

Resumen

En el campo de la Biotecnología vegetal, *Agrobacterium tumefaciens* es una herramienta potencial para transferir material genético de interés. Su importancia radica en la capacidad de producir mutaciones puntuales y específicas a partir de constructos presentes en su sistema de vector binario, el mismo que puede contener sistemas de edición genética como CRISPR-Cas que faciliten la mejora genética de plantas. El presente trabajo pretende transformar *A. tumefaciens* AGL1 con un plásmido capaz de editar el promotor del gen RIN4 asociado a la fusariosis en banano. Para ello se estableció condiciones específicas asociadas a los métodos de shock térmico y electroporación que incluyeron: preparación de células competentes, control de temperatura, selección del tamaño de la cubeta de electroporación, determinación de la cantidad de ADN y el tipo de medio de recuperación. Dada la importancia de este gen en la inmunidad innata de las plantas, fue necesaria la confirmación de su región promotora en el germoplasma del banano ecuatoriano, mediante técnicas moleculares. Asimismo, debido al tiempo y recursos que conlleva la estandarización de protocolos, definir condiciones de almacenamiento de células a largo plazo es fundamental, lo que impulsó la evaluación de diferentes concentraciones de glicerol y DMSO como agentes crioconservantes de *A. tumefaciens* transformadas. Los resultados obtenidos mostraron que los protocolos aplicados mejoraron la eficiencia de transformación, y que la edición es posible debido a la presencia de este gen de resistencia en el genoma de las variedades de banano tipo Cavendish. Además, tanto el glicerol como el DMSO pueden usarse eficazmente como agentes conservantes en concentraciones de 20 a 30% y 10%, respectivamente.

Palabras clave: Agrobacterium, transformación, RIN4, crioconservación

Abstract

In plant biotechnology field, *Agrobacterium tumefaciens* is a potential tool for transferring genetic material of interest. Its importance is based on its ability to produce specific point mutations from constructs present in its binary vector system, which can contain gene editing systems such as CRISPR-Cas to facilitate plant breeding. The present work aims to transform *A. tumefaciens* AGL1 with a plasmid capable of editing RIN4 gene promoter that is associated with fusarium banana disease. For this purpose, specific conditions associated with the methods of heat shock and electroporation were established, including: preparation of competent cells, temperature control, selection of the size of the electroporation cuvette, determination of the DNA amount and the type of recovery medium. Due the importance of this gene in the innate immunity of plants, it was necessary to confirm its promoter region in Ecuadorian banana germplasm using molecular techniques. Likewise, due to the time and resources involved in the standardization of protocols, defining long-term cell storage conditions is fundamental, which prompted the evaluation of different concentrations of glycerol and DMSO as cryopreserving agents of transformed *A. tumefaciens*. The results obtained showed that the applied protocols improved transformation efficiency, and that editing is possible due to the presence of this resistance gene in the genome of Cavendish banana varieties. In addition, both glycerol and DMSO can be effectively used as preservative agents at concentrations of 20-30% and 10%, respectively.

Key words: Agrobacterium, transformation, RIN4, cryopreservation