RPM1



Position	Strand	Sequence	PAM	On-Target Score	Off-Target Pair	Off-Target Pair
219	1	AAATATGTCCTATGATAAAT	AGG	29,8		84,5
171	-1	AGATTTATGAAATATTATTA	TGG	28,6	64,5	76,4
222	1	TATGTCCTATGATAAATAGG	TGG	62,4		94,0
171	-1	AGATTTATGAAATATTATTA	TGG	28,6	71,7	76,4
327	1	ATATACTTCTTGACTTAC	TGG	51,1		23,7
281	-1	GTAAGTCAGAAGAAGTATAT	GGG	37,6	10,9	27,9



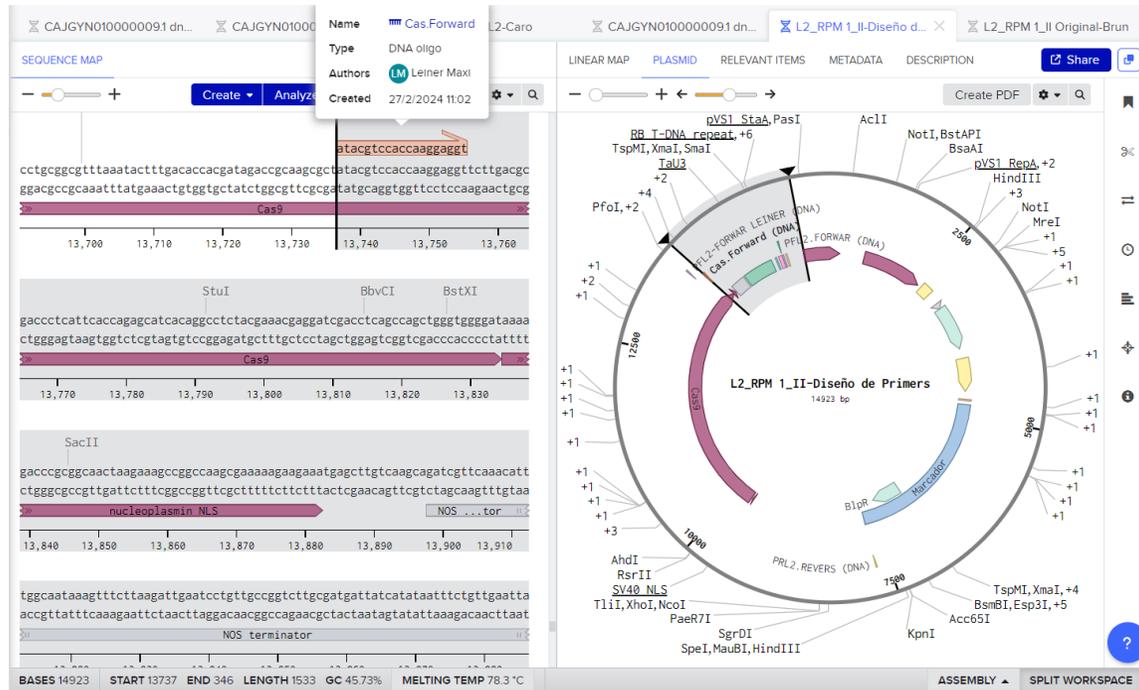
- 1 • Introducción
- 2 • Objetivos e hipótesis
- 3 • Marco teórico
- 4 • **Materiales y métodos**
- 5 • Resultados y discusión
- 6 • Conclusiones y recomendaciones

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

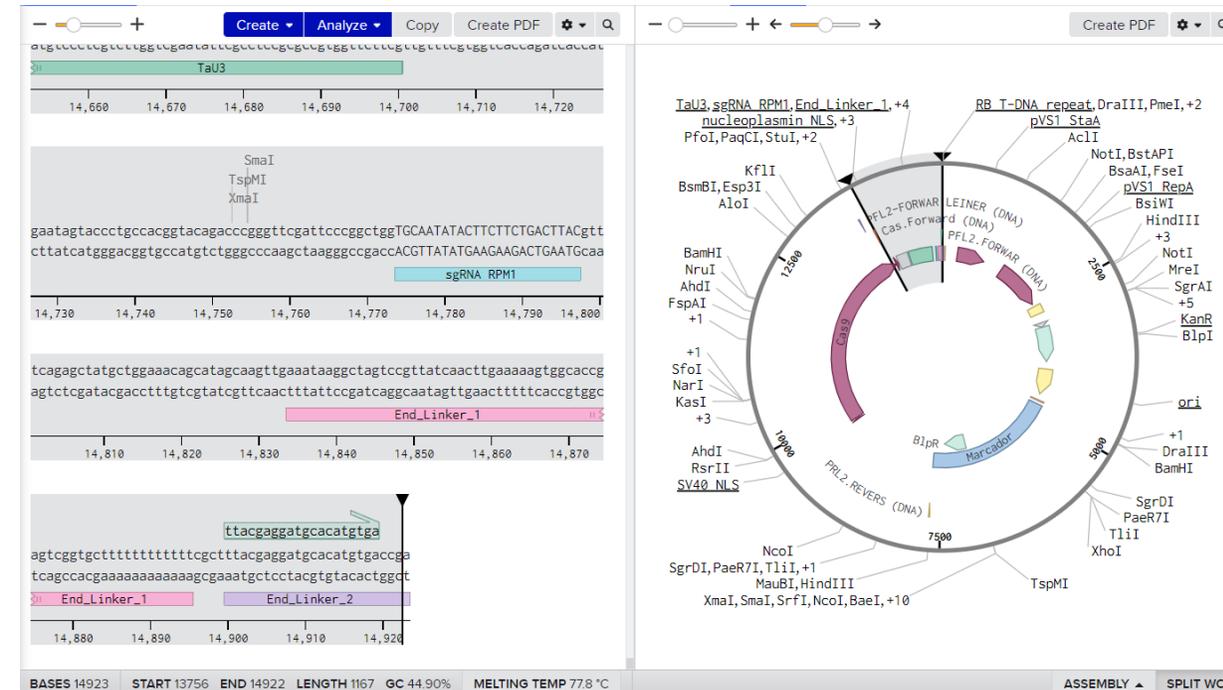


Primers	Secuencia	GC%	Tm	Tamaño amplificar
Cas.Forward	5'-ATACGTCCACCAAGGAGGTT-3'	50	61	1533 pb
Bac.Reverse	5'-CCTTCATGCGTTCCCCTTGC-3'	60	64.8	
Cas.Forward	5'-ATACGTCCACCAAGGAGGTT-3'	50	61	1167 pb
L2.2.Reverse	5'-TCGGTCACATGTGCATCCTCT-3'	55	62,4	

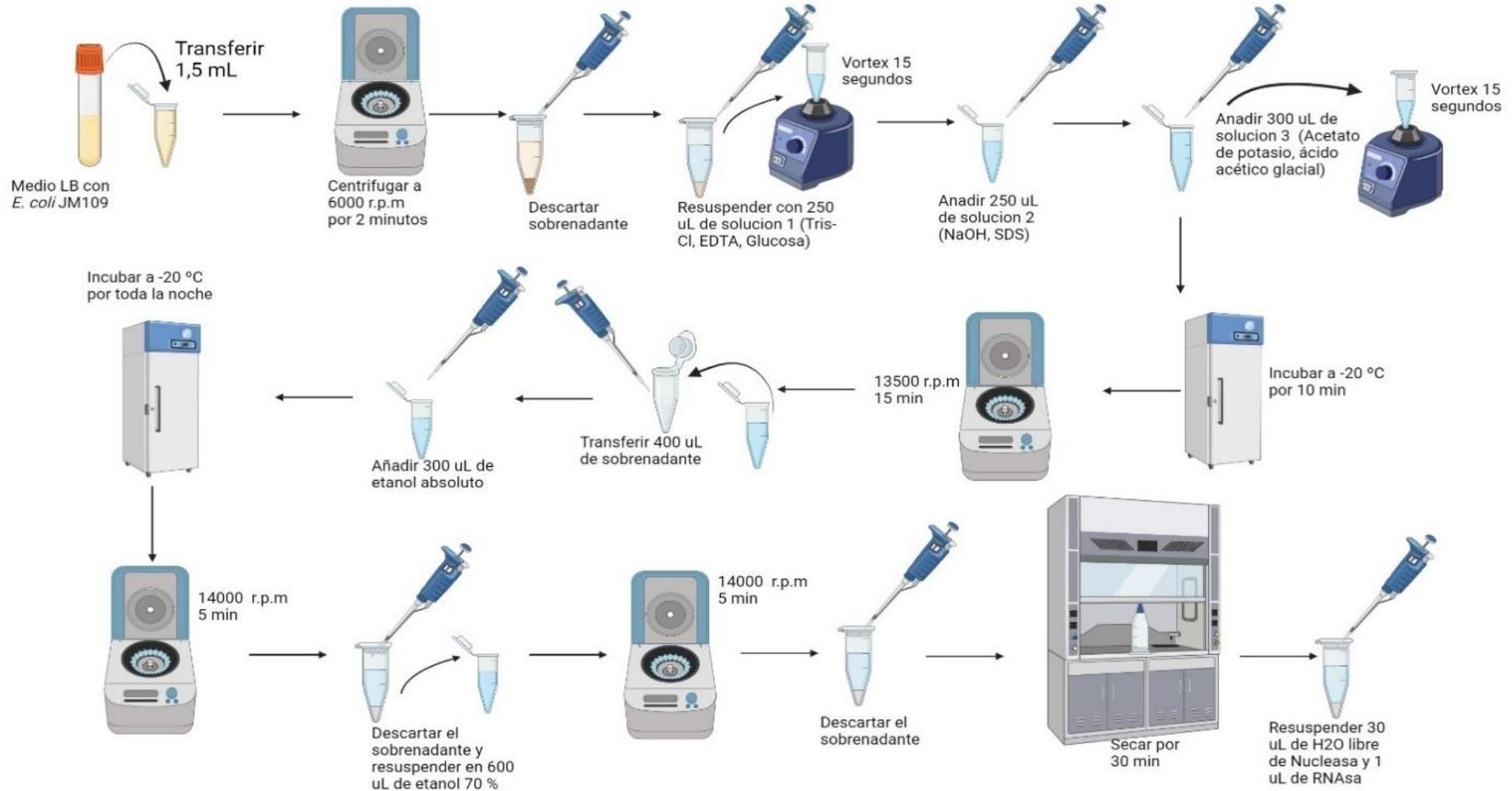
Región Amplificar 1533 pb



Región Amplificar 1167 pb



METODOLOGÍA



Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

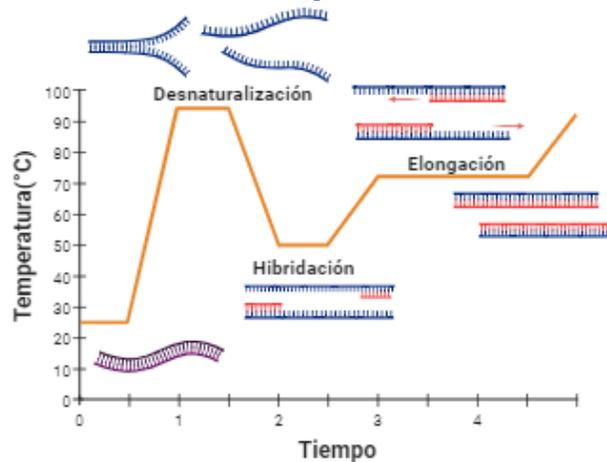
Componentes y Condiciones de PCR para el plásmido de *E. coli*

Región Amplificar 1533 pb

Componente	Volumen (μL)
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

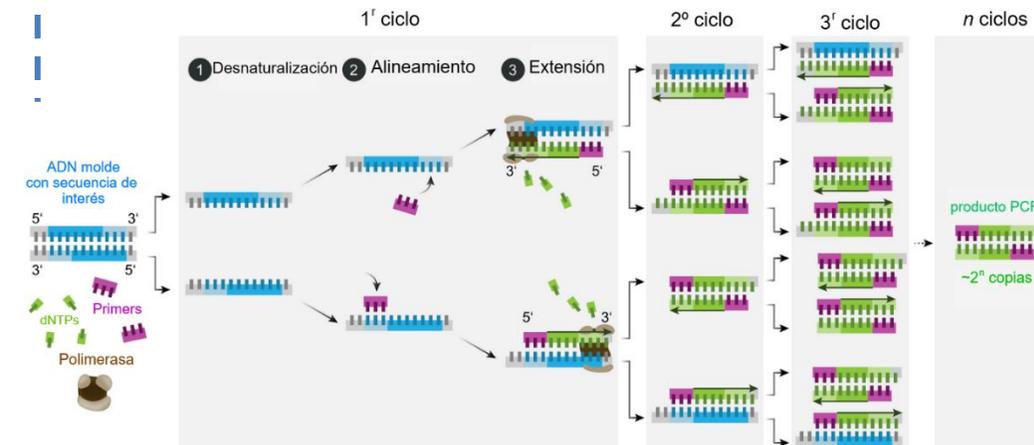
Región Amplificar 1167 pb

Componente	Volumen (μL)
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

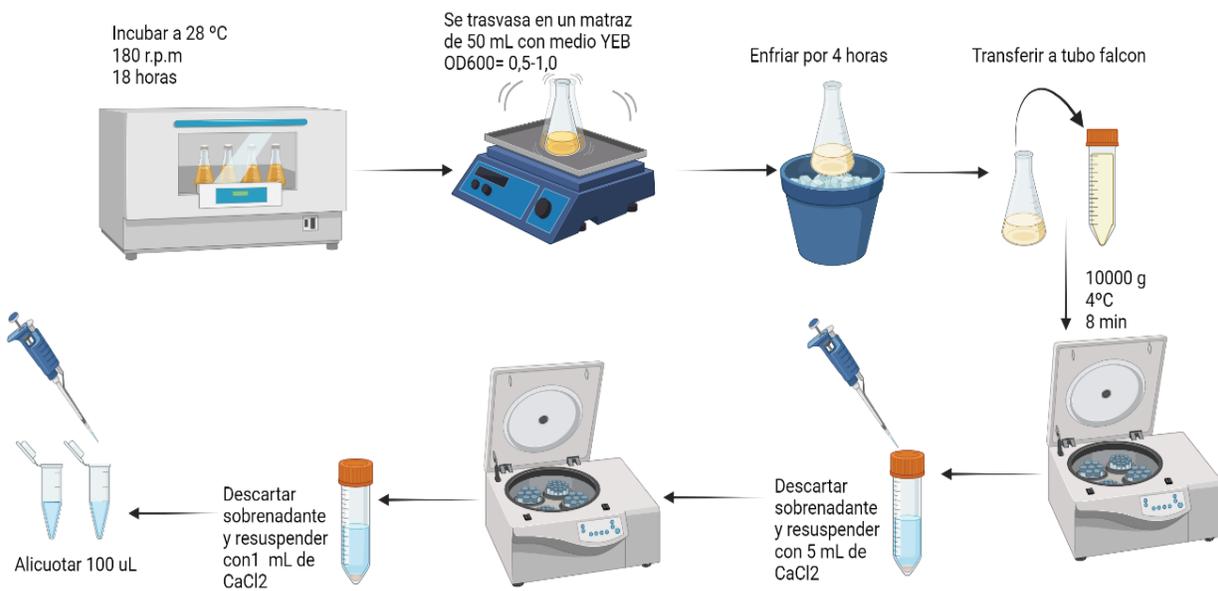


Condiciones de PCR

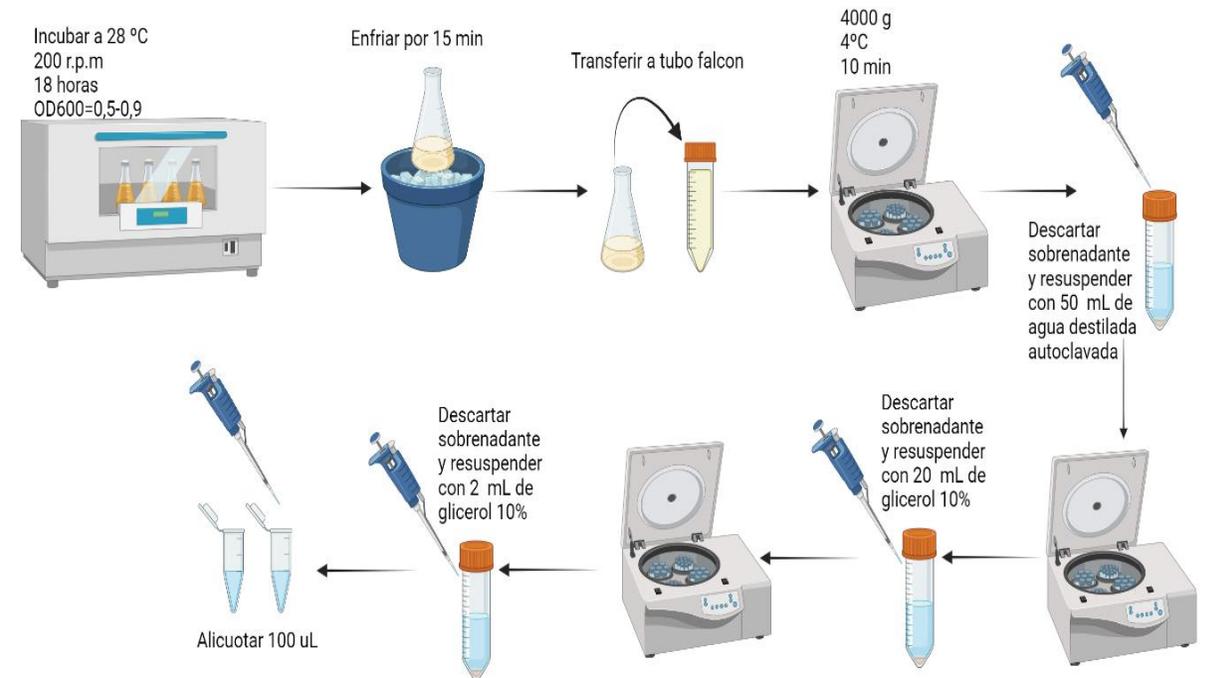
Etapas de la PCR	Temperatura	Duración	Ciclos de PCR
Desnaturalización Inicial	95 °C	4 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	
Hibridación	Tm-5°C	15 segundos	35
Extensión	72 °C	30 segundos	
Extensión final	72 °C	1 minuto	1



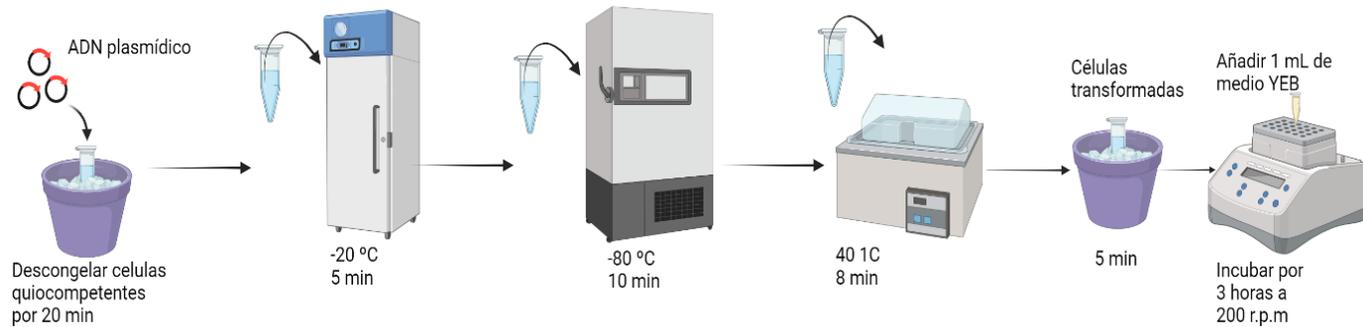
Células Quimiocompetentes



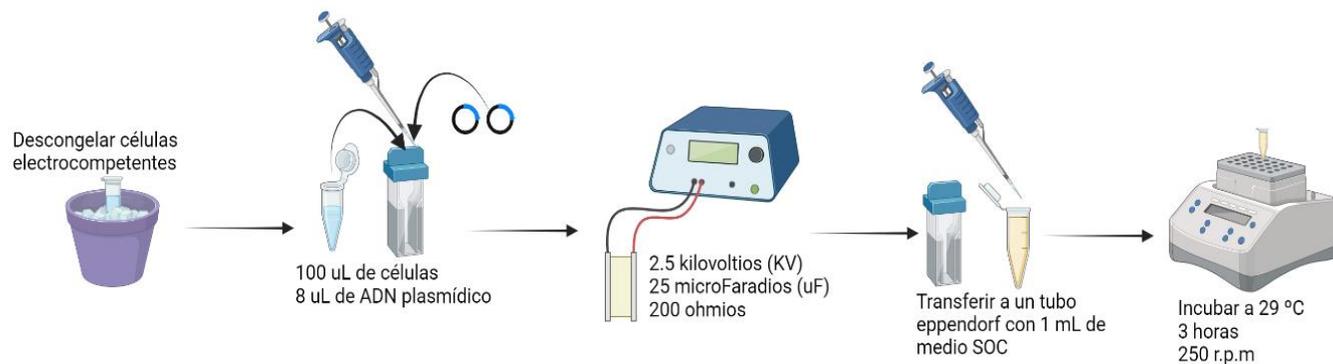
Células Electrocompetentes



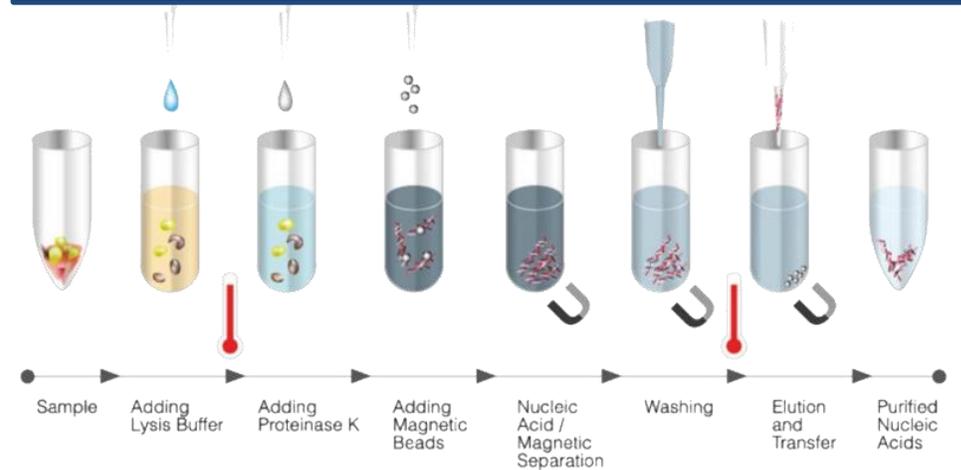
Choque térmico



Electroporación



Extracción de ADN genómico de banana



Diseño de primers para identificar la región promotora RPM1 en el Banano

Diseño de primers para la región promotora en el programa Benchling

Primary assembly CAJGYN010000009.1: 39,346,596-39,349,427

Region in detail

Contigs
Genes

Gene Legend
■ protein coding

Diseño de primers en el programa Benchling

Name: PF-54.4
Type: DNA oligo
Authors: Leiner Maxi
Created: 15/12/2023 11:25

GC 32.24% MELTING TEMP 72.3 °C

Primers para amplificar el fragmento de 701 pb del banano

Primers	Secuencia	GC%	Tm
PF.RMP1	5'-GAAGACTTATTCATGGCTTTGGC-3'	43	58.1
PR.RMP1	5'-CTTATGTGCGAGCCTTGAAGGAGA-3'	48	61

Componentes de PCR para banano

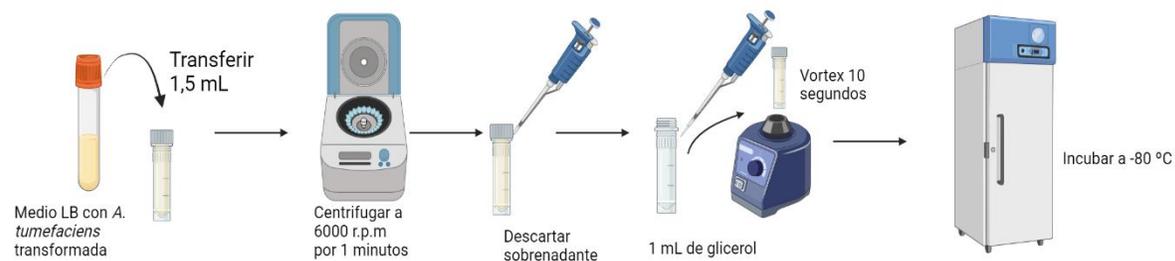
Componente	Volumen (µL)
2X BlasTaq PCR Master Mix	12,5
Cas.Forward (10 µM)	1
L2.2.Reverse (10 µM)	1
Dimetilsulfóxido (5%)	1
Plantilla ADN plasmídico (95 ng)	1
Agua Libre de Nucleasa	8,5
Volumen Total	25

Condiciones de PCR para banano

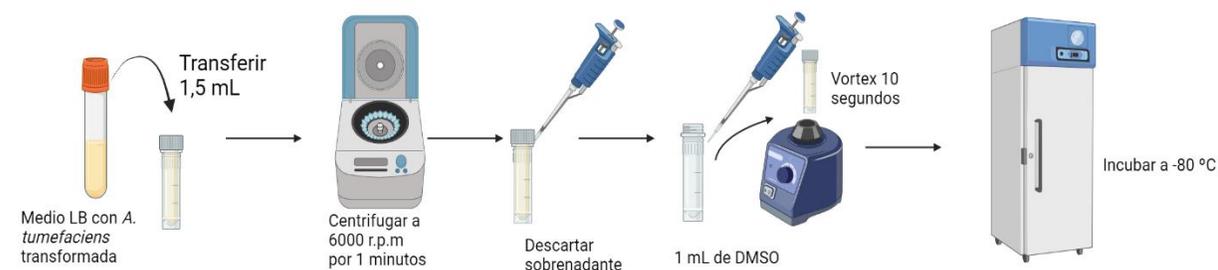
Etapas de la PCR	Temperatura	Duración	Ciclos de PCR
Desnaturalización Inicial	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	
Hibridación	Tm-5°C	15 segundos	30
Extensión	72 °C	15 segundos	
Extensión final	72 °C	1 minuto	1

Crioconservación

Glicerol



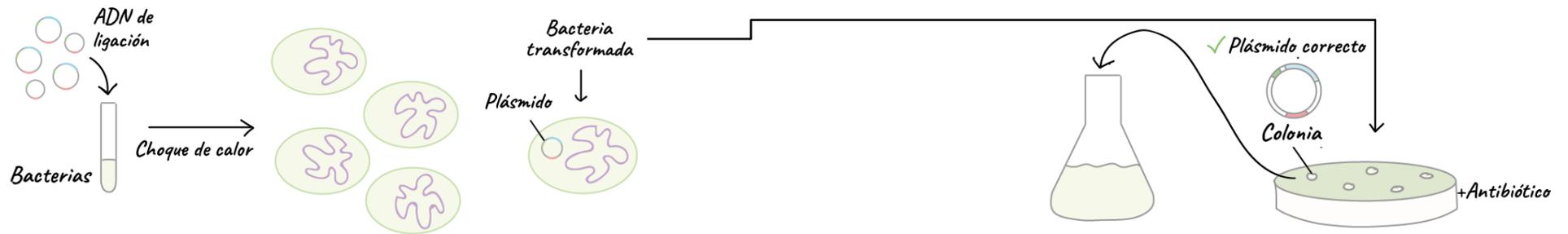
Dimetilsulfóxido (DMSO)



Eficiencia de transformación bacteriana

Choque térmico

Electroporación



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

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

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

Diseño Experimental

Diseño completamente al azar (DCA)

Modelo A

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

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

μ = Media de la eficiencia de transformación calculada en AGL1

ci = Efecto de la i-enésima cepa de AGL1

ϵ_{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

Hipótesis

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

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

Modelo B

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

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

μ = Media de la eficiencia de conservación calculada en AGL1

ci = Efecto de la i-enésima cepa de AGL1

ϵ_{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 %



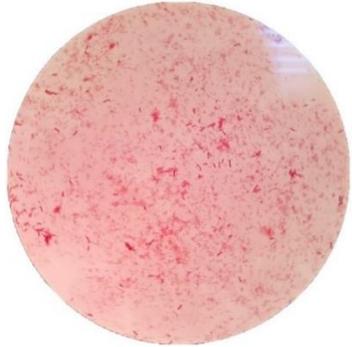
- 1 • Introducción
- 2 • Objetivos e hipótesis
- 3 • Marco teórico
- 4 • Materiales y métodos
- 5 • Resultados y discusión
- 6 • Conclusiones y recomendaciones



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de *A. tumefaciens*

Bacteria Gram-negativa



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"/> Agrobacterium sp. CGMCC 11546 chromosome 2 complete sequence	Agrobacterium sp. CGMCC...	1290	2580	100%	0.0	100.00%	1926885	gij1860276756 CP047388.1
<input checked="" type="checkbox"/> Agrobacterium sp. CGMCC 11546 chromosome 1 complete sequence	Agrobacterium sp. CGMCC...	1290	2580	100%	0.0	100.00%	3036316	gij1860273785 CP047387.1
<input checked="" type="checkbox"/> Agrobacterium fabrum strain BG-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Agrobacterium fabrum	1290	1290	100%	0.0	100.00%	1061	gij1853540996 MT605454.1
<input checked="" type="checkbox"/> Agrobacterium fabrum strain cqsD1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Agrobacterium fabrum	1290	1290	100%	0.0	100.00%	1429	gij1784143441 MN826531.1

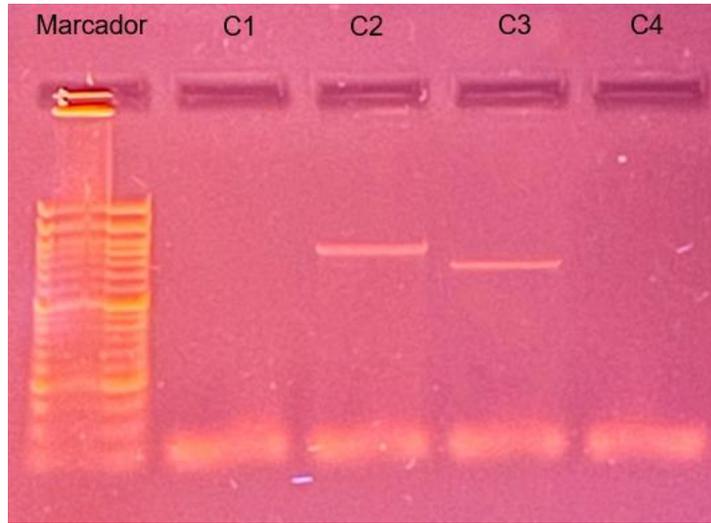
Extracción de ADN plasmídico del vector binario pAGM4723 en *E. coli* JM109

Fecha	Protocolo	Concentración (µg/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
		1516	1,93	1,80
		961,4	1,920	1,719
23/10/2023	iGEM™	3100	1,98	1,32
		2567	1,98	1,55
		1954	1,73	1,99
		2543	1,86	1,89

Resultados y discusión

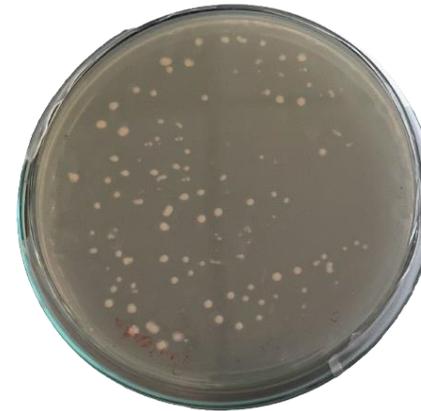
Confirmación del tamaño del plásmido



Nota. Carril1 (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.

Choque térmico

Siembra de células transformadas con un total de 98 UFC (3uL ADN) | *Siembra de células transformadas con un total de 98 UFC (5uL ADN)*



➔ *Control Negativo*

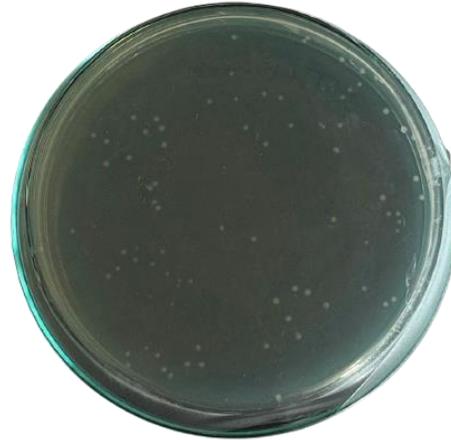
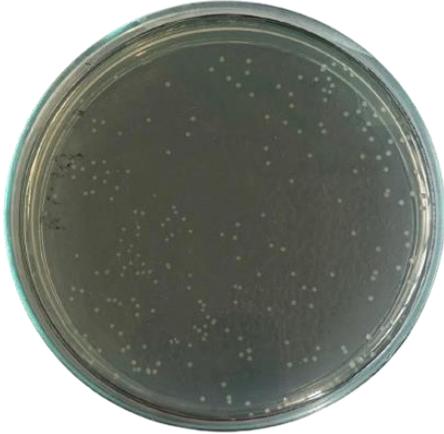


ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA

Resultados y discusión

Electroporación

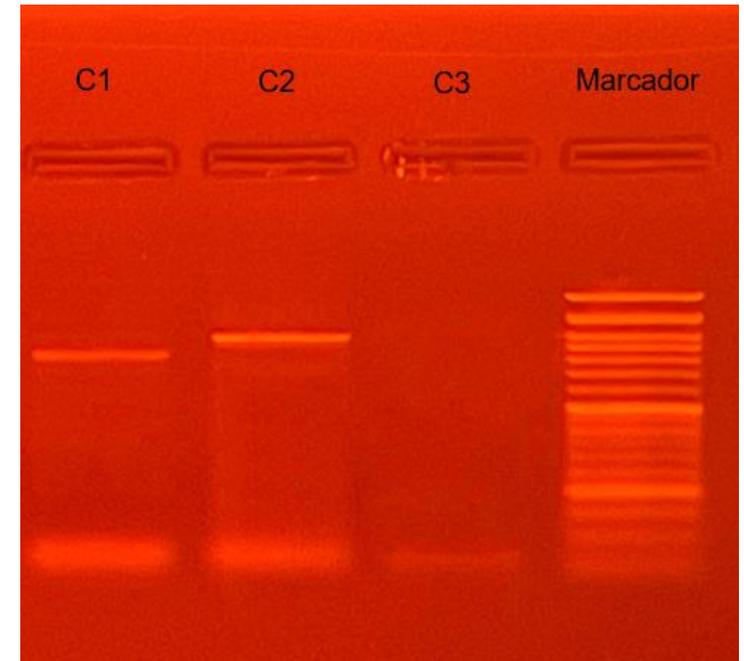
Siembra de células transformadas con un total de 138 UFC (0,2 cm) | Siembra de células transformadas con un total de 78 UFC (0,4 cm)



Control Negativo

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

C1 con un tamaño de 800 pb, el C2 a un tamaño de 1000 pb y el C3 representa el control negativo.

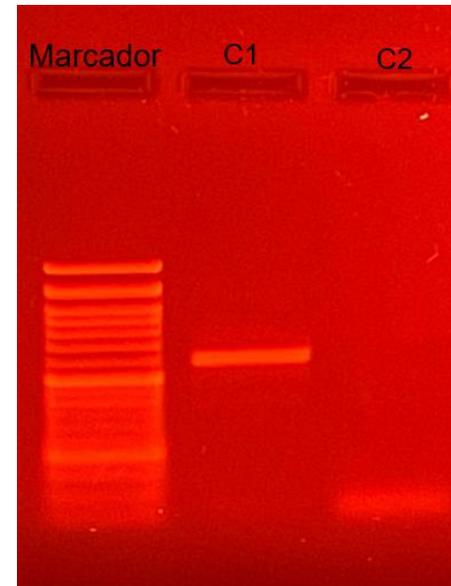


Resultados y discusión

Extracción de ADN genómico de Cavendish

Fecha	Protocolo	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/230)
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

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



C1 con un tamaño de 701 pb
C2 es control negativo.



Resultados y discusión

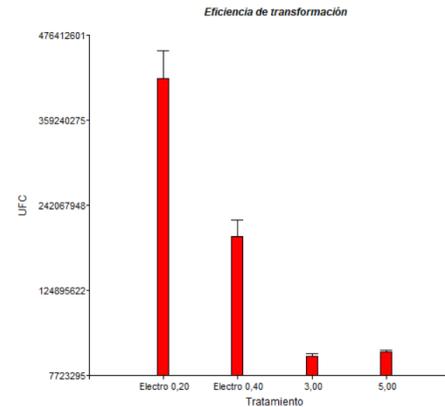
Eficiencia de transformación (ET)

Número de colonias transformadas por Electroporación

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

Número de colonias transformadas por Choque térmico

Volumen de ADN plasmídico	Réplica	Nº Colonias	UFC/mL	TE (UFC ug)
3 uL	1	98	2523500	6.4x10 ⁴
	2	150	3862500	9.9x10 ⁴
	3	155	3991250	1.02x10 ⁵
5 uL	1	175	4593750	1.2x10 ⁵
	2	138	3622500	9.5x10 ⁴
	3	164	4305000	1.1x10 ⁵



Prueba de Leven

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² 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			

Prueba de ANOVA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² 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	12065500000000000,00	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	199166666,67	3	22421622,75 B
0,20	416666666,67	3	22421622,75 C

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

Se acepta h. alternativa y se descarta h. nula

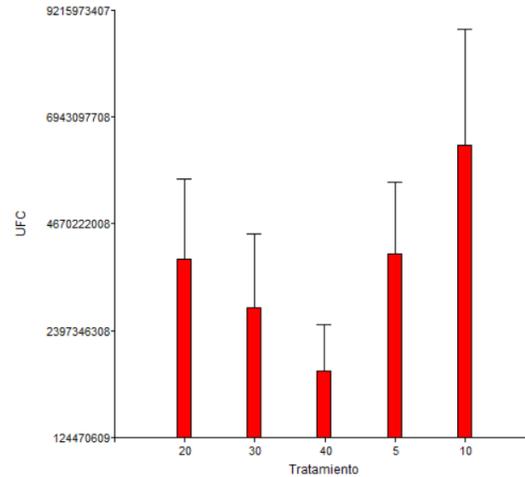


Resultados y discusión

Número de colonias conservadas por glicerol

Concentración	Réplica	Nº	UFC
Colonias			
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

Eficiencia de Crioconservación



Prueba de Leven

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² 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			

Se acepta h. nula y se descarta h. nula

Número de colonias conservadas por DMSO

Concentración	Réplica	Nº	UFC
Colonias			
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

Prueba de ANOVA

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² 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			

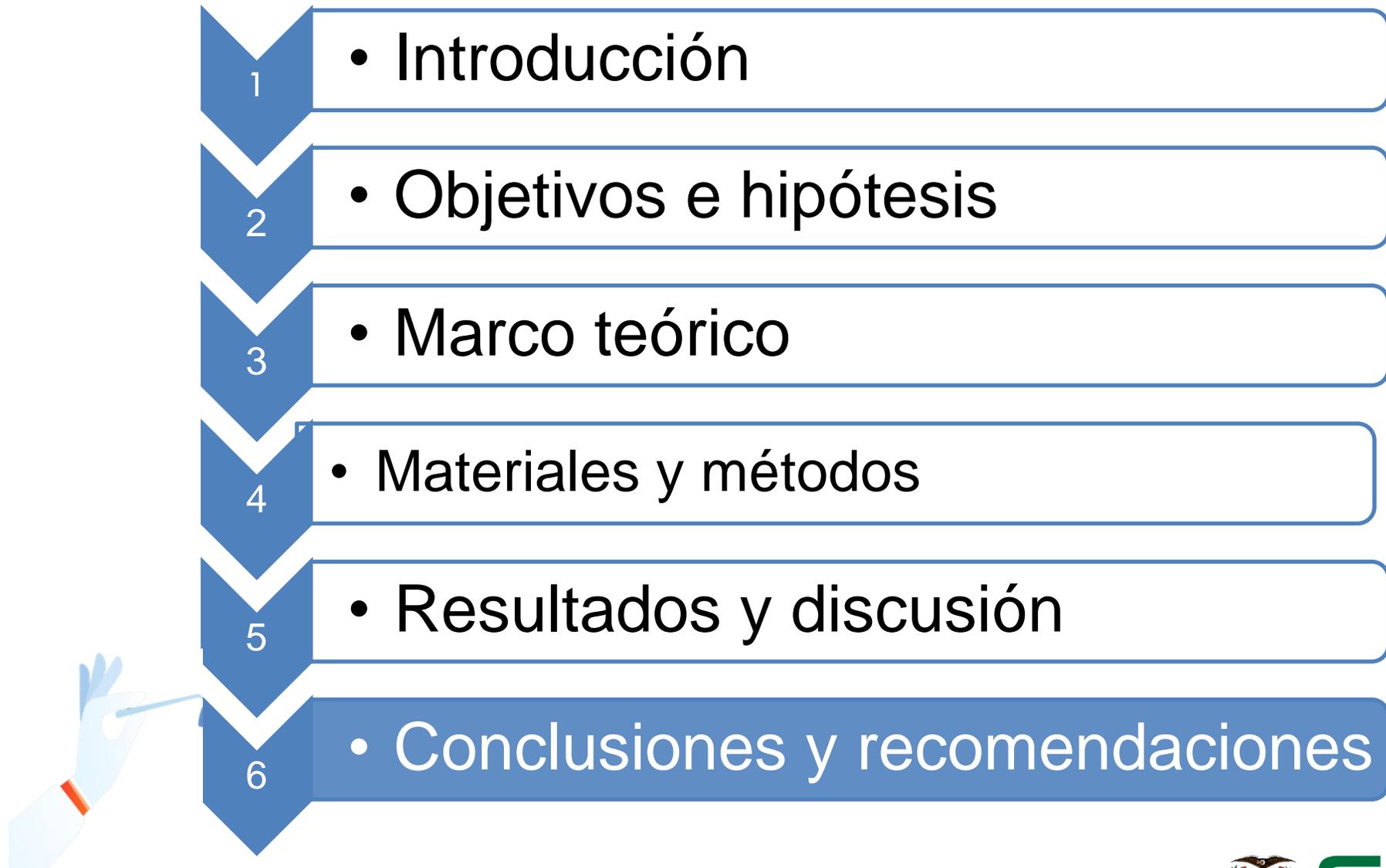
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8511061340,64566

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)





- 1 • Introducción
- 2 • Objetivos e hipótesis
- 3 • Marco teórico
- 4 • Materiales y métodos
- 5 • Resultados y discusión
- 6 • Conclusiones y recomendaciones

CONCLUSIONES

La transformación de *A. tumefaciens* tuvo éxito mediante dos métodos de transformación. Los resultados indican que la electroporación es el método más eficiente en términos de la tasa de transformación.

Se confirmó la presencia de la región promotora del gen RPM1 en el germoplasma de banano Cavendish.

El método casero de lisis alcalina demostró ser más efectivo que el Kit MiniPrep

Las diferentes concentraciones de glicerol no afectan significativamente la viabilidad ni la capacidad de conservación, en contraste del DMSO.

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.

Se debe trabajar con tejidos jóvenes durante el proceso de extracción de ADN genómico en banano

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





INIAP DE PICHILINGUE

FRANCISCO FLORES, Ph.D

Director del Proyecto de Investigación

Lcda. Silvana Granda

Técnica del laboratorio de Microbiología

FAMILIA

AMIGOS



E S P E
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA