

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS “ESPE”
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**Trabajo de integración curricular previo a la obtención del
título de Ingeniera Biotecnóloga**

**Desarrollo de un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la
edición del promotor del gen RIN4 de banano**

Autor: Mishell Estefania Criollo Lugmaña

Director: Francisco Javier Flores Flor Ph.D.

Fecha: 8 de marzo de 2024





Desarrollo de un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RIN4 de banano

Sección I. Introducción

Sección II. Marco teórico

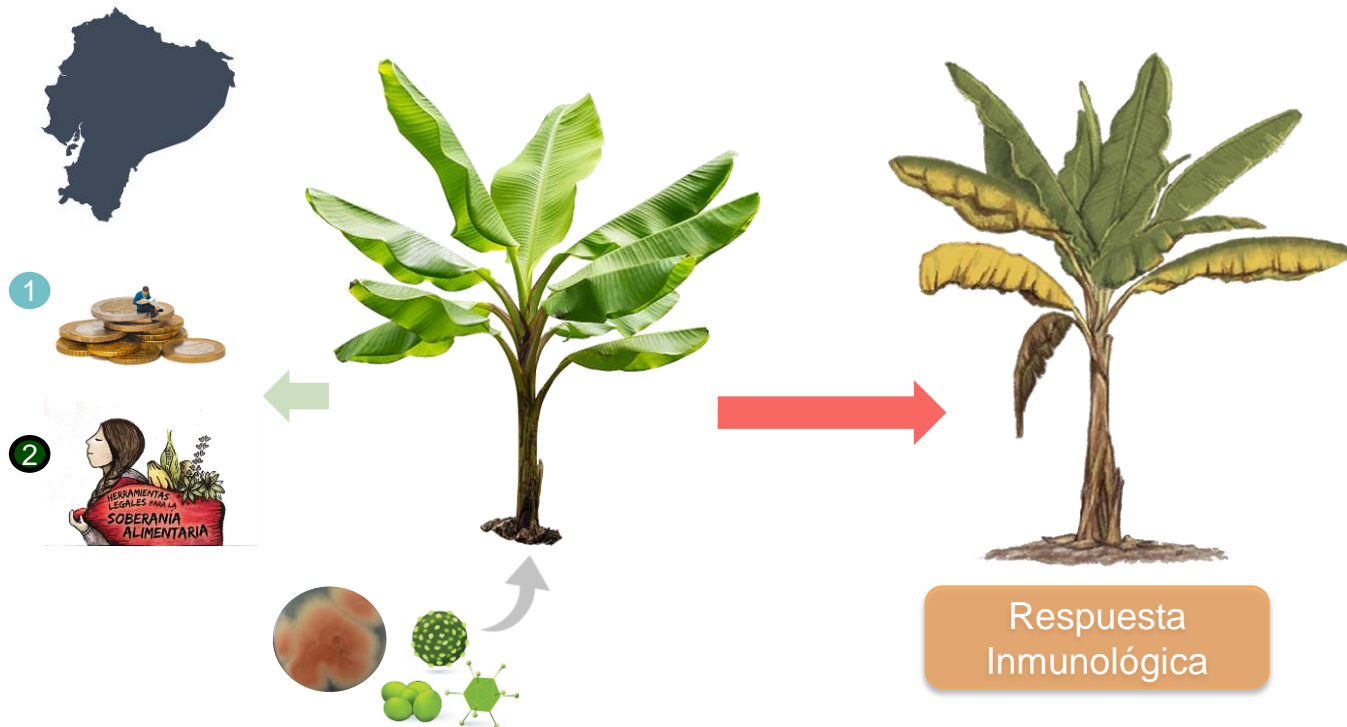
Sección III. Materiales y Métodos

Sección IV. Resultados

Sección V. Conclusiones y Recomendaciones



Formulación del Problema



Mejoramiento Genético

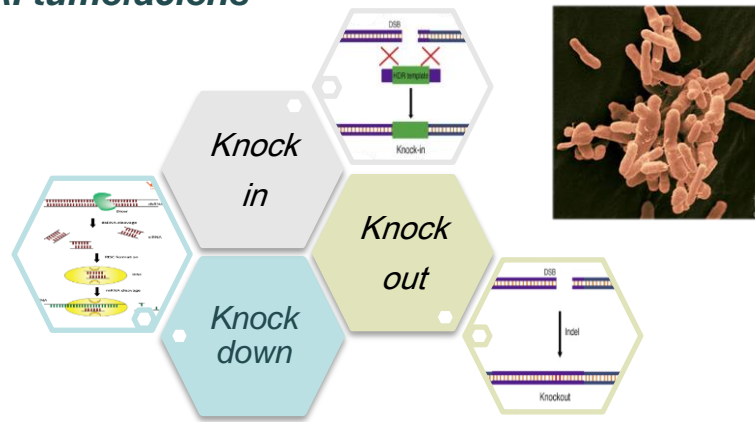
- Sistemas CRISPR-Cas9
- Vectores Binarios
- *A. tumefaciens*



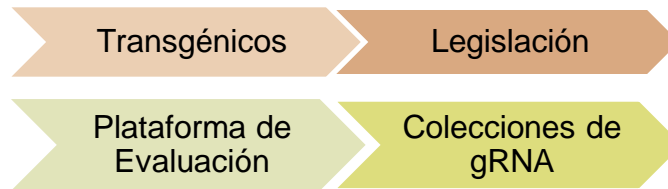
Justificación del Problema



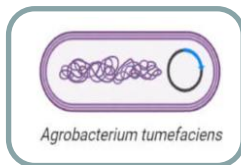
A. tumefaciens



Herramienta de **Modificación genética**



Objetivo General

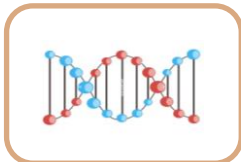


Desarrollar un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RIN4 de banano.

Objetivos Específicos



Transformar *Agrobacterium tumefaciens* con un plásmido que contiene el sistema CRISPR-Cas9 para la edición del promotor del gen RIN4, asociado con la resistencia a la fusariosis en banano



Confirmar la presencia de la región promotora del gen RIN4, en el germoplasma de banano



Estandarizar un protocolo para la conservación de *Agrobacterium* transformada

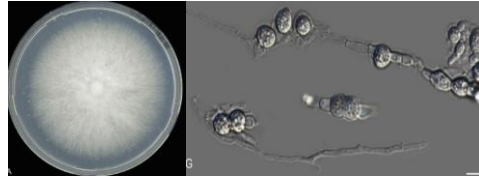
Hipótesis

Existen diferencias significativas en la eficiencia de transformación de *Agrobacterium tumefaciens*, cuando se utilizan diferentes métodos de transformación bacteriana.

- **H0:** Las eficiencias de transformación con ambos métodos son similares.
- **H1:** Las eficiencias de transformación con ambos métodos no son similares.



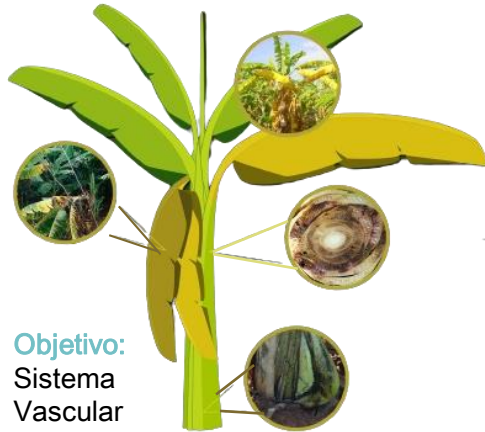
Fusariosis



Recuperado de: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7092>

FOC RT4

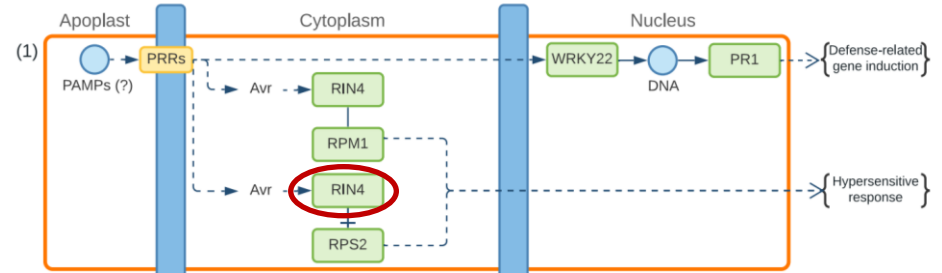
Amplio rango de infección



Objetivo:
Sistema Vascular

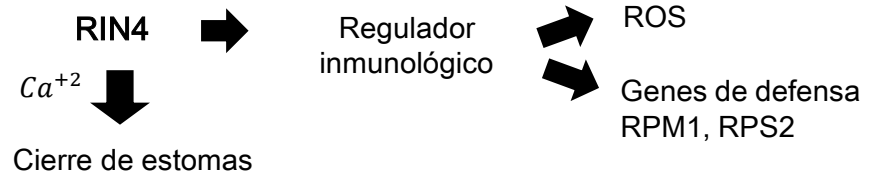
Inmunidad en Plantas de Banano

MAMP ← Inmunidad Innata

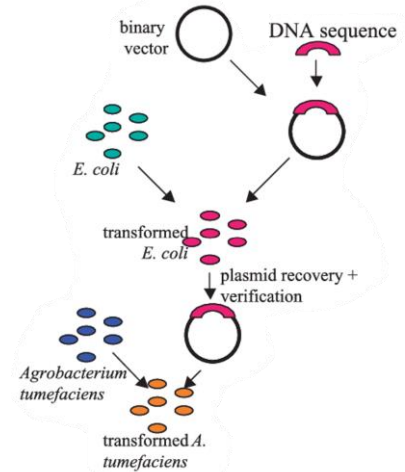
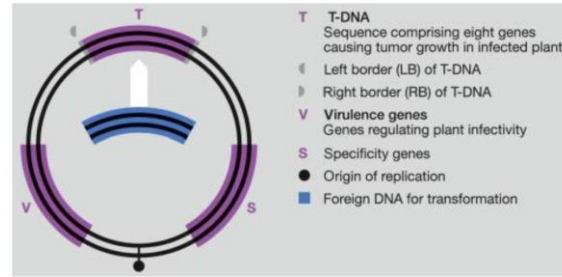
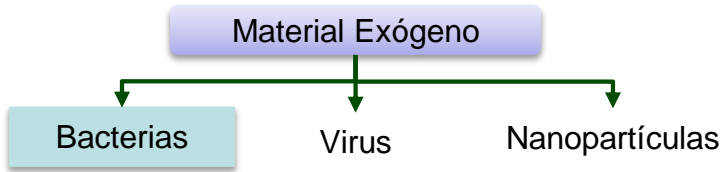


Rutas metabólicas que participan en el mecanismo de defensa contra FOC RT4 tras la interacción planta patógeno. Recuperado de: http://repositorio.ikjam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKJAM/630

Mecanismos de Señalización



Mejora Genética

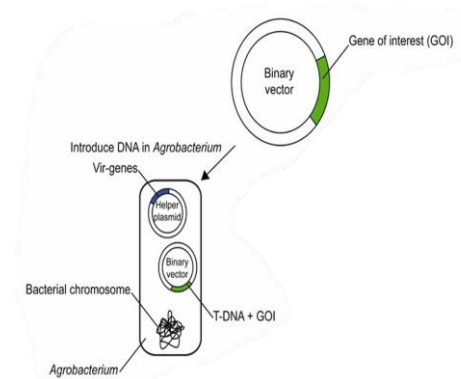
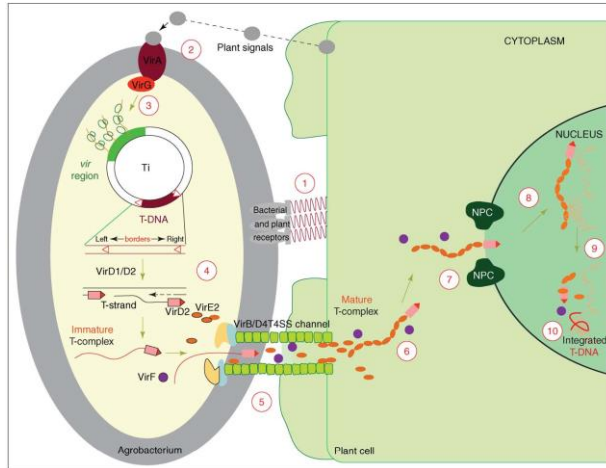


Agrobacterium tumefaciens



Genes VIR

Plásmido Ti



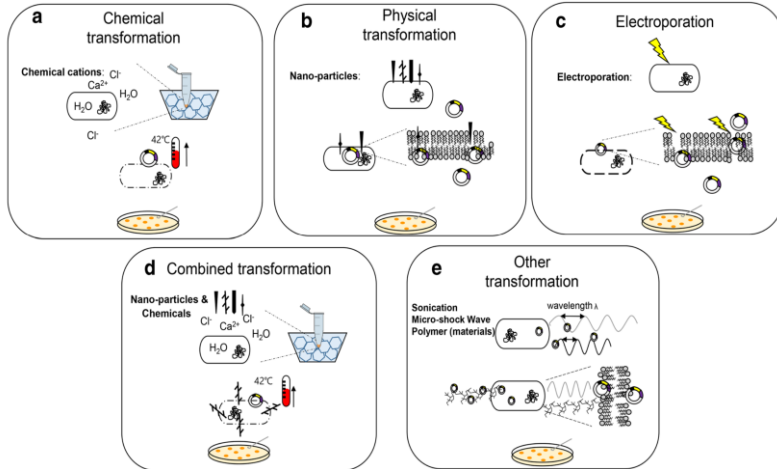
Vectores de clonación:

- Plásmido GOI: Gen de interés
- Plásmido helper

Transformación Bacteriana

ADN exógeno

Células Competentes



Recuperado de: (Ren et al., 2019)

Objetivo: Permeabilizar la membrana

Crioconservación

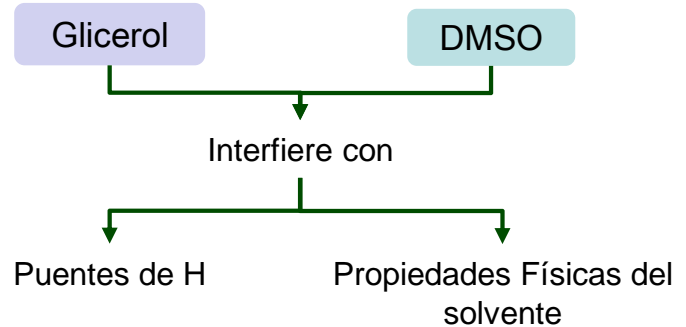
Viabilidad Celular

Estabilidad genética

Eficiencia celular

Agentes Crioprotectores

Objetivo: Proteger la membrana celular

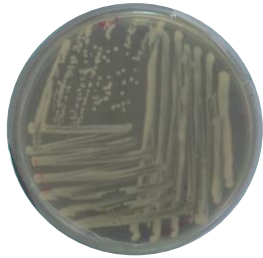


Material Biológico

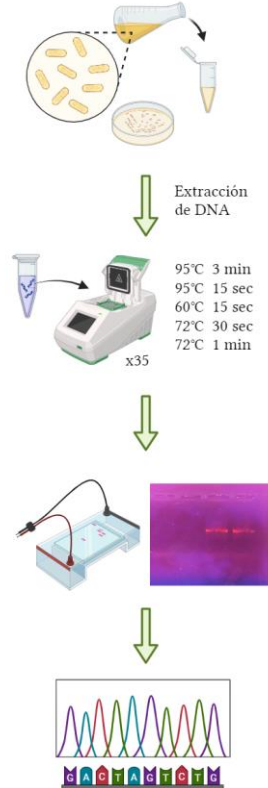
E. Coli DH5α

- Medio Luria Bertani (LB)
- T°: 37 °C

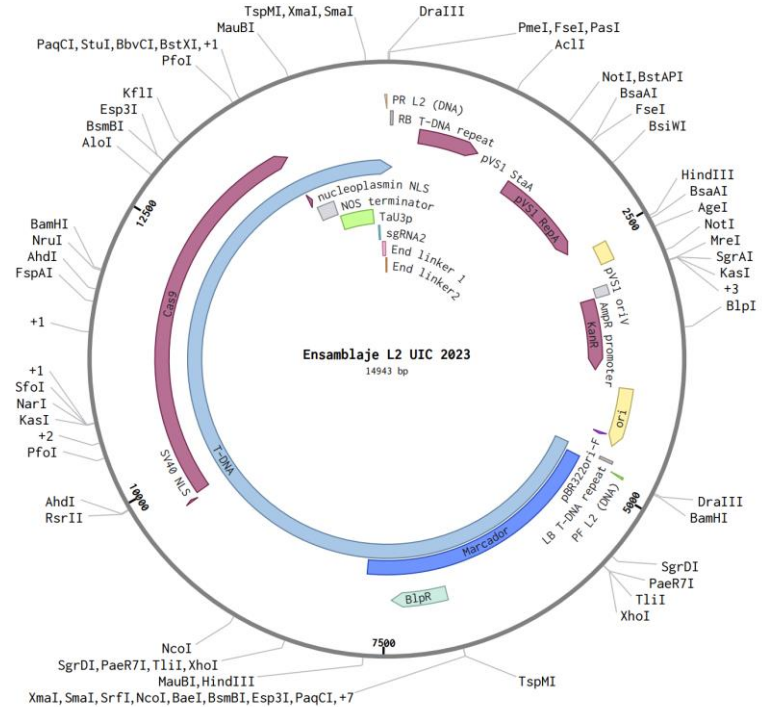
A. tumefaciens AGL1



- Medio enriquecido 523
- T: 29°C



Material Genético



Verificación del material genético

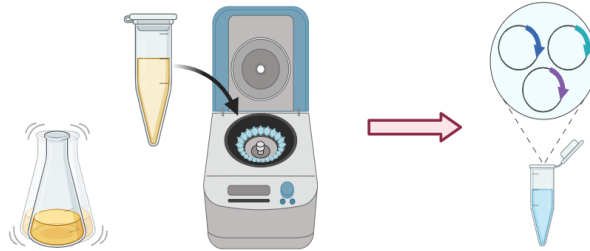
Extracción de DNA plasmídico: Protocolo de lisis alcalina

Suspensión

Lisis

Precipitación

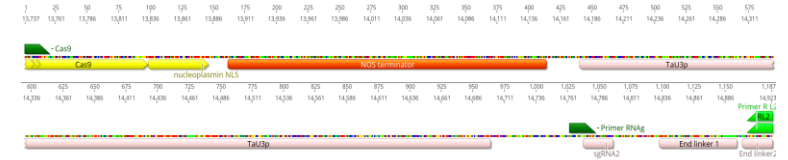
Elución



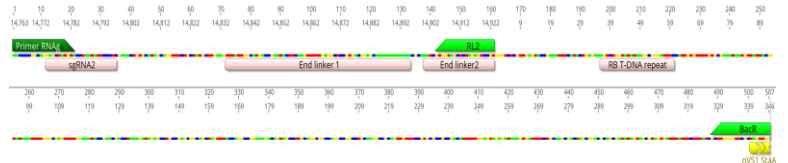
Identificación de regiones a amplificar

N°	Región a amplificar	Tamaño pb	Primers	Propiedades	
				% GC	Tm (°C)
1	Cas9 + Terminador (Fig. 3)	1187	Forward: ATACGTCCACCAAGGAGGTT Reverse: TCGGTCACATGTGCATCCTC	50	61
2	RNAg + Backbone (Fig. 4)	507	Forward: TTCCCGGCTGGTGCATAGAT Reverse: CCTTCATGCTTCCCCTTGC	57.1	63.7
3	Cas9 + Backbone (Fig. 5)	1533	Forward: ATACGTCCACCAAGGAGGTT Reverse: CCTTCATGCTTCCCCTTGC	50	61

Región 1: 1187



Región 2: 507

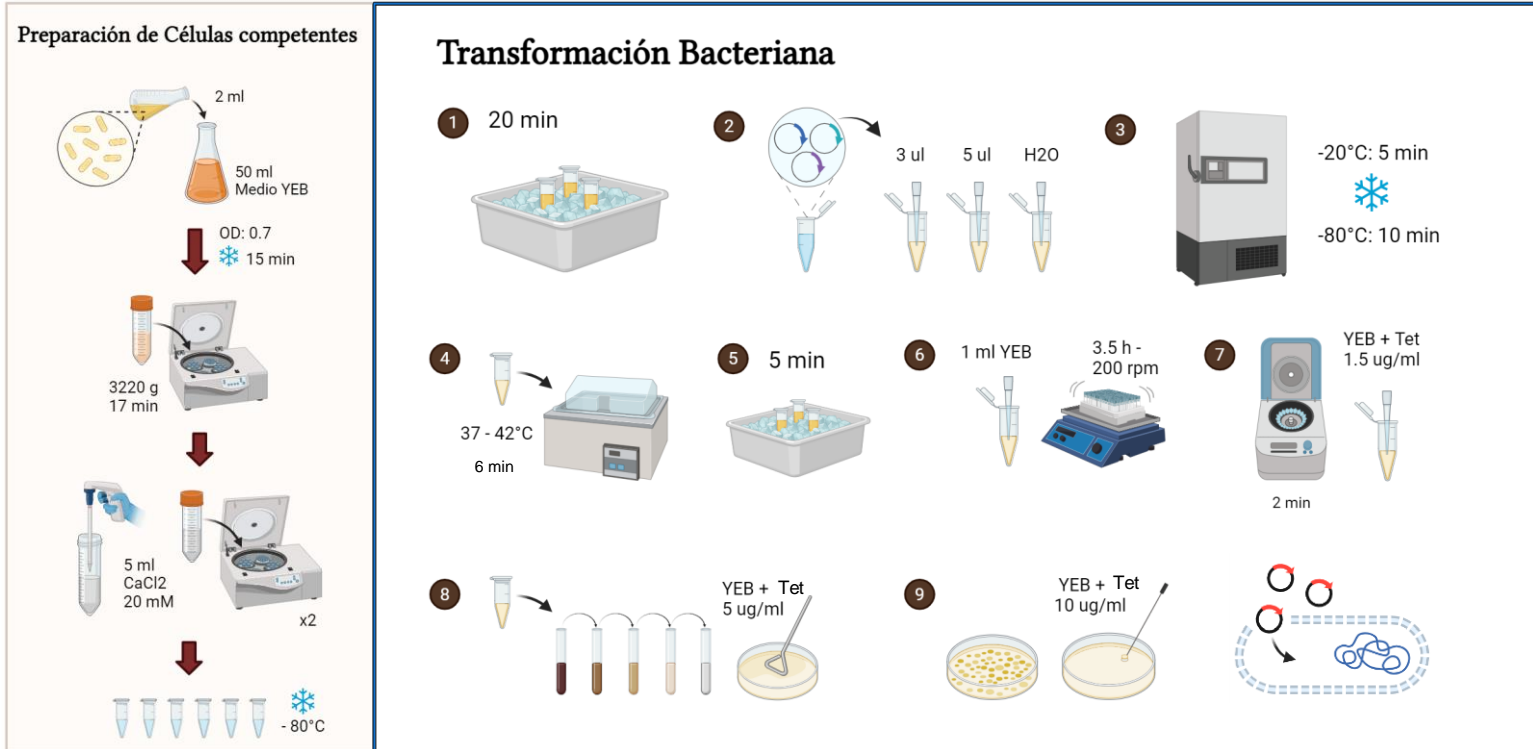


Región 3: 1533



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Transformación de *A. tumefaciens*: Shock Térmico



Wyrzykowska et al., (2016) Wise et al., (2006b), X. Liu et al., (2014)

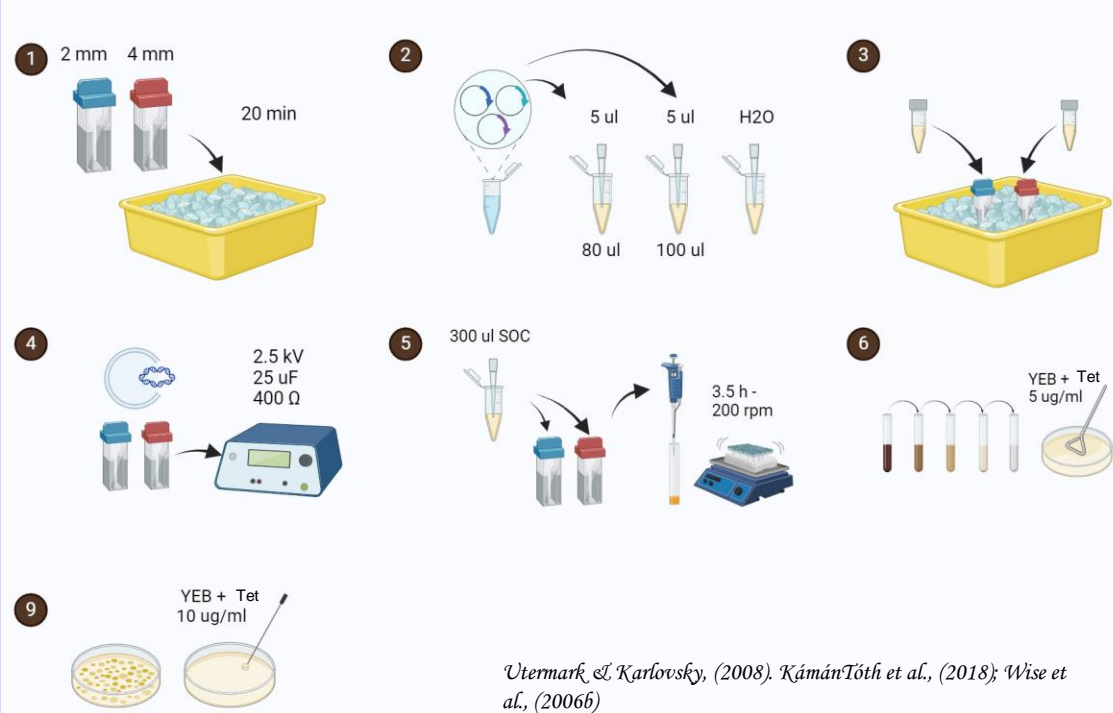


Transformación de *A. tumefaciens*: Electroporación

Preparación de Células competentes



Transformación Bacteriana



Análisis Experimental

Tabla 1. Tratamientos de transformación bacteriana

N°	Descripción
1	Shock térmico con un volumen de 5 ul de ADN plasmídico
2	Shock térmico con un volumen de 3 ul de ADN plasmídico
3	Electroporación en celda de 0.2 cm
4	Electroporación en celda de 0.4 cm
5	Control con agua

$$Y_{ij} = \mu + t_i + B_i + e_{ij}$$

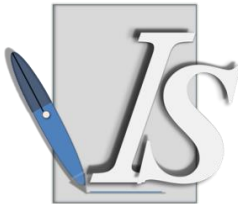
Y_{ij} = Cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) transformadas de *A. tumefaciens* contadas en placa.

μ = Media general de la cantidad de UFC

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

B_i = efecto de i-ésimo bloque

e_{ij} = error asociado a la ij-ésima unidad experimental.



Supuestos

Normalidad
Homocedasticidad



ANOVA

Prueba F



Tukey

Nivel de confianza
95% . $\alpha=0.05$



Verificación de la región de interés

Tabla 2. Reactivos para la PCR

Reactivo	Vol. (ul)
2X BlasTaq™ PCR MasterMix	12.5
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
ADN (100 ng/ul)	1
DMSO 5%	1
Agua	8.5

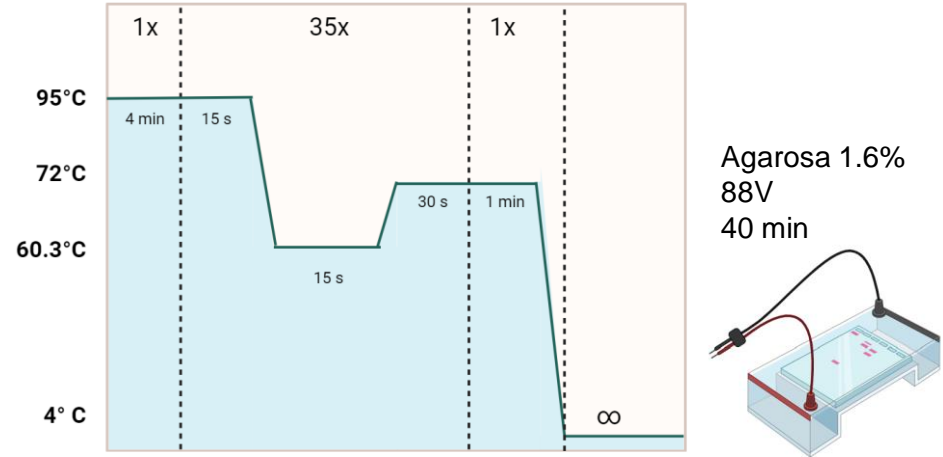
Forward ATACGTCCACCAAGGAGGT

Reverse CCTTCATGCTTCCCCTTGC

Temperatura de Alineamiento

$$T_a = 0.3 (T_{m \text{ primer}}) + 0.7 (T_{m \text{ producto}}) - 14.9$$

(Álvarez-Fernández, 2013)



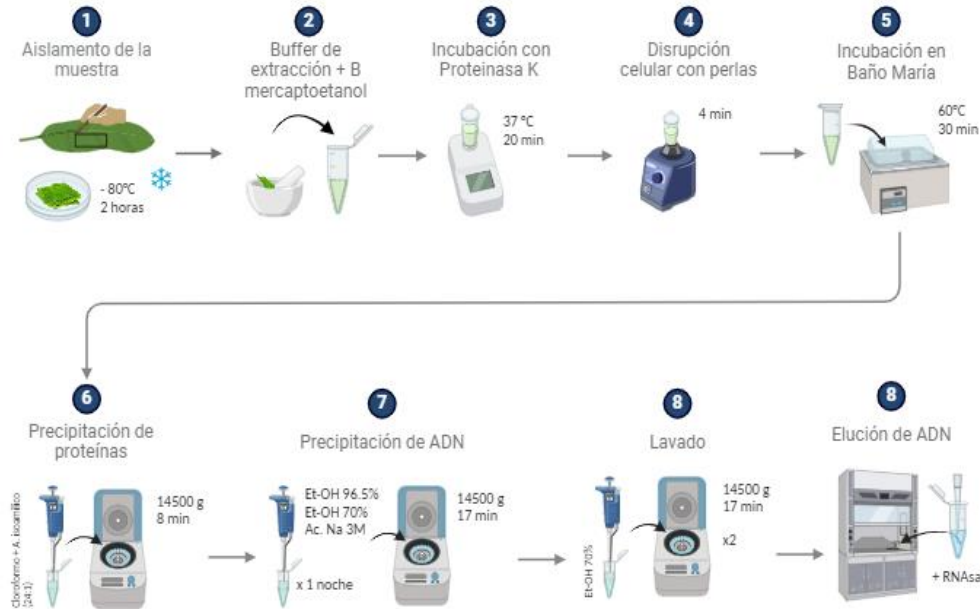
Eficiencia de transformación

$$TE = \frac{\text{Número de unidades formadoras de colonias (UFC)}}{\text{cantidad (in ug) de ADN plasmídico}}$$

$$\text{Masa total de pDNA} = \frac{(\text{Masa total de pDNA usado})(\text{Volumen de dispensado en placa})}{\text{Volumen total de la suspensión}}$$

Confirmación de la secuencia de interés en el germoplasma de banano

1. Extracción de ADN genómico



2. Cuantificación de ADN

3. Diseño de primers

Musa acuminata

Taxid: 4641

Gen RIN4

ID: 103978139

Cromosoma 3

Promotor

600 pb aguas arriba del CDS



Tabla 3.

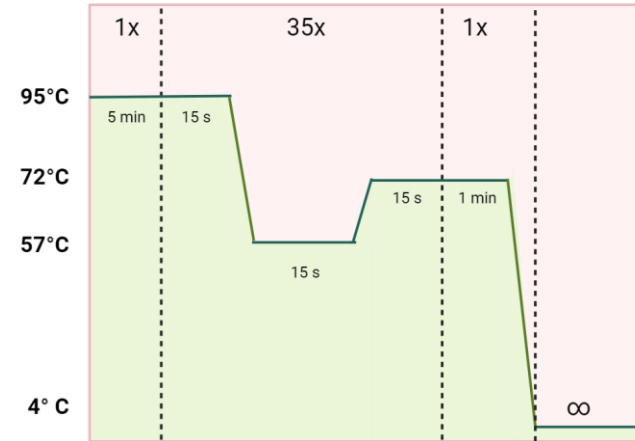
Primers diseñados para la región promotora del gen RIN4

Primer	Secuencia	% GC	Tm
Forward	TTGCCATCCAAGTCCAAGA	50	61.9
Reverse	TACGAGAATGGGTGTTGCCA	50	61.3

Verificación de la región de interés

Tabla 3. Reactivos para la PCR

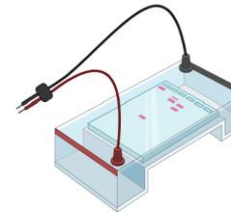
Reactivo	Vol. (ul)
2X BlasTaq™ PCR MasterMix	12.5
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
ADN (100 ng/ul)	1
Agua	9.5



Verificación en gel

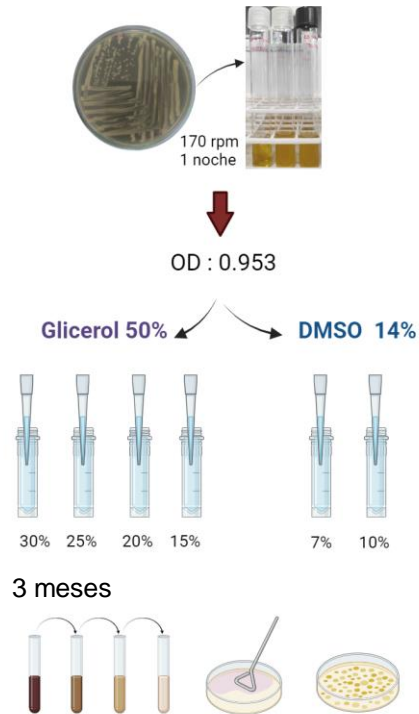
Temperatura de Alineamiento

$$T_a = 0.3 (T_{m_{primer}}) + 0.7 (T_{m_{producto}}) - 14.9$$



Agarosa 2%
90 V
45 min

Almacenamiento a largo plazo



$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Y_{ij} = Cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC)

de *A. tumefaciens* contadas en placa.

μ = Media general de la cantidad de UFC

t_i = efecto del i -ésimo tratamiento para la crioconservación de *A. tumefaciens*

e_{ij} = error asociado a la ij -ésima unidad experimental.



Supuestos

Normalidad
Homocedasticidad



ANOVA

Prueba F



Tukey

Nivel de confianza
95% . $\alpha \leq 0.05$

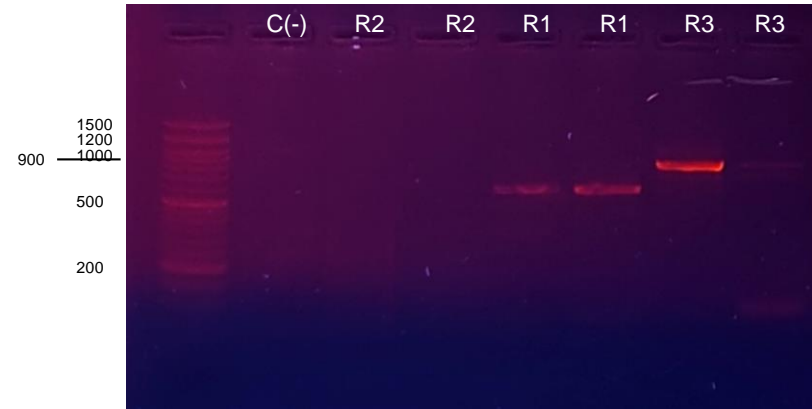
Verificación del material genético

Tabla 6.

Resultados de la extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

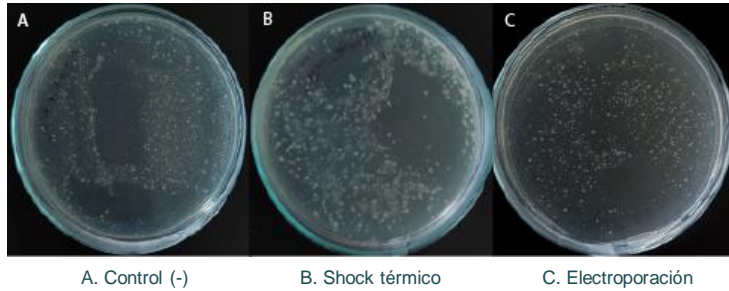
Muestra	Concentración (ug/ml)	A260/280	A260/230
MID1	2882	1.837	1.824
M1D2	1332	2.047	2.07
MT1	2029	2.024	1.968
M1	3331	1.897	1.964
M2D	1837	2.001	1.850

Región	Tamaño visualizado
R1: Cas9 + Terminador	600
R2: gRNA + Backbone	No se visualizó
R3: Cas9 + Backbone	900

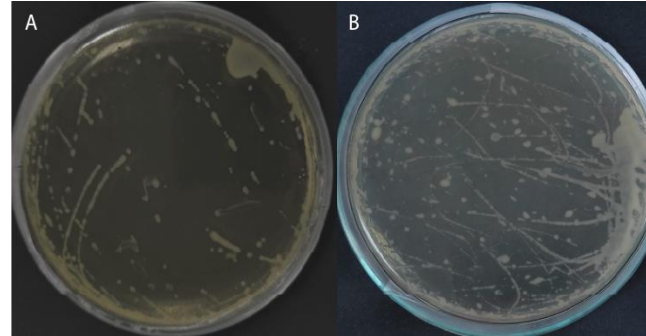
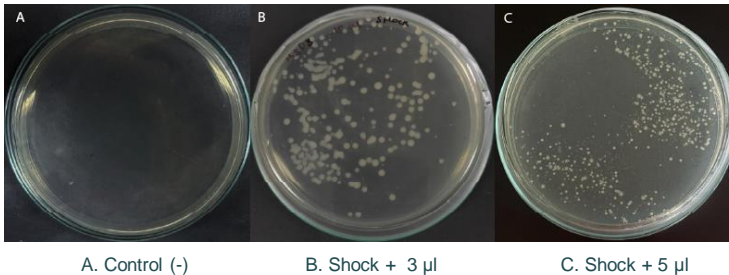


Transformación de *A. tumefaciens*

UFC de *A. tumefaciens* luego de la transformación en medio LB + Kan 50 mg/mL



Colonias transformadas por shock térmico



Colonias transformadas por Electroporación

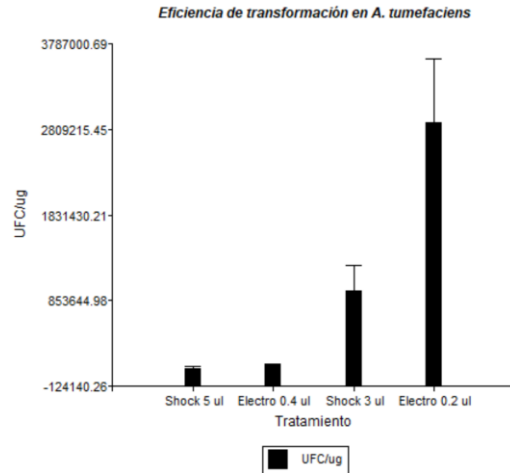
Tabla 7.

Análisis comparativo de Tuckey de la eficiencia de transformación para *A. tumefaciens*, tras la aplicación de dos métodos distintos.

Tratamiento	Medias	
Shock 3 ul	969555.56	A
Shock 5 ul	76600	A
Electroporación 0.4 cm	124000	A
Electroporación 0.2 cm	2881666.67	B

Nota: Media con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Transformación de *A. tumefaciens*



Eficiencia:

- F. externos e internos
- Preparación de células competentes
- Concentración de pDNA
- Medios de recuperación

Tabla 8.

Número de colonias transformadas mediante el método de Shock térmico.

Volumen de ADN	Réplica	N° Colonias	UFC/ml	TE (UFC/ug)
3 ul	1	144	7.20×10^8	1.2×10^6
	2	158	7.9×10^8	1.32×10^6
	3	294	5.88×10^8	3.92×10^5
5 ul	1	254	2.54×10^7	5.08×10^4
	2	283	2.8×10^7	5.66×10^4
	3	153	3.06×10^8	1.2×10^5

Gradiente de T° vs. T° Constante (Gómez Arias et al., 2018)

Tabla 9.

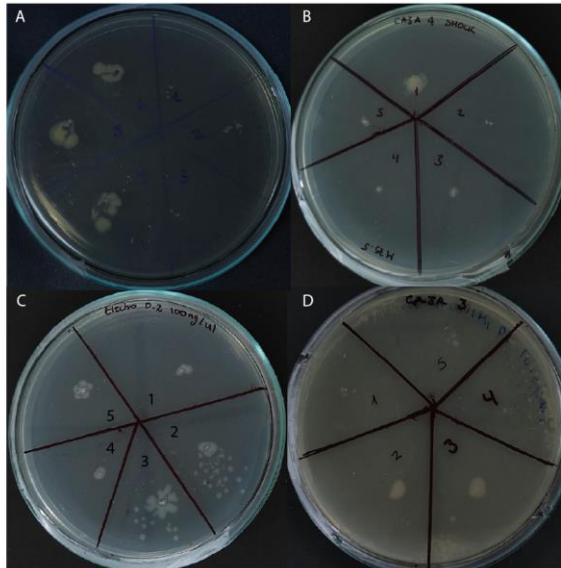
Número de colonias transformadas mediante el método de Electroporación.

Tamaño de la celda de electroporación	Réplica	N° Colonias	UFC/ml	TE (UFC ug)
0.2 cm	1	190	1.09×10^9	3.8×10^6
	2	170	1.7×10^9	3.4×10^6
	3	289	1.4×10^9	1.4×10^6
0.4 cm	1	174	3.48×10^8	1.4×10^5
	2	154	3.08×10^8	1.2×10^5
	3	137	2.74×10^8	1.1×10^5

Nota: Los resultados se calcularon para un volumen de 1ml.

Voltaje, pulso eléctrico

Transformación de *A. tumefaciens*

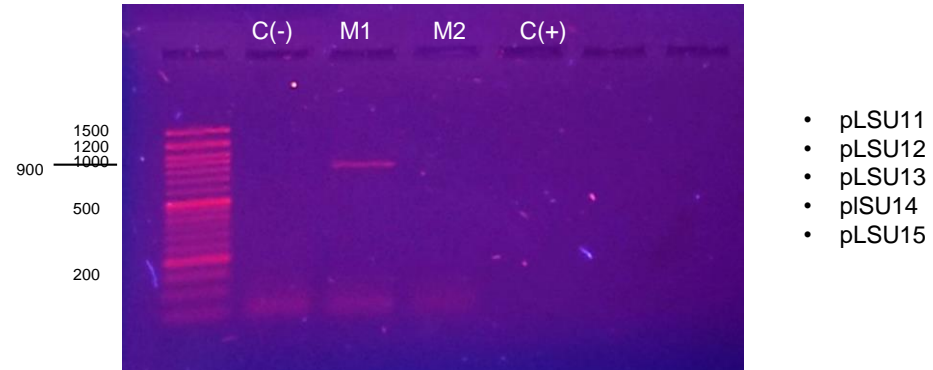


Nota: Colonias de *A. tumefaciens* seleccionadas al azar en medio LB suplementado con Tet-10ug/ml. A) Aislamiento de colonias de la transformación mediante shock térmico con 3 ul y B) 5ul de ADN plasmídico. C) Aislamiento de colonias de la transformación mediante electroporación en celdas de 0.2 cm y B) 0.4 cm.

Tabla 10.

Cuantificación de ADN plasmídico de *A. tumefaciens*

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	A 260/280	A 260/230
E2	3030	1.913	2
E2.1	2883	2.032	2.108
E4	1653	2.051	2.135
E4.1	3233	1.837	1.889
S3	3026	2.015	2.150
S3.1	3286	2.096	1.953
S5	3343	1.955	2.057
S5.1	2987	1.988	1.980



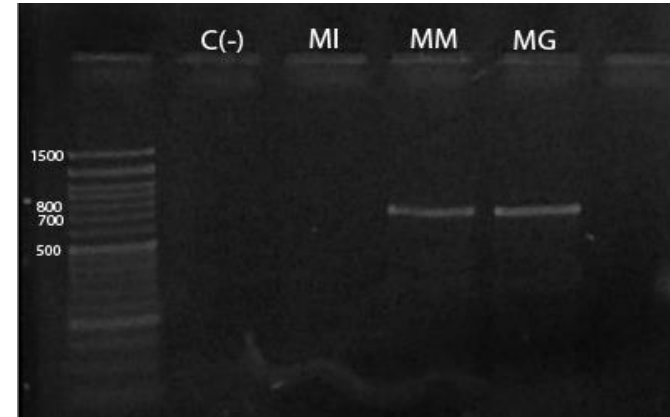
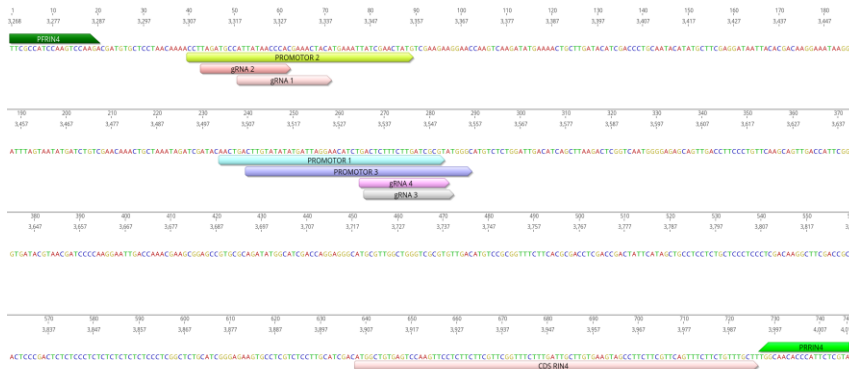
Verificación de la región promotora del gen RIN4 en el germoplasma de banano

Tabla 11.

Extractos de ADN de banano

Muestra	Concentración ug/ml	A(260/280)	A (260/230)
Banano de Guayaquil	1554	2.1	1.7
	1234	2.1	1.62
Banano de Machala	1800	2.03	1.6
	1554	2.1	1.7
Banano de INIAP-Pichilingue	431.5 ug/ml	2.1	0.9
	17.83	1.9	1.8

PCR in silico

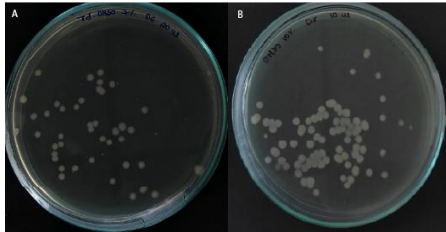


746 pb

- Calidad de la muestra
- Variabilidad genética en plantas – organismos triploides

Crioconservación – Evaluación de la viabilidad celular

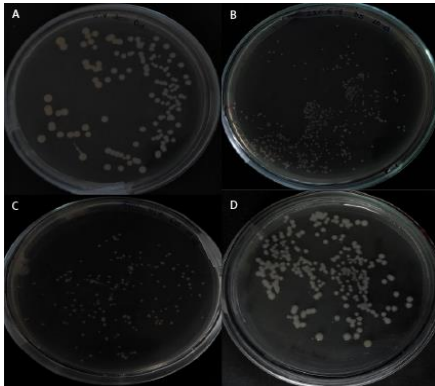
Crecimiento de *A. tumefaciens* con DMSO



A. DMSO 7%

B. DMSO 10%

Crecimiento de *A. tumefaciens* con glicerol



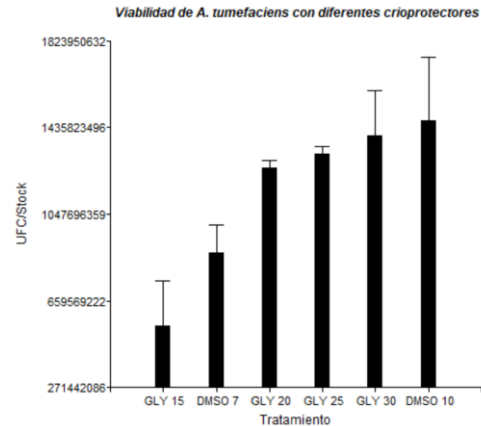
Glicerol: A) 30%, B) 25%, C) 20%, D) 15%

Tabla 12.

Análisis de Tukey del número de UFC obtenidas tras la crioconservación de *A. tumefaciens*

Tratamiento	Medias	n	E.E	
GLY 15	5.45E+08	3	1.39E+08	A
DMSO 7	8.75E+08	3	1.39E+08	A B
GLY 20	1.26E+09	3	1.39E+08	B
GLY 25	1.32E+09	3	1.39E+08	B
GLY 30	1.4E+09	3	1.39E+08	B
DMSO 10	1.47E+09	3	1.39E+08	B

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Gly = glicerol, DMSO = Dimetilsulfóxido



- Viabilidad celular
- Dosis y citotoxicidad

- La presente investigación propone un protocolo de transformación de *Agrobacterium tumefaciens*, mediante los métodos de shock térmico y electroporación. Siendo, más eficientes cuando se utiliza una densidad óptica de 0.8 a 1, una concentración de 100 ng/ul de ADN plasmídico, y un medio de recuperación SOC o con agentes osmóticos como la sacarosa presente en el medio YEB.
- Se encontró diferencias significativas en la eficiencia de transformación derivada los tratamientos aplicados, alcanzándose una mayor cantidad de UFC/ug mediante el proceso de electroporación de 0,2 cm.
- Se confirmó la presencia de la región promotora del gen RIN4, mediante la verificación en gel de un fragmento de 746pb, en el 66,6% de las muestras de banano Cavendish analizadas.
- Se estandarizó un protocolo de transformación de cepas transformadas de *A. tumefaciens* mediante el uso de glicerol y DMSO, los cuales mostraron ser agentes de crio conservación eficaces durante el periodo de evaluación.

- Previo al proceso de transformación es recomendable la verificación del material genético a utilizar. Por lo tanto, es pertinente la secuenciación del vector binario ensamblado.
- Durante los proceso de transformación se sugiere utilizar ADN de alta calidad al igual que respetar los tiempos de incubación y considerar el estado de las células competentes para favorecer la recepción de ADN exógeno.
- Para el proceso de extracción vegetal, es ideal contar con muestras frescas provenientes de hojas jóvenes así como evitar los procesos de oxidación de los tejidos tanto en el transporte como en la molienda de la muestra.





ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Desarrollo de un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RIN4 de banano

- Francisco Flores Ph. D.
- Laboratorio de Investigación de Microbiología
- Laboratorio de Inmunología
- Laboratorio de Docencia de Biotecnología
- Laboratorio de Biotecnología Vegetal



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA