



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

Pachala Ortiz Dustin Adrián

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

## Resultados de la herramienta para análisis de similitud de contenidos

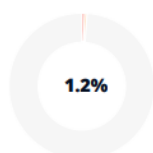
### Scan details

Scan time:  
March 5th, 2024 at 12:56 UTC

Total Pages:  
36

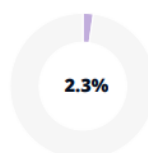
Total Words:  
8995

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.6%	58
Minor Changes	0%	0
Paraphrased	0.5%	49
Omitted Words	0%	0

### AI Content Detection



Text coverage		Words
AI text	2.3%	210
Human text	97.7%	8785

[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 RGA2 de banano**” fue realizado por el señor **Pachala Ortiz Dustin Adrián**, 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, 05 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 la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Responsabilidad de auditoría**

Yo, **Pachala Ortiz Dustin Adrián**, con cédula de ciudadanía n° **0705339158**, 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 RGA2 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, 05 de marzo de 2024



---

**Pachala Ortiz Dustin Adrián**

**C.C: 0705339158**



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

**Carrera de Biotecnología**

**Autorización de publicación**

Yo, **Pachala Ortiz Dustin Adrián**, con cédula de ciudadanía n° 0705339158, 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 RGA2 de banano"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 05 de marzo de 2024



---

**Pachala Ortiz Dustin Adrián**

**C.C: 0705339158**

### **Dedicatoria**

A mi madre y a mi padre, por ser los pilares fundamentales en mi vida, por haberme permitido cumplir mi sueño de ser científico, por no dejar de creer en mí.

A mi hermano, por haberme enseñado a no desistir en la búsqueda de cumplir mis sueños.

A mi nana, por ser aquella persona que siempre me tendrá como su pequeño hijo, por haberme educado hasta llegar aquí.

A mis abuelitos, que en paz descanses, por todos sus consejos, historias y por haberme mostrado lo lindo de la vida.

A Dios y la Virgen María, por bendecirme en cada paso de mi vida y mi carrera profesional

A mi primo Michel Soria, por ser mi ejemplo a seguir, por ser un guía en la trayectoria de completar mi carrera profesional.

A mis tías Yolanda Ortiz, Alicia Pachala y Carmen Betancourt, por todo el apoyo brindado psicológica y mentalmente a lo largo de mi trayectoria.

A mi familia en general, por ser quienes me han enseñado a través de la vida lo que significa valorar el día a día.

## **Agradecimientos**

En primera instancia al Dr. Francisco Flores, por sus enseñanzas, por su apoyo, por ser un excelente guía del proyecto, por su mentoría y más que todo, por su comprensión. Quiero dejar plasmada mi admiración total por ser de los mejores científicos que la vida me ha puesto en mi camino, con la bendición de que fue mi tutor del trabajo de titulación.

A Silvana Granda, por su paciencia y apoyo en todo el proceso de trabajo de titulación. Mi inmensa admiración por su dedicación y compromiso con el apoyo del proyecto de titulación.

A Alma Koch Kaiser, por todo.

Al Dr. Carlos Bolaños Carriel, por todo su apoyo en mis pasantías en el INIAP. De no haber sido por su mentoría, sus consejos y enseñanzas, no hubiera entendido el concepto de amar a la ciencia. Quiero dejar plasmado mi total admiración, por ser de los mejores científicos que la vida me ha permitido conocer.

A mis compañeros de trabajo de titulación, Mishell Criollo y Steven Maxi, por su apoyo, paciencia, por su mentoría, por no haberme dejado desistir, realmente estoy muy agradecido con ustedes. Además, me gustaría dejar plasmado mi total admiración por ustedes y su compromiso en el trabajo de titulación.

A todo el departamento de Protección Vegetal del INIAP, por haberme dado la oportunidad de aprender todo lo necesario sobre Fitopatología, por sus enseñanzas, por la excelente convivencia, por haberme permitido aprender y formar parte de su gran familia. En especial, quiero agradecer a la Dr. Maria Luisa Insuasti, por la oportunidad de realizar prácticas en tan prestigiosa institución.

A la Dr. Claudia Segovia y la Dr. Blanca Naranjo, por sus enseñanzas, consejos, por haberme abierto un espacio para poder expresarme, por no dejarme caer, por ser las mejores profesoras que me ha tocado en la vida.

A mis amigos José Terán, Josué Calderón, Uwe Nickelsen, Paul Rosero, José Barragán y Jefferson Párraga, por haberme apoyado en toda esta trayectoria, por no haberme dejado renunciar a mis sueños, por siempre estar allí presentes. Siendo honesto soy muy afortunado de tenerlos como los mejores amigos que la vida me haya dado.

A mis amigas Karolay Hernández, Teresa Ochoa, Diana Zambrano, Viviana Caiza, Anabella Narvaez y Stephanie Hernández, por todo su apoyo a lo largo de mi carrera, por estar presentes siempre en los momentos decisivos de la universidad y por su grandiosa amistad.

A mis amigos que han formado parte de toda esta hermosa experiencia: Javier, Mayté, Michael, Massiel, Jhon, Joel, Adolfo, Carlos, Ariana, Melanie, Dagmar, Joao, Jonathan, Nicole y Ricardo.



## Índice de Contenido

Resultados de la herramienta para análisis de similitud de contenidos.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Auditoría.....	4
Autorización de publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de Tablas.....	13
Índice de Figuras .....	14
Resumen.....	15
Abstract .....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Formulación del problema .....	17
Justificación del problema.....	17
Objetivos.....	18
Objetivo General.....	18
Objetivos específicos.....	18
Hipótesis.....	18
Capítulo II: Marco Teórico .....	18
Fitopatógeno: <i>Fusarium oxysporum</i> (FOC R4T) .....	18
Taxonomía.....	19

Síntomas de la enfermedad.....	19
Susceptibilidad del banano .....	20
Control del fitopatógeno .....	20
Gen de resistencia RGA2 .....	22
Técnicas de transformación.....	22
Choque térmico .....	23
Electroporación.....	23
Técnicas de Crioconservación.....	23
Crioconservación a través de glicerol. ....	24
Crioconservación a través de dimetilsulfóxido (DMSO). ....	24
Crioconservación a través de polietilenglicol.....	25
Capítulo III: Materiales y métodos .....	25
Diseño de primers .....	25
Extracción de ADN plasmídico de <i>E. Coli</i> . ....	26
Confirmación del plásmido extraído de <i>E. Coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	27
Preparación de células competentes.....	28
Transformación por choque térmico .....	29
Transformación por electroporación .....	29
Eficiencia de transformación.....	30
Diseño experimental para la viabilidad de crioconservación .....	30
Modelo estadístico para la viabilidad de conservación .....	31

Unidad experimental para la viabilidad de conservación .....	31
Variables .....	31
Hipótesis .....	31
Extracción de ADN de banano.....	31
Confirmación del gen de resistencia RGA2.....	32
Crioconservación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	33
Viabilidad de crioconservación .....	33
Diseño experimental para la viabilidad de crioconservación .....	34
Modelo estadístico para la viabilidad de conservación .....	34
Unidad experimental para la viabilidad de conservación .....	34
Variables .....	34
Hipótesis .....	35
Capítulo III: Resultados .....	35
Diseño de primers in silico para la identificación de la región promotora del gen de resistencia RGA2 .....	35
Extracción de plásmido RGA2.....	36
Amplificación del plásmido conteniendo el gen RGA2.....	38
Evaluación de la eficiencia de transformación (ET) de las cepas de <i>A. tumefaciens</i> con el plásmido que contiene el gen RGA2 .....	39
Comprobación de la transformación de las cepas de <i>A. tumefaciens</i> con el plásmido que contiene el gen RGA2.....	41

Diseño experimental: eficiencia de transformación.....	42
Presencia del gen RGA2 en muestras de banano.....	44
Viabilidad de crioconservación de cepas de <i>A. tumefaciens</i> .....	45
Diseño experimental: viabilidad de crioconservación .....	48
Capítulo IV: Discusión .....	49
Capítulo V: Conclusiones .....	54
Capítulo VI: Recomendaciones .....	55
Capítulo VII: Referencias Bibliográficas .....	56

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Diseño de primers para la confirmación de la presencia de la región promotora .....	25
<b>Tabla 2.</b> Diseño de primers para la confirmación de la presencia de la región promotora en banano.....	26
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos para evaluar la eficiencia de transformación .....	30
<b>Tabla 4.</b> Tratamiento para evaluar la viabilidad de crioconservación.....	34
<b>Tabla 5.</b> Cuantificación de ADN plasmídico extraído a partir de cepas de <i>E. coli</i> .....	37
<b>Tabla 6.</b> Resultados de la eficiencia de transformación para choque térmico .....	39
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la eficiencia de transformación para electroporación .....	40
<b>Tabla 8.</b> Cuantificación de ADN plasmídico extraído a partir de cepas de <i>A. tumefaciens</i> .....	41
<b>Tabla 9.</b> Cuantificación de ADN de muestras de banano .....	44
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la viabilidad de crioconservación de cepas de <i>A. tumefaciens</i> .....	45

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Primers para la identificación de la región promotora del gen de resistencia RGA2 ..	35
<b>Figura 2.</b> Primers para la identificación de la región promotora del gen de resistencia RGA2 en banano.....	36
<b>Figura 3.</b> Electroforesis para la confirmación de la presencia de la región promotora del gen RGA2 .....	38
<b>Figura 4.</b> Colonias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas por el método de electroporación.....	40
<b>Figura 5.</b> Colonias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas por el método de choque térmico.....	41
<b>Figura 6.</b> Electroforesis para la confirmación de la presencia del promotor del gen RGA2 en cepas transformadas .....	42
<b>Figura 7.</b> Resultados del ANOVA y análisis Test Tukey para la eficiencia de transformación...	43
<b>Figura 8.</b> Medidas de resumen y análisis de gráfico de barras para la eficiencia de transformación.....	43
<b>Figura 9.</b> Electroforesis para la confirmación de la presencia del gen RGA2 en muestras de banano.....	44
<b>Figura 10.</b> Crecimiento de cepas de <i>A. tumefaciens</i> crioconservadas en glicerol.....	46
<b>Figura 11.</b> Crecimiento de cepas de <i>A. tumefaciens</i> crioconservadas en DMSO.....	47
<b>Figura 12.</b> Crecimiento de cepas de <i>A. tumefaciens</i> crioconservadas en polietilenglicol.....	47
<b>Figura 13.</b> Resultados del ANOVA y análisis Test Tukey para la viabilidad de crioconservación .....	48
<b>Figura 14.</b> Gráfico de barras y medidas de la viabilidad de crioconservación.....	49

## Resumen

*Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 4 (FOC R4T) es un fitopatógeno que, en la actualidad, se presenta como un problema grave para los sembríos de banano en latinoamérica, debido a que causa necrosis en la planta, lo que produce su marchitez y su deceso. Al ser un fitopatógeno letal de musáceas, esta investigación busca desarrollar un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RGA2 de banano, con el fin de sobreexpresar la resistencia que provoca este gen ante FOC R4T

El siguiente trabajo pretende transformar *Agrobacterium tumefaciens* a partir de la extracción del ADN plasmídico de *Escherichia coli* transformado a partir de los trabajos de titulación del semestre pasado, que contiene el gen RGA2. Para ello, se aplicó el choque térmico y la electroporación como métodos de transformación genética y se evaluó la eficiencia de transformación de estos a través de la relación de la CFU sobre la cantidad de ADN plasmídico insertado. Además, se confirmó la presencia de la región promotora en el germoplasma del banano a través de técnicas moleculares. Por último, se evaluó la viabilidad de crioconservación de tres agentes crioprotectores (glicerol, DMSO, polietilenglicol) a diferentes concentraciones (10% y 20%), para la conservación de *A. tumefaciens*. Los resultados obtenidos muestran la eficiencia de transformación de los protocolos estandarizados que se aplicaron, siendo la electroporación el método más eficiente. Así mismo, se muestra la viabilidad de conservación de los crioprotectores aplicados, determinando que los tres crioprotectores aplicados son eficientes para la crioconservación de *A. tumefaciens*.

*Palabras clave:* fitopatógeno, fusariosis, transformación.

### Abstract

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (FOC R4T) is a phytopathogen that is currently a serious problem for banana plantations in Latin America, because it causes plant necrosis, which leads to wilting and death. Being a lethal phytopathogen of musaceae, this research seeks to develop a binary vector system of *Agrobacterium tumefaciens* for editing the promoter of the RGA2 gene of banana, to overexpress the resistance caused by this gene to FOC R4T.

The following work aims to transform *Agrobacterium tumefaciens* from the extraction of transformed *Escherichia coli* plasmid DNA from last semester's titration work, which contains the RGA2 gene. For this purpose, heat shock and electroporation were applied as genetic transformation methods and the transformation efficiency of these was evaluated through the ratio of CFU over the amount of inserted plasmid DNA. In addition, the presence of the promoter region in banana germplasm was confirmed through molecular techniques. Finally, the cryopreservation viability of three cryoprotective agents (glycerol, DMSO, polyethylene glycol) at different concentrations (10% and 20%) was evaluated for the preservation of *A. tumefaciens*. The results obtained show the transformation efficiency of the standardized protocols applied, being electroporation the most efficient method. Likewise, the viability of conservation of the cryoprotectants applied is shown, determining that the three cryoprotectants applied are efficient for the cryopreservation of *A. tumefaciens*.

**Keywords:** phytopathogen, fusariosis, transformation.



## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

El banano (*Musa sp.*) es un cultivo con una importancia de producción muy alta debido a su impacto económico, considerada uno de los productos agrícolas más importantes a nivel mundial (Gómez et al., 2010). Sin embargo, al igual que en otras especies de musáceas, existen problemas con diferentes fitopatógenos, entre ellos el hongo FOC R4T que, actualmente, es uno de los fitopatógenos que causa fusariosis en los cultivos de banano (López & Castaño, 2019).

Se debe tener en cuenta que, el banano, al ser un monocultivo de exportación con alto interés, presenta muchas limitaciones bióticas que afectan el rendimiento y limitan la variabilidad genética de la especie.

### Justificación del problema

El banano pertenece a las musáceas comestibles, considerado uno de los alimentos más importantes a nivel mundial por sus valores nutritivos, siendo un alimento básico para más de 400 millones de personas. Además, la exportación de banano, desde los países de latinoamérica, ha aportado en un 28% del banano exportado, lo que ha generado empleo, además de su valor alimenticio (Martínez et al., 2020).

En este sentido, el presente proyecto pretende desarrollar un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RGA2 de banano, asociado a la resistencia contra FOC R4T, de tipo putativo de unión a nucleótidos y repetición rica en leucina (NB-LRR), proveniente de una plántula del banano con resistencia a FOC R4T (Dale et al., 2017).

Por lo tanto, se busca desarrollar un sistema de vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* para la edición del promotor del gen RGA2 de banano, con la finalidad de

sobreexpresar los genes de resistencia para la obtención de variedades mejoradas que contenga esta información genética, además de buscar una forma factible y eficaz para el almacenamiento de *Agrobacterium tumefaciens*, para futuras investigaciones.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

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

### **Objetivos específicos**

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

## **Hipótesis**

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

## **Capítulo II: Marco Teórico**

### **Fitopatógeno: *Fusarium oxysporum* (FOC R4T)**

*Fusarium oxysporum* es un fitopatógeno causante de la marchitez en musáceas, descubierto por primera vez en la variedad Gros Michel (Musa AAA), siendo denominada *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raza 1 (Foc R1), extendiéndose a través de Australia hasta

países de Latinoamérica como Panamá y Costa Rica (Florencio et al., 2023). Actualmente, la variedad Gros Michel ha sido reemplazada por la variedad Cavendish, la cual es susceptible a FOC R4T, teniendo la capacidad de propagarse rápidamente, permitiéndole una fácil expansión y, por ende, la destrucción de hectáreas de banano (Martínez et al., 2020).

### **Taxonomía**

- **Dominio:** Eukarya
- **Reino:** Fungi
- **Filo:** Ascomycota
- **Clase:** Sordariomycetes
- **Orden:** Hypocreales
- **Familia:** Nectriaceae
- **Género:** *Fusarium*
- **Especie:** *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* Raza Tropical 4 (FOC R4T)

### **Síntomas de la enfermedad**

El problema principal de lo que causa FOC R4T es la necrosis en el huésped. Los síntomas comienzan a mostrarse por la decoloración vascular, iniciando con el amarillamiento en los tejidos vasculares de las raíces que posteriormente se tornan color café, avanzando por los haces vasculares del pseudotallo, causando necrosis (Martínez et al., 2020). En este caso, según las investigaciones de Porteles et al. (2015), FOC R4T puede generar diferentes síntomas en la planta, entre los principales tenemos:

- Amarillento en la punta de la hoja (5% de infección del patógeno)
- Amarillento en un 50% de la hoja (15% de infección del patógeno)
- Amarillento en un 100% de la hoja (25% de infección del patógeno)
- Necrosis en la punta de una hoja con amarillento (50% de infección del patógeno)

- Necrosis en un 50% de la hoja con amarillento (75% de infección del patógeno)
- Necrosis en un 100% de la hoja con amarillento (100% de infección del patógeno)

### **Susceptibilidad del banano**

El plátano y el banano son musáceas comestibles susceptibles a FOC R4T, ya que este fitopatógeno tiene la capacidad de rápida propagación, además de poder perpetuarse en el suelo por largos períodos de tiempo (Vásquez & Hurtado, 2023). Este fitopatógeno produce clamidosporas, consideradas como estructuras de propagación resistentes, que son liberadas al invadir el huésped. La presencia de clamidosporas puede presentar síntomas como no, lo que vuelve difícil la identificación del fitopatógeno en el banano (Martínez et al., 2020).

La enfermedad se origina con la germinación de las clamidosporas en respuesta al estímulo del exudado de las raíces, dando lugar a la formación de conidios y micelio en un lapso de aproximadamente ocho horas. En tan solo un par de días, este proceso culmina en la generación de nuevas clamidosporas. La infección transcurre a través de las raíces secundarias, terciarias o por heridas que tenga la planta. Cuando el hongo penetra en la planta, comienza la producción de microconidias que se insertarán en los espacios inter e intracelulares (Martínez et al., 2020).

Al avanzar la marchitez hasta la zona vascular de las raíces laterales, ocurre la infección del rizoma del huésped, lo que obstruye los vasos xilemáticos, por lo que interfiere en la absorción y transporte de nutrientes y agua hacia la parte superior de la planta, lo que causa el deceso de la misma en menos de un mes, lo que provoca una liberación alta de clamidosporas en el suelo (Li et al., 2017).

### **Control del fitopatógeno**

Hablar en términos generales sobre el control de FOC R4T nos permite reconocer diferentes alternativas para así lograr contrarrestar las afecciones que causa este hongo a los

cultivares de banano. Primero que nada, se debe considerar el hecho de que, la mayoría de estos cultivares de banano se reproducen de forma asexual, por lo que, el ingreso de FOC R4T podría ser imparable, debido a que no existe una variabilidad genética en el cultivar, lo que facilitaría a FOC R4T a su expansión (Martínez et al., 2020). Por lo que, establecer protocolos de contingencia para la detención del hongo, sería la primera forma de control de esta enfermedad.

Sin embargo, considerando la gravedad de los problemas que puede causar FOC R4T, se establecen diferentes mecanismos de control y acción para poder contrarrestar la enfermedad. En términos de exclusión, establecer protocolos de prevención para evitar o retrasar la entrada de FOC R4T, como por ejemplo controles en fronteras, controles al ingreso de cultivares de banano, difusión a la ciudadanía sobre el impacto que puede causar FOC R4T, podrían ser alternativas indispensables para evitar la propagación de la enfermedad (Dita et al., 2018). Adicionalmente, sería crucial implementar un control exhaustivo en cada planta cultivada con el fin de prevenir la siembra de ejemplares infectados y eliminar aquellos que presenten la enfermedad. Esta práctica resultaría beneficiosa, especialmente al manipular plántulas in vitro para los cultivares, ya que posibilitaría la confirmación de que las plantas que germinarán estarán libres de infecciones (Dita et al., 2018).

Un mejor control de la enfermedad comienza desde el suelo, ya que es el principal medio de propagación del fitopatógeno. Manejar suelos aireados y drenados, reduce considerablemente la enfermedad, además de contribuir con un riego controlado y fumigación con amoníaco o similares, que reducen significativamente la presencia de hongos y bacterias (Bubici et al., 2019). De igual forma, enriquecer el suelo con biofertilizantes y materia orgánica, demuestran ser importantes alternativas para la salud del suelo y supresión de enfermedades (Dita et al., 2018).

## **Gen de resistencia RGA2**

La identificación de genes de resistencia para banano ante FOC R4T ha conllevado muchas investigaciones moleculares para determinar una forma de resistencia del banano ante esta enfermedad. Peraza et al. (2008), realizaron una investigación con genes RGCs, mismos que presentaban cierto nivel de resistencia a FOC R4T en el banano. Mediante sus análisis moleculares, se determinó que, los genes RGC1, RGC2, RGC3 y RGC5 se expresaban en hojas y tallos de musáceas, lo que los volvía óptimos para su análisis como candidatos a genes de resistencia ante FOC R4T. Sin embargo, el polimorfismo transcripcional mostrado por RGC2 tenía una alta correlación con la resistencia ante esta enfermedad, lo que lo vuelve un gen de alto interés para su sobreexpresión en plantas de banano.

La correlación existente del polimorfismo transcripcional del gen RGC2, actualmente conocido como RGA2, con la resistencia a FOC R4T, junto con la relación que tiene RGA2 con el gen de resistencia a *Fusarium I2* del tomate, lo convierte en un candidato para combatir la enfermedad causado por este hongo. Además, se ha llevado a cabo la clonación del ADNc de RGA2 en vectores binarios fundamentados en *Agrobacterium*. Estos vectores están regulados por promotores de diversas potencias, y posteriormente, se ha procedido a la transformación en plantas de banano con el objetivo de alcanzar una sobreexpresión controlada de dicho gen (Peraza et al., 2008). Se debe tener en cuenta que, la sobreexpresión de RGA2 no tiene efecto perjudicial sobre el crecimiento del banano y el tamaño del racimo (Poon & Teo, 2019).

## **Técnicas de transformación.**

La transformación bacteriana es un proceso mediante el cual las bacterias pueden incorporar material genético externo, como fragmentos de ADN, en su genoma. Este proceso implica la toma e incorporación del ADN exógeno por parte de las bacterias receptoras. Generalmente, se utiliza un vector, como un plásmido, que lleva el material genético deseado. Las bacterias receptoras son tratadas con una solución que aumenta su permeabilidad,

permitiendo la entrada del ADN externo. Posteriormente, algunos de los organismos transformados adquieren las nuevas características genéticas, como la resistencia a antibióticos, y pueden replicar y expresar el ADN incorporado (Serra, 2017).

**Choque térmico.** El choque térmico, que implica cambios bruscos de temperatura, puede tener diversos efectos en las bacterias. Un aumento o disminución significativa de la temperatura puede causar daño a las estructuras celulares, llevando a la muerte de las bacterias. Las altas temperaturas pueden desnaturalizar proteínas esenciales, mientras que las bajas temperaturas pueden afectar la integridad de las membranas celulares.

En el contexto de la transformación genética, el shock térmico se utiliza para inducir la competencia en bacterias. La competencia es la capacidad de las bacterias para tomar ADN del entorno y asimilarlo en su propio genoma. En el laboratorio, las bacterias se exponen a un cambio brusco de temperatura, haciéndolas más permeables al ADN externo. Se introducen fragmentos de ADN, como plásmidos, que contienen genes deseados. Algunas bacterias incorporan este ADN extraño a su genoma mediante la recombinación genética.

**Electroporación.** La electroporación es una técnica que facilita la transferencia de material a través de las membranas de las células, que busca exponerlas a un campo eléctrico de corta duración. El fundamento de la electroporación ocurre al producirse poros o agujeros de forma transitoria en la membrana celular (Main et al., 1995). Esta técnica sirve para la transformación eficiente de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con vector binario, produciendo tasas de transformación de  $10^6 - 10^3$   $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Nagel et al., 1990).

### **Técnicas de Crioconservación**

La crioconservación de bacterias es un método de preservación que utiliza bajas temperaturas para mantener las células bacterianas en un estado de suspensión, permitiendo

su almacenamiento a largo plazo. Este proceso implica la adición de un agente crioprotector, como glicerol o dimetilsulfóxido, a las células antes de congelarlas a temperaturas extremadamente bajas, generalmente alrededor de  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador. La criopreservación protege las bacterias de los daños causados por la formación de cristales de hielo, lo que podría ocurrir a temperaturas de congelación convencionales (Souza et al., 2000).

***Criopreservación a través de glicerol.*** El glicerol es un agente crioprotector penetrante utilizado para la conservación de bacterias a temperaturas de entre  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ , encargado de alterar el patrón de cristalización en la formación de hielo extracelular (Gómez et al., 2009; Gutiérrez et al., 2015). El glicerol puede mantener una estabilidad en la criopreservación de bacterias en un porcentaje del 10% en concentración de volumen, aplicándose a medios como el LB (Luria Bertani) (Belmonte et al., 2008). Por otra parte, Gutierrez et al. (2008), corroboraron la efectividad de la aplicación del glicerol como agente crioprotector a una concentración del 20% en cultivos bacterianos. Se debe tener en cuenta que, suplementar el glicerol con otros agentes crioprotectores como DMSO, etilenglicol, entre otros; que podría ser ventajoso para la conservación de bacterias.

***Criopreservación a través de dimetilsulfóxido (DMSO).*** El DMSO es un agente crioprotector penetrante que reviste las células de los cultivos bacterianos con el fin de protegerlos de las bajas temperaturas y a su vez mantener estables a las células bacterianas (Gómez et al., 2009). El DMSO genera una estabilidad como agente crioprotector a concentración del 2% al 10% en volumen, lo que lo vuelve eficaz para la conservación de bacterias (Higuera et al., 2009). García et al. (2017) sostienen que, el DMSO genera una estabilidad crioprotectora a una concentración del 5% al 10% en volumen a una temperatura de criopreservación de  $-196^{\circ}\text{C}$ .



**Crioconservación a través de polietilenglicol.** El polietilenglicol es un agente no penetrante que se utiliza como crioprotector para la conservación de bacterias en bajas concentraciones (0.01M) (Perez & Sosa, 2010). El polietilenglicol recubre las células, lo que produce una disminución de la producción de hielo extracelular, sin embargo, al no ser penetrante, no contribuye a una conservación intracelular, lo que podría causar la pérdida de las células del cultivo bacteriano (Valdés, 2012).

### Capítulo III: Materiales y métodos

#### Diseño de primers

Para el diseño de primers, se utilizó la plataforma Benchling. Se establecieron los primers para la confirmación de la presencia de la región promotora del gen de resistencia RGA2 en el constructo plasmídico, a partir del diseño de plásmido proporcionado por Jácome (2023), en la cual se tomaron en cuenta 3 regiones: Backbone (Bac), Cas y el ARN guía. Los pares de primers fueron:

**Tabla 1**

*Diseño de primers para la confirmación de la presencia de la región promotora*

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

De igual forma, se diseñaron los primers para la confirmación de la presencia de la región promotora del gen resistencia en el ADN de banano. Para esto, se tomó la secuencia de

banano del INIAP, misma que fue utilizada para el ensamblaje MOCLO, elaborado en el trabajo de titulación realizado por Jácome (2023). El par de primers fue:

**Tabla 2**

*Diseño de primers para la confirmación de la presencia de la región promotora en banano*

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

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

Para la extracción de plásmido de *E. coli*, primero se sembró la cepa transformada con el plásmido que contiene la región promotora gen de resistencia RGA2 en Agar LB sólido junto con el antibiótico Kanamicina (50 ug/mL) y se dejó incubar durante dos días a 36°C. Posteriormente, se sembró *E. coli* a en LB líquido y se incubó en agitación durante un día a 200 rpm. Considerando una densidad óptica (OD) de 600 nm, se procedió a extraer el ADN plasmídico aplicando un protocolo convencional, donde se aplicaron 3 soluciones de extracción: Solución I (Suspensión) compuesta por glucosa 50 mM, Tris-Cl 100 mM (pH 8.0) y EDTA (pH 8.0) 10 mM; Solución II (Lisis) compuesta por NaOH 0.2 N y SDS 1% (w/v); Solución III (Neutralización) compuesta por 6 mL de acetato de potasio 5 M, 1.15 mL de ácido acético glacial y 2.85 mL de agua autoclavada. El proceso de extracción consistió en añadir 1.5 mL del cultivo bacteriano en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 6000 rpm durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250 uL de la Solución I fría, junto con una homogenización por vortex y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Seguido de esto, se añadió 250 uL de la Solución II y se homogenizó por inversión por cinco veces, dejándose incubar durante 3 minutos a -20 °C. Luego, se añadió 300 uL de la Solución III fría, se homogenizó 7 veces por inversión y se incubó durante 10 minutos a -20°C. Una vez

agregadas las soluciones, se centrifugó la solución total a 13000 rpm durante 15 minutos, se transfirió 400 uL de sobrenadante en tubos de 1.5 mL y se añadió 800 ul de alcohol absoluto, se homogenizó 5 veces por inversión y se dejó incubar durante 20 minutos a -20 °C.

Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante, se agregó 1 mL de alcohol al 70% y se mezcló 10 veces por inversión. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante dentro de la cámara de flujo laminar y se dejó secar durante 30 minutos, para evaporar el etanol restante. Finalmente, se resuspendió el pellet en 20 uL de agua libre de nucleasas y se agregó 1 uL de RNAsa, se dejó incubar durante 15 minutos en la cámara a temperatura ambiente y se almacenó el ADN plasmídico extraído a -20°C.

Luego de la extracción, se obtuvo ADN plasmídico obtenido por espectofotometría para determinar la pureza. Utilizando el equipo Nanodrop, se agregaron 2 uL del plásmido obtenido y 2 uL del blanco, en este caso agua libre de nucleasas, y se determinó la pureza según la relación de absorbancia A260/280 y A260/230.

### **Confirmación del plásmido extraído de *E. Coli* y *Agrobacterium tumefaciens***

La confirmación del plásmido conteniendo el gen de resistencia RGA2 se realizó a través de la estandarización de un protocolo utilizando la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), en la cual se determinó su presencia a través de la amplificación de la banda específica en el peso molecular establecido en el diseño de primer. En este caso, se identificó la presencia del gen de resistente a partir del backbone y la Cas. Las condiciones de la reacción fueron: 12.5 ul de 2X BlastTaq™ PCR Master Mix, 9.5 ul de ALN, 1 ul de cada primer 10 uM y 1 ul de ADN plasmídico. El proceso de amplificación de los primers consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 58.9°C por 15 segundos y 72°C por 23 segundos, finalizado por una extensión a 72°C por 1 minuto.

Posteriormente, se realizó una electroforesis para confirmar la amplificación del ADN plasmídico. Se preparó un gel de agarosa al 2%, donde se añadió 0.6 g de agarosa junto con 30 ml de TAE al 1%, añadiéndole 3.5 uL de bromuro de etidio. Una vez solidificado el gel, se cargaron las muestras y se configuró la fuente de poder a 90 V y 300 amperios, durante 35 minutos. Finalmente, las muestras fueron visualizadas en el transiluminador, para confirmar la presencia de las bandas esperadas.

### **Preparación de células competentes**

Para los procesos de transformación bacteriana, primero se deben preparar células quimiocompetentes para choque térmico y células electrocompetentes para electroporación. Para la obtención de estas, se aplicó el protocolo de modificado, a partir de la siembra de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* sin transformar en medio LB sólido con el antibiótico Kanamicina (50 ug/ml) y se dejó incubar durante 48 horas a 29°C. Luego, se sembraron las cepas en 5 ml de medio LB líquido con Kanamicina y se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas a 200 rpm. Posteriormente, se mezcló los 5 ml de medio ya incubado con 50 ml de LB líquido con Kanamicina y se incubó en las mismas condiciones.

La suspensión bacteriana obtenida anteriormente se colocó en un tubo plástico de 50 ml, previamente esterilizado, y se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Luego, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de glicerol al 10% frío para las células electrocompetentes y 10 ml de CaCl<sub>2</sub> frío 20 mM para las células quimiocompetentes, y se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de glicerol al 10% frío para las células electrocompetentes y 1 ml de CaCl<sub>2</sub> frío 20 mM para las células quimiocompetentes. Finalmente, se almacenaron alícuotas de 100 ul a -80°C.

### **Transformación por choque térmico**

La transformación genética por choque térmico se aplicó mediante el protocolo de Villalta (2014) modificado, en el cual se utilizaron células quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*. Las células quimiocompetentes se descongelaron lentamente en hielo, para luego agregarles 3 diferentes volúmenes de ADN plasmídico: 1 uL, 3 uL y 5 uL, respectivamente. Los tubos se incubaron a -20°C durante 30 minutos y luego se incubaron a -80°C durante 15 minutos. Luego, los tubos se incubaron en baño maría a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente, se les añadió 150 uL de medio LB líquido sin antibiótico y se incubaron en agitación constante durante 3 horas a 200 rpm. Finalmente, se sembraron las colonias en medio LB sólido con Kanamicina (50 ug/mL) y con Tetraciclina (10 ug/mL), a través de diluciones seriadas: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 y 1/1000000, para el conteo bacteriano.

### **Transformación por electroporación**

La transformación genética por electroporación se aplicó mediante el protocolo de Gómez et al. (2018) modificado, en el cual se utilizaron células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* previamente preparadas, mencionadas anteriormente. Se preparó medio SOC para la regeneración de las células electrocompetentes. Para la electroporación se utilizó el equipo Eporator de Eppendorf, donde se utilizaron celdas de 2 mm y 4 mm. Primero, se descongeló lentamente las células electrocompetentes y se les añadió 5 uL de ADN plasmídico. Posteriormente, se añadió 130 uL de la solución a las celdas respectivas y se procesó en el electroporador a 2.5 kV durante 4.5 ms. Este proceso se repitió 3 veces con cada celda. Las células transformadas se sembraron en 150 uL de medio SOC sin antibiótico y se incubaron en agitación constante durante 3 horas a 200 rpm. Finalmente, se sembraron las colonias en medio LB sólido con Kanamicina (50 ug/mL) y con Tetraciclina (10 ug/mL), a través

de diluciones seriadas: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 y 1/1000000, para el conteo bacteriano.

### **Eficiencia de transformación**

Para evaluar la eficiencia de transformación (TE) para el choque térmico y la electroporación, relacionó las Unidad Formadora de Colonias (CFU) junto con la cantidad de ADN plasmídico agregado.

$$TE = \frac{CFU}{\text{cantidad de ADN plasmídico (ug)}}$$

$$C. \text{ de ADN plasmídico} = \frac{\text{Masa total de pADN aplicado (ug)} \cdot v. \text{ dispensado en placa (ug)}}{v. \text{ total de la suspensión (uL)}}$$

$$\# CFU/mL = \frac{\# \text{ colonias} \cdot \text{tasa de dilución}}{\text{volumen sembrado (mL)}}$$

### **Diseño experimental para la viabilidad de crioconservación**

Se ejecutó un análisis de varianza (ANOVA), mediante el programa informático Infostat a un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0,05$ ).

**Tabla 3**

*Tratamientos para evaluar la eficiencia de transformación*

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

### Modelo estadístico para la viabilidad de conservación

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

$Y_{ij}$  = Eficiencia de transformación

$\mu$  = Media de la eficiencia de transformación (CFU/ug)

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

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

### Unidad experimental para la viabilidad de conservación

Se evaluó la eficiencia de transformación a través de dos tratamientos por cada método aplicado (choque térmico y electroporación) donde se estableció la relación entre CFU por la cantidad de ADN plasmídico agregado.

#### **Variables**

**Variable dependiente.** Eficiencia de transformación (CFU/ug)

**Variable independiente.** Método de transformación (choque térmico y electroporación)

#### **Hipótesis**

**Nula.** No existe diferencia significativa en la media de la eficiencia de transformación para cada método aplicado.

**Alternativa.** Existe diferencia significativa en la media de la eficiencia de transformación para cada método aplicado.

### Extracción de ADN de banano

Para la extracción de ADN de banano, se utilizó un protocolo convencional modificado (Elosegi & Wilson, 2009; Wilson, 2001). Primero, se obtuvieron muestras de hoja de banano frescas, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos y se conservaron a -80°C durante una noche. Previo a la extracción, se preparó un buffer de extracción conformado por CTAB 2.5% (25 g/L), NaCl 1.4 M (81.816 g/L), EDTA 20 mM (5.8448 g/L) y

Tris-HCl 100 mM (12.114 g/L) a pH 8.0. Con un mortero, previamente frío, se maceró la muestra hasta visualizar la formación de cristales y se recuperó entre 50 y 100 mg, colocándose en un tubo de 1.5 mL con 3 perlas de vidrio. Se agregó 500 uL de buffer de extracción y 2 uL de  $\beta$ -mercaptoetanol y se hizo vortex durante 4 minutos. Luego, la muestra fue incubada en baño maría a 60°C por 30 minutos, mezclando 10 veces por inversión cada 10 minutos. Posteriormente, se añadió 500 uL de cloroformo frío y se homogenizó por vortex durante 30 segundos. La muestra se centrifugó a 14500 gravedades en dos partes durante 3 minutos cada una. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL y se añadió un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 uL de acetato de sodio 3M y 300 uL de etanol al 70%, para estimular la precipitación del ADN y se dejó incubar a -20°C durante toda la noche. Luego, se centrifugó a 14500 g por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se añadió 200 uL de etanol al 70% y se centrifugó a las mismas condiciones, esto se repitió durante 2 veces. Previamente preparada la cámara de flujo laminar, se descartó el sobrenadante y se dejó secar durante 30 minutos en la cámara. Finalmente, se resuspendió el pellet con 20 uL de agua libre de nucleasas y se añadió 1 uL de RNAsa, se dejó incubar en cámara durante 30 minutos y se almacenó la muestra a -20 °C.

Luego de la extracción, se cuantificó el ADN obtenido por espectofotometría para determinar la pureza. Utilizando el equipo Nanodrop, se agregaron 2 uL del plásmido obtenido, en este caso agua libre de nucleasas, y se determinó la pureza según la relación de absorbancia A260/280 y A260/230.

### **Confirmación del gen de resistencia RGA2**

La confirmación del gen RGA2 se realizó a través de la estandarización de un protocolo de PCR, con las condiciones de la 2X BlastTaq™ PCR Master Mix. Se evaluaron dos diferentes condiciones de reacción. La primera: 12.5 uL de 2X BlastTaq™ PCR Master Mix, 9.5 uL de ALN, 1 uL de cada primer 10 uM y 1 uL de ADN de banano, la segunda se varió el contenido de



ALN a 9 uL y el volumen de ADN de banano a 1.5 uL. El proceso de amplificación de los primers consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 53.7°C por 15 segundos y 72°C por 8 segundos, finalizado por una extensión a 72°C por 1 minuto. Además, se realizó otro proceso de amplificación, modificando el tiempo final de los ciclos en la temperatura de 72°C por 10 segundos. Se debe tener en cuenta, que ambos procesos de amplificación fueron probados por ambos métodos de PCR.

Finalmente, se realizó una electroforesis para confirmar la amplificación del ADN, siguiendo el proceso mencionado anteriormente para el ADN plasmídico de *E. coli*.

### **Crioconservación de *Agrobacterium tumefaciens***

El en proceso de crioconservación de *Agrobacterium tumefaciens* se utilizaron 3 crioprotectores en diferentes volúmenes (glicerol, DMSO y polietilenglicol). Primero, se cultivó *Agrobacterium tumefaciens* en medio LB sólido con Kanamicina (50 ug/ml) y se dejó incubar a 29°C por 48 horas. Luego, se sembraron las cepas en medio LB líquido con Kanamicina (50 ug/mL) a temperatura ambiente durante 24 horas o hasta alcanzar una OD de 600 nm.

Se evaluaron dos tratamientos donde se variaron los volúmenes de los crioprotectores antes mencionados. Se evaluaron dos tratamientos con tres crioprotectores, glicerol, DMSO y polietilenglicol, a 2 concentraciones, 10% y 20% para la conservación de *Agrobacterium tumefaciens*, durante 3 meses.

### **Viabilidad de crioconservación**

Para la evaluación de la viabilidad de crioconservación se aplicó la Unidad Formadora de Colonias (CFU), donde se evaluó la cantidad de CFU/uL.

$$\# \text{ CFU/mL} = \frac{\# \text{ colonias} \cdot \text{tasa de dilución}}{\text{volumen sembrado (mL)}}$$

### Diseño experimental para la viabilidad de criopreservación

Se ejecutó un análisis de varianza (ANOVA), mediante el programa informático Infostat a un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0,05$ ).

**Tabla 4**

*Tratamiento para evaluar la viabilidad de criopreservación*

Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento
T1	T2	T3	T4	T5	T6
<b>Glicerol</b>	DMSO	Polietilenglicol	Glicerol	DMSO	Polietilenglicol
	<b>10 %</b>			<b>20 %</b>	

### Modelo estadístico para la viabilidad de conservación

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

$Y_{ij}$  = Viabilidad de criopreservación

$\mu$  = Media de la eficiencia de criopreservación calculada en cada crioprotector.

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

### Unidad experimental para la viabilidad de conservación

Se determinó la cantidad y el tipo de agente crioprotector (Glicerol, DMSO y Polietilenglicol) más eficiente para la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el gen RGA2 a través de un diseño experimental completamente al azar (DCA) con 6 tratamientos y 3 repeticiones, donde cada tratamiento evaluó una diferente concentración del agente crioprotector aplicado (10% y 20%), además de los blancos para cada volumen.

#### **Variables**

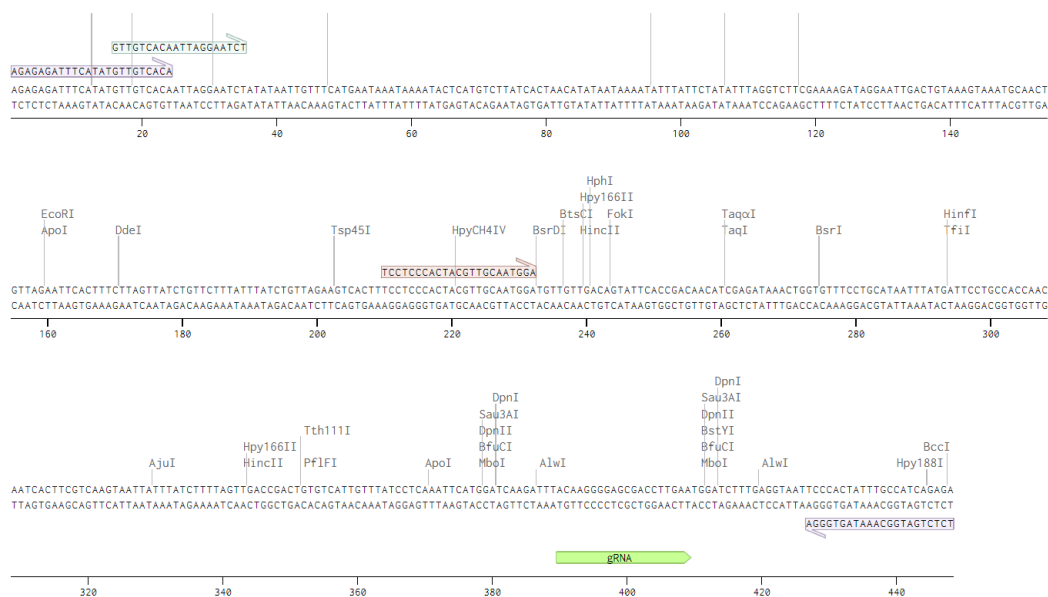
**Variable dependiente.** Viabilidad de la concentración (10% y 20%) del agente crioprotector a través las UFC.



Adicionalmente, con respecto a la identificación de la región promotora del gen de resistencia en muestras de banano, se presentan en la Figura 2 los primers específicos utilizados para este propósito, enfocados en la identificación de la región promotora del gen de resistencia RGA2, considerando que, el par de primers fue diseño haciendo uso de la secuencia de banano registrada por el INIAP: HG996468.1:6769620-6770122 *Musa acuminata* subsp. *malaccensis* strain Doubled-haploid Pahang (DH-Pahang) genome assembly, chromosome: A03 [47-494].

## Figura 2

Primers para la identificación de la región promotora del gen de resistencia RGA2 en banano



## Extracción de plásmido RGA2

La extracción de ADN plasmídico fue aplicada en tres diferentes cepas de *E. coli*: Top 10 (T), JM109 (J) y DH5 $\alpha$  (D).

El método convencional aplicado para la extracción de ADN plasmídico fue eficiente por los resultados obtenidos reflejados en la Tabla 1. Se puede observar que los resultados de

concentración son altos, además, los ratios de absorbancia A260/280 y A260/230 se mantienen en un rango de 1.8 a 2.2, lo que indica la presencia de ADN con poca contaminación y escasa presencia de fenoles. Se debe tener en cuenta que, ciertos resultados tenían concentración baja y con la pureza por fuera del rango, lo que se considera como ADN con presencia de contaminantes y presencia de fenoles.

Según los resultados obtenidos en la Tabla 1, la extracción de plásmidos a partir de la cepa Top 10 tuvo mejores resultados en cuanto a pureza y concentración que la extracción a partir de las otras dos cepas.

**Tabla 5**

*Cuantificación de ADN plasmídico extraído a partir de cepas de E. coli*

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (ug/mL)</b>	<b>Pureza (A260/280)</b>	<b>Pureza (A260/230)</b>
<b>Top 10 - T1</b>	2378	2,132	1,965
<b>Top 10 - T2</b>	2423	2,033	2,279
<b>DH5<math>\alpha</math> - D1</b>	115,7	1,096	1,896
<b>DH5<math>\alpha</math> - D2</b>	143,6	1,304	1,637
<b>JM109 - J1</b>	1957	2,032	2,364
<b>JM109 - J2</b>	1471	2,196	2,362
<b>Top 10 - T3</b>	3321,3	2,251	1,986
<b>Top 10 - T4</b>	2756	2,163	2,031
<b>DH5<math>\alpha</math> - D3</b>	110,2	1,496	2,123
<b>DH5<math>\alpha</math> - D4</b>	86,3	0,964	1,633
<b>JM109 - J3</b>	1396	2,016	2,210
<b>JM109 - J4</b>	1265,4	2,298	2,369

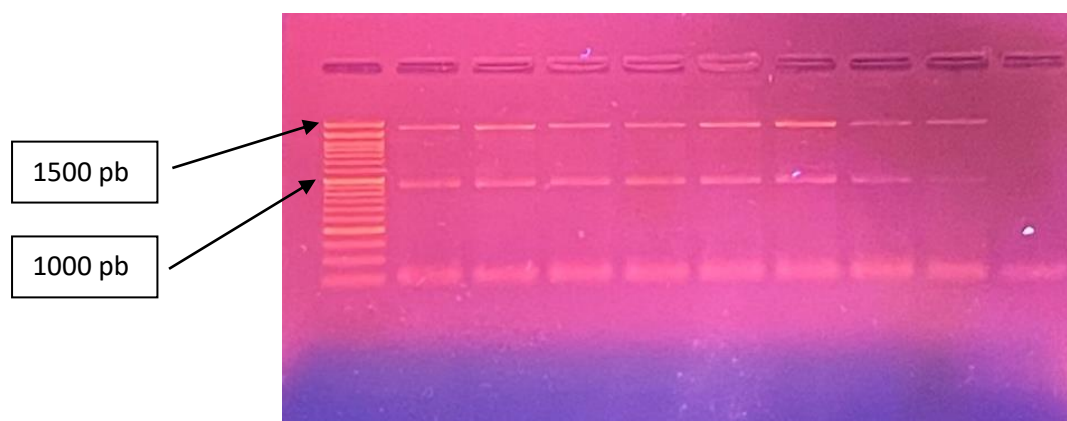
<b>Top 10 - Tt1</b>	2859,3	1,964	2,137
<b>Top 10 - Tt2</b>	3056	1,839	2,245
<b>Top 10 - Tt3</b>	2256,2	2,219	2,034
<b>Top 10 - Tt4</b>	2365,3	2,042	1,968
<b>Top 10 - Tt5</b>	2459	1,997	1,893
<b>Top 10 - Ts1</b>	3158,1	2,139	2,101
<b>Top 10 - Ts2</b>	2365	1,975	2,195
<b>Top 10 - Te1</b>	3087,2	2,164	1,963

### Amplificación del plásmido conteniendo el gen RGA2

Para confirmar la presencia la región promotora que contiene el gen de resistencia RGA2 en el ADN plasmídico se utilizaron solo las extracciones de la cepa Top 10. Luego de la PCR respectiva, el análisis de la electroforesis de la Figura 1, nos muestra la presencia del gen RGA2 al tener un peso molecular de 1500 pb. Se debe tener en cuenta que existe otra banda a la altura de 1000 pb, lo que nos indica que existe la posibilidad de que los primers tengan dos sitios de unión.

### Figura 3

*Electroforesis para la confirmación de la presencia de la región promotora del gen RGA2*



*Nota.* Los amplicones fueron del plásmido extraído de la cepa Top 10 (T). Columna 1, marcador molecular; columna 2, muestra Tt1; columna 3, muestra Tt2; columna 4, muestra Tt43; columna 5 muestra Tt4; columna 6, muestra Tt5; columna 7, muestra Ts1; columna 8, muestra Ts2; columna 9, muestra Te1; columna 10, blanco.

### **Evaluación de la eficiencia de transformación (ET) de las cepas de *A. tumefaciens* con el plásmido que contiene el gen RGA2**

Luego de la aplicación de los dos métodos de transformación antes mencionados, se evaluó la eficiencia de transformación a través del conteo de las CFU, utilizando el ADN plasmídico extraído de la cepa Top 10 de *E. coli*. Para el crecimiento de cepas transformadas, se utilizó el antibiótico tetraciclina (10 ug/uL), con el fin de identificar las cepas que contenían el plásmido con el gen RGA2. Además, se aplicó el método de dilución seriada, por lo que solo se sembró 25 uL de la dilución 1/10000 para el conteo de colonias.

Según los resultados obtenidos, existe mayor CFU en los tratamientos con electroporación (Tabla 7) a comparación de los tratamientos con choque térmico (Tabla 6). Para los controles negativos no hubo crecimiento de cepas en la siembra microbiana, ya que no hubo cepas transformadas.

**Tabla 6**

*Resultados de la eficiencia de transformación para choque térmico*

<b>Tratamientos</b>	<b>Repetición</b>	<b>Plásmido (ug)</b>	<b># de colonias</b>	<b>CFU (cfu/ml)</b>	<b>ET (cfu/ug)</b>
<b>TC1</b>	1	3	162	64800000	78072289,2
<b>TC1</b>	2	3	173	69200000	8337349,4
<b>TC1</b>	3	3	179	71600000	86265060,2
<b>TC2</b>	1	5	164	65600000	79036144,6

<b>TC2</b>	2	5	153	61200000	73734939,8
<b>TC2</b>	3	5	217	86800000	104578313

**Tabla 7**

*Resultados de la eficiencia de transformación para electroporación*

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

**Figura 4**

*Colonias de A. tumefaciens transformadas por el método de electroporación*





## Figura 5

Colonias de *A. tumefaciens* transformadas por el método de choque térmico



### Comprobación de la transformación de las cepas de *A. tumefaciens* con el plásmido que contiene el gen RGA2

La comprobación de los métodos de transformación se realizó a través de una PCR de colonias y de igual forma una PCR para el ADN plasmídico. Para la PCR de ADN plasmídico, se realizó una extracción del plásmido con el protocolo estandarizado, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 7, para los valores de concentración y de pureza A260/280 y A260/230. En ambos métodos de corroboración, la PCR no amplificó la banda esperada de 1500 pb mostrado en la Figura 6.

### Tabla 8

Cuantificación de ADN plasmídico extraído a partir de cepas de *A. tumefaciens*

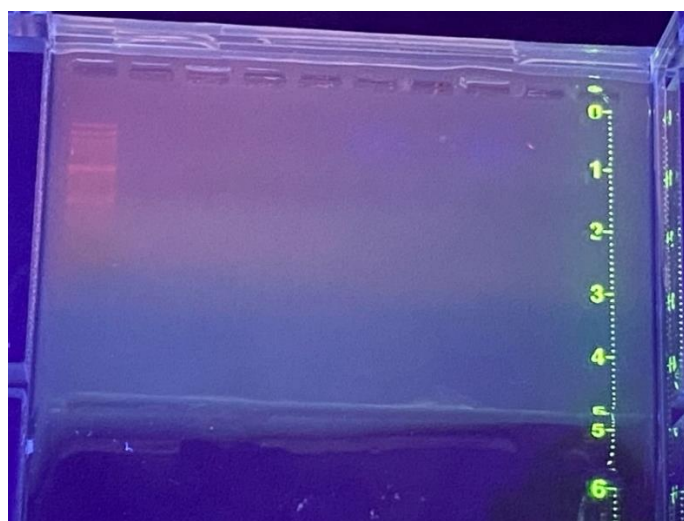
Muestra	Concentración (ug/mL)	Pureza (A260/280)	Pureza (A260/230)

<b>ATE1</b>	1268	2,115	2,056
<b>ATE2</b>	980,3	2,087	1,931
<b>ATC1</b>	1339,7	2,163	1,784
<b>ATC2</b>	1279	1,971	1,867

*Nota.* *A. tumefaciens* transformada por electroporación (ATE) y choque térmico (ATC).

### Figura 6

*Electroforesis para la confirmación de la presencia del promotor del gen RGA2 en cepas transformadas*



### Diseño experimental: eficiencia de transformación

Mediante un análisis ANOVA utilizando una prueba T independiente, se determinó que existe diferencia significativa en la eficiencia de transformación entre choque térmico y electroporación, a un nivel de significancia de 0,05. De igual forma, a través de la prueba Tukey se puede observar que existe diferencia entre cada tratamiento (Figura 7).

Al analizar las medias obtenidas junto con el gráfico de barras, se puede determinar que la electroporación tuvo mejor eficiencia de transformación (Figura 8).

## Figura 7

Resultados del ANOVA y análisis Test Tukey para la eficiencia de transformación

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
ET	12	0,75	0,66	37,78

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

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=112258688,34202

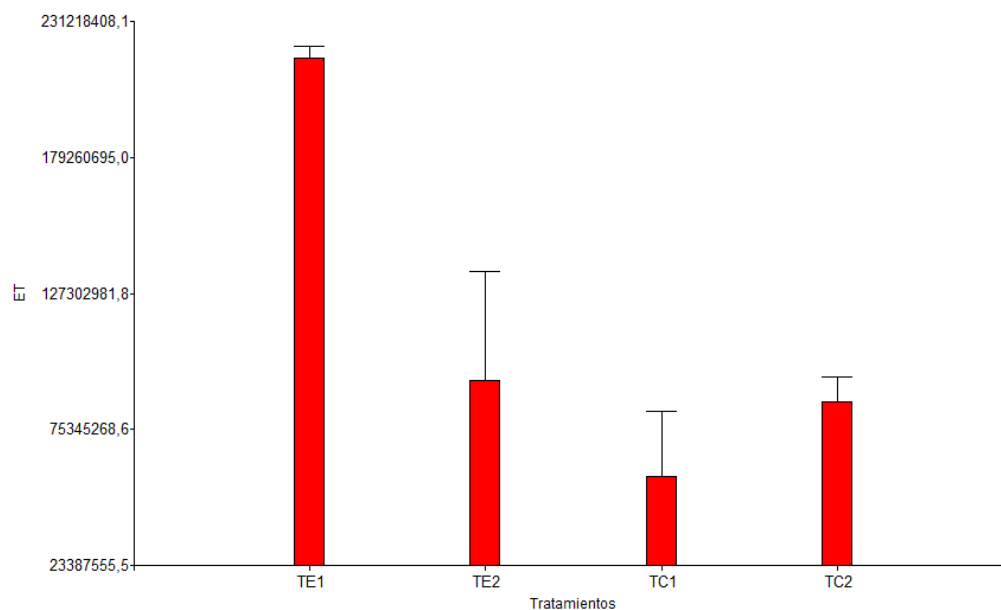
Error: 1843287379441769,2500 gl: 8

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

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

## Figura 8

Medidas de resumen y análisis de gráfico de barras para la eficiencia de transformación



### Medidas resumen

Tratamientos	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
TC1	ET	3	57558232,93	42822913,33	8337349,40	86265060,20
TC2	ET	3	85783132,47	16491506,95	73734939,80	104578313,00
TE1	ET	3	217333333,33	7687218,83	210400000,00	225600000,00
TE2	ET	3	93879517,87	72168445,16	12722891,60	150843373,00

### Presencia del gen RGA2 en muestras de banano

Para corroborar la presencia de la región promotora del gen de resistencia en muestras de banano, se realizó una previa extracción de ADN de banano con el protocolo estandarizado, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 8, para los valores de concentración y de pureza A260/280 y A260/230. La PCR estandarizada no amplificó la banda esperada de 448 pb, mostrada en la Figura 9.

**Tabla 9**

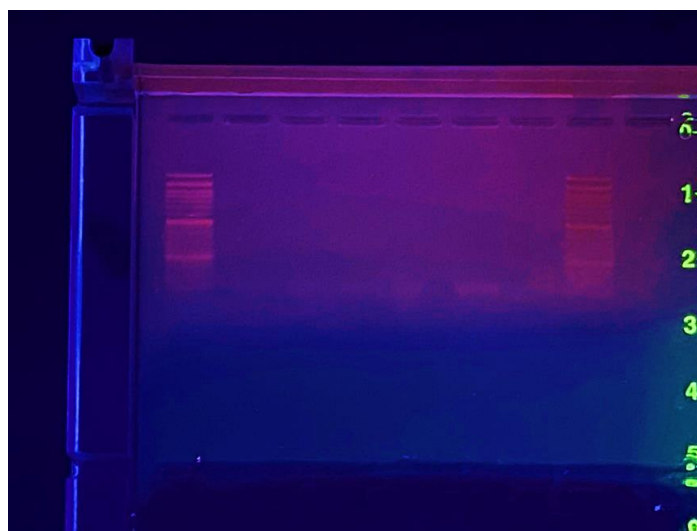
*Cuantificación de ADN de muestras de banano*

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

*Nota.* Muestras de ADN de banano (BD – BM – BL)

**Figura 9**

*Electroforesis para la confirmación de la presencia del gen RGA2 en muestras de banano*



### Viabilidad de crioconservación de cepas de *A. tumefaciens*

**Tabla 10**

*Resultados de la viabilidad de crioconservación de cepas de A. tumefaciens*

Tratamientos	Repetición	# de colonias	CFU (cfu/ml)
T1	1	226	90400000
T1	2	257	102800000
T1	3	239	95600000
T2	1	296	118400000
T2	2	267	106800000
T2	3	253	101200000
T3	1	135	54000000
T3	2	158	63200000
T3	3	162	64800000
T4	1	216	86400000
T4	2	237	94800000
T4	3	251	100400000
T5	1	257	102800000
T5	2	285	114000000
T5	3	246	98400000

---

<b>T6</b>	1	133	53200000
<b>T6</b>	2	149	59600000
<b>T6</b>	3	106	42400000

---

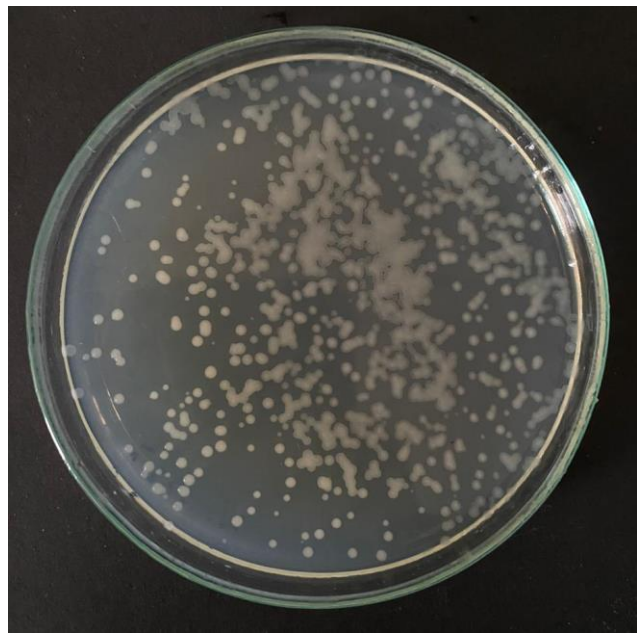
**Figura 10**

*Crecimiento de cepas de A. tumefaciens crioconservadas en glicerol*

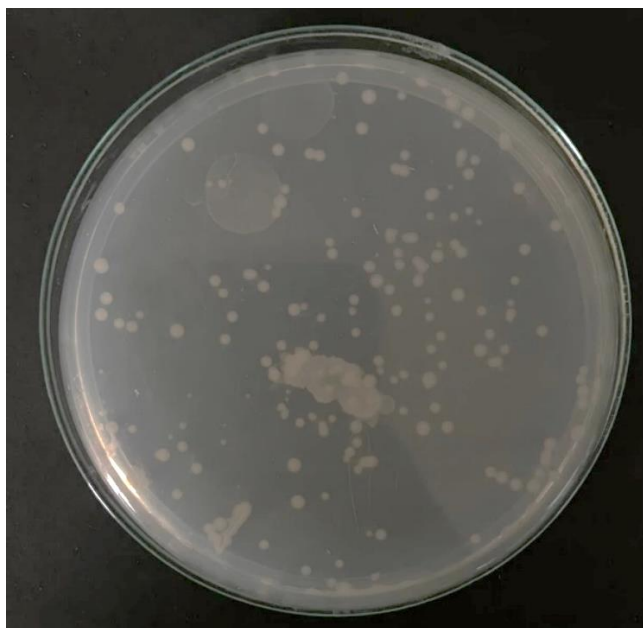


**Figura 11**

*Crecimiento de cepas de A. tumefaciens crioconservadas en DMSO*

**Figura 12**

*Crecimiento de cepas de A. tumefaciens crioconservadas en polietilenglicol*



### Diseño experimental: viabilidad de crioconservación

Mediante un análisis ANOVA utilizando una prueba T independiente, se determinó que existe diferencia significativa en la viabilidad de crioconservación de los crioprotectores Glicerol, DMSO y polietilenglicol a un nivel de significancia de 0,05. De igual forma, a través de la prueba Tukey se puede observar que existe diferencia entre cada tratamiento (Figura 13).

Al analizar las medias obtenidas junto con el gráfico de barras, se puede determinar que el DMSO (T2 y T5) tuvo mejor viabilidad de crioconservación (Figura 14).

### Figura 13

Resultados del ANOVA y análisis Test Tukey para la viabilidad de crioconservación

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
CFU	18	0,93	0,90	8,74

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8599866666666670,00	5	1719973333333330,00	30,39	<0,0001
Tratamientos	8599866666666670,00	5	1719973333333330,00	30,39	<0,0001
Error	679253333333333,00	12	56604444444444,40		
Total	927912000000000,00	17			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=20633809,14522

Error: 56604444444444,4141 gl: 12

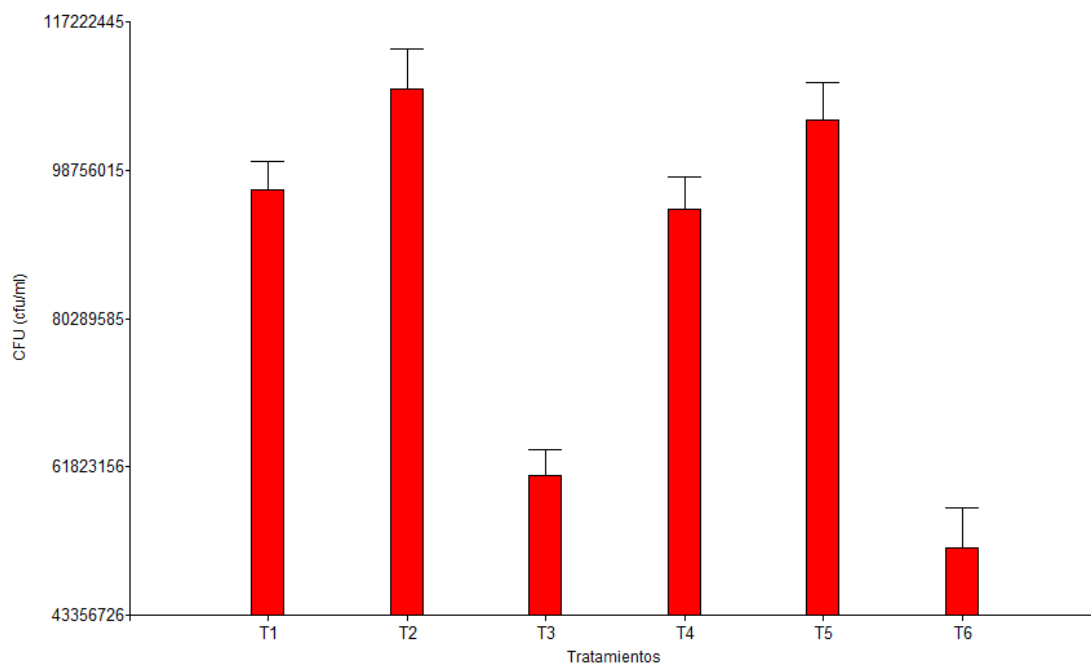
Tratamientos	Medias	n	E.E.
T2	108800000,00	3	4343748,17 A
T5	105066666,67	3	4343748,17 A
T1	96266666,67	3	4343748,17 A
T4	93866666,67	3	4343748,17 A
T3	60666666,67	3	4343748,17 B
T6	51733333,33	3	4343748,17 B

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



**Figura 14**

*Gráfico de barras y medidas de la viabilidad de crioconservación*



#### Medidas resumen

Tratamientos	Variable	n	Media	D.E.	Min	Máx
T1	CFU	3	96266666,67	6226823,70	90400000,00	102800000,00
T2	CFU	3	108800000,00	8772684,88	101200000,00	118400000,00
T3	CFU	3	60666666,67	5828664,80	54000000,00	64800000,00
T4	CFU	3	93866666,67	7046512,14	86400000,00	100400000,00
T5	CFU	3	105066666,67	8043216,60	98400000,00	114000000,00
T6	CFU	3	51733333,33	8693292,43	42400000,00	59600000,00

## Capítulo IV: Discusión

El objetivo de esta investigación es obtener cepas transformadas con un plásmido ensamblado que contiene el sistema CRISPR Cas9 para la edición de un fragmento del promotor del gen RGA2. Parte de obtener resultados óptimos en los procesos de transformación genética es considerar aplicar protocolos de extracción plasmídica eficientes, que nos permitan tener una concentración adecuada y radios de absorbancia A260/280 y

A260/230 que se encuentren en el rango de 1.8 a 2.2 para que el ADN plasmídico sea apropiado para ser insertado de *E. coli* a *A. tumefaciens*.

Según los resultados obtenidos en la extracción de *E. coli*, aplicando el método convencional, se puede determinar que los resultados de las cepas Top 10 y JM109, fueron mejores a comparación de las cepas DH5 $\alpha$ . Las cepas Top 10 y JM109 tuvieron una mayor concentración de plásmido a comparación de las cepas de DH5 $\alpha$ . Además, los valores de la absorbancia analizada A260/230 y A260/280, estuvieron en un rango de 1,7 y 2,4 para las cepas Top10 y JM109. Según Lebuhn et al. (2016), para la absorbancia A260/230 se debe tener un valor por encima de 1,8 para considerar la muestra en un rango factible, libre de fenoles y contaminantes. De igual forma, para la absorbancia A260/280 debe estar en el rango 1,8 – 2,0 para evitar contaminaciones por proteínas, por debajo de 1,8, y ARN, por encima de 2,0 (González et al., 2010).

El ADN plasmídico utilizado fue el obtenido a partir de la cepa Top 10, considerando que la cepa JM109 tuvo valores de concentración similares a la cepa seleccionada. Por otra parte, la cepa DH5 $\alpha$  tuvo resultados de pureza por fuera del rango permisible, lo que se suponía una contaminación por proteínas (Lebuhn et al., 2016). A partir de la cepa Top 10 se obtuvo una mayor concentración de plásmido, en comparación a la cepa JM109. Las cepas proporcionadas por Jácome (2023) fueron transformadas aplicando el método adaptado de Hanahan et al. (2019), mismo que es efectivo para las cepas DH5 $\alpha$  y JM109, para la transformación genética a partir de choque térmico (Chan et al., 2013).

Se evaluó una PCR para amplificar la región esperada de 1500 pb, a las cepas Top 10 y JM109, por su grado de pureza y concentración. La banda esperada solo amplificó para la cepa Top 10, debido a que el ADN plasmídico tenía menos margen de contaminación y presencia de fenoles, al ser extraído a partir de esta cepa. Según Yang (2012), la expresión de plásmidos en cepas de *E. coli* puede verse afectada según la cepa y el tamaño del plásmido transformado.

Para la cepa JM109, el plásmido sufre una degradación al aplicar métodos de transformación, por lo que no puede expresarse al momento amplificar ADN, a diferencia de la cepa Top 10 que no sufre una degradación del plásmido en el ADN (Yang, 2012).

Se utilizó la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* para evaluar la eficiencia de transformación de los dos métodos aplicados. En primera instancia, las cepas sin transformar y transformadas fueron sembradas en medio LB con kanamicina, según los protocolos establecidos en la metodología. Se sometieron a pruebas moleculares como PCR de colonias y PCR del ADN plasmídico, pero existieron inconvenientes en la amplificación de la banda de 1500 pb. Al no tener un marcador colorimétrico, hubo dificultades para la selección de las cepas que contengan el fragmento de interés.

Debido a estos inconvenientes en la PCR, se buscaron alternativas para poder determinar la expresión del plásmido de interés, luego de la transformación en *A. tumefaciens*. El locus *tet* confiere la capacidad de resistencia a la tetraciclina y puede ser insertado en *A. tumefaciens* tiene un locus *tet* (Charpentier et al., 1993). *A. tumefaciens* es una bacteria sensible a tetraciclina, lo que inhibe el crecimiento de colonias al ser sembradas en un medio enriquecido con este antibiótico, sin embargo, al introducirle el locus *tet*, la tetraciclina actúa como un inductor ante este locus, lo que permite el crecimiento de cepas de *A. tumefaciens* transformadas (Luo & Farrand, 1999). La cepa AGL1 es adecuada para procesos de transformación, además de poder ser sometida a la introducción de locus *tet* (Petti et al., 2009). Según Luo et al. (2007), el locus *tet* en cepas modificadas de *A. tumefaciens* no afecta en la fisiología o el genoma de la bacteria, por lo que puede ser agregado como indicador de transformación.

Sin embargo, no todas las cepas obtenidas en el medio con tetraciclina contienen el fragmento de interés, debido a que la tetraciclina no es un indicador de la presencia de este fragmento. Además, se debe considerar que, existen mutaciones inespecíficas y espontáneas

que resultan en cepas transformadas que crecen en el medio con tetraciclina, las cuales no contienen el fragmento de interés (Luo & Farrand, 1999).

Los métodos de transformación aplicados fueron sometidos a diferentes parámetros de evaluación, los cuales fueron evaluados a través de la eficiencia de transformación (ET). Para el choque térmico, se varió la masa de ADN plasmídico: 3 ug y 5 ug, donde se obtuvo mayor CFU/ug en el volumen de ADN plasmídico menor. Por otra parte, para la electroporación se utilizaron dos celdas de diferentes tamaños para evaluar la eficiencia de transformación: 2 mm y 4 mm. Sin embargo, el equipo Eppendorf utilizado para la electroporación utilizó un voltaje diferente para cada tratamiento, valor establecido automáticamente por el equipo, independientemente del voltaje establecido de 2.5 KV, teniendo mayor CFU/ug en los tratamientos aplicados con la celda de 2 mm.

En relación con la eficiencia de transformación, las CFU/ug obtenidas para el volumen de 5 ug de ADN plasmídico obtuvo una media de  $8,6 \times 10^7$ , a diferencia de la electroporación, que se obtuvo una media de  $2,1 \times 10^8$  para el tratamiento con celdas de 2 mm y 5 ug de ADN plasmídico, por lo que, electroporación muestra ser un método de transformación genético más efectivo que choque térmico, al tener una mayor eficiencia de transformación, considerando que ambos métodos sirven para transformación *A. tumefaciens*.

Según Gómez et al. (2018), aplicando el método de choque térmico para transformar cepas de *A. tumefaciens* obtiene una eficiencia de transformación de aproximadamente  $2,6 \times 10^6$  CFU/ug, para una concentración de ADN plasmídico insertado de 5 ug. Por otra parte, Sambrook y Russell (2001), obtuvieron una eficiencia de transformación para electroporación de aproximadamente  $5 \times 10^6$  CFU/ug al aplicar un voltaje entre 1.8 KV y 2.2 KV. Utermark y Karlovsky (2008) establecen que, la cantidad de ADN plasmídico puede alterar los resultados esperados, sin embargo, puede trabajarse con cantidades de 0,1 ug a 10 ug para obtener cepas transformadas de *A. tumefaciens*, al aplicar 2.0 KV para la electroporación. Por otra

parte, Gómez et al. (2018) reporta que, para *A. tumefaciens* los valores de voltaje que pueden aplicarse para la electroporación son de 1,5 KV, 2,0 KV, 2,2 KV y 2,5KV, siendo el voltaje de 2,0 KV más eficiente.

Para comparar los dos métodos de transformación se debe tener en cuenta que existen diferencias significativas en la eficiencia de la transformación, como por ejemplo el voltaje aplicado para la electroporación o el tiempo de aplicación de los cambios de temperatura para choque térmico. Gómez et al. (2018) proponen que la electroporación tiende a una mayor efectividad por tener mejor control en la permeabilidad de la membrana, por ende, es más eficiente al introducir material genético en las células. Además, se debe tener en cuenta que, el voltaje aplicado influye en la eficiencia de transformación.

Por otra parte, el choque térmico es un método más rudimentario que podría considerarse más práctico al momento de buscar transformación genética. No obstante, según las investigaciones de García (2015), este método resulta tener una efectividad de transformación más baja, en comparación a la electroporación. Esto se debe a que *A. tumefaciens* tiene una pared celular con tres capas, lo que no permite crear poros que permitan el ingreso de ADN plasmídico (Gómez et al., 2018; López, 2006).

Para la identificación de la región promotora del gen de resistencia RGA2 en banano, se diseñó un par de primers específicos para la secuencia proporcionada por el INIAP. El tamaño esperado de la banda en la amplificación del ADN de banano era de 448 pb, sin embargo, no amplificó la banda esperada para la identificación de la región promotora del gen de resistencia RGA2. Según la investigación de Yang et al. (2016), la región promotora que contiene el gen de resistencia de banano RGA2 para FOC R4T debe amplificar 426 pb aproximadamente. Algunos de los factores que influyen en la PCR son: la calidad de ADN, la mezcla de la reacción, la conservación de reactivos, la calidad de los reactivos, el régimen de ciclaje o la polimerasa; lo que puede influir directamente en la amplificación esperada (Bolívar et al., 2014). Por otra

parte, el equipo utilizado en la PCR debe encontrarse calibrado y en un estado óptimo para así ser utilizado para ejecutar la reacción. Esto debido a que, si por alguna razón un equipo no se encuentra en las condiciones adecuadas, puede influir directamente en la reacción, por lo que puede inhibir la PCR, dándonos un falso negativo (Vázquez & Morales, 2014).

Los valores obtenidos en el análisis estadístico de la viabilidad de criopreservación reportan que el agente crioprotector más eficiente, por las CFU calculadas, es el DMSO al 10% de concentración, criopreservado durante 2 meses, a comparación del Glicerol y el polietilenglicol. Se pudo determinar que existen diferencias significativas entre tratamientos y agentes crioprotectores aplicados. Según la investigación de Ozuna et al. (2019), para las concentraciones entre 12,5 % y 25%, el DMSO actúan como mejor agente crioprotector que el glicerol. Se debe tomar en cuenta que, el glicerol es menos tóxico que el DMSO, sin embargo, el DMSO penetra más a la célula, por lo que tiende a criopreservar mejor (Farrant, 1980). La investigación de Ahn et al. (2021) reporta que el DMSO y el glicerol actúan eficientemente como agentes crioprotectores en comparación al polietilenglicol, considerando que pueden apoyarse con otros agentes crioprotectores para aumentar su efectividad.

## **Capítulo V: Conclusiones**

La extracción de ADN plasmídico para la transformación genética debe ser ejecutada, para evitar la presencia de contaminantes y la de fenoles, ya que estos pueden influir en la transformación. En el trabajo realizado, se obtuvieron plásmidos de tres cepas diferentes de *E. coli*, sin embargo, solo se trabajó con plásmidos de la cepa Top 10 al tener una concentración más alta y una mejor pureza que las otras dos cepas.

Se alcanzó con éxito la transformación bacteriana con el plásmido que contiene el sistema CRISPR Cas con un ARN guía que tiene como target la región promotora del gen RGA2 aplicando los dos métodos de transformación establecidos. Se encontró diferencias

significativas entre ambos métodos de transformación, siendo la electroporación más efectiva que el choque térmico.

No se pudo confirmar la presencia de la región promotora del gen RGA2 en muestras de banano, debido a la falta de información acerca del origen de la secuencia proporcionada para el trabajo de titulación previo a esta investigación.

Los agentes crioprotectores aplicados resultaron tener una viabilidad favorable para la conservación de cepas de *A. tumefaciens* transformadas y no transformadas. El DMSO resultó ser el mejor agente crioprotector en ambas concentraciones evaluadas. Sin embargo, el glicerol como agente crioprotector también es adecuado, a pesar de tener un menor CFU en comparación del DMSO.

## **Capítulo VI: Recomendaciones**

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

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

Para evaluar la eficiencia de transformación y la viabilidad de conservación, se debe considerar realizar algunas pruebas aplicando diferentes metodologías para proceder con el

diseño experimental. Además, se debe investigar a profundidad para poder modificar los protocolos estandarizados para así obtener un mejor resultado.

### Capítulo VII: Referencias Bibliográficas

Ahn, H. T., Jang, I. S., Dang, T. V., Kim, Y. H., Lee, D. H., Choi, H. S., . . . Kim, M. I. (2021).

Effective Cryopreservation of a Bioluminescent Auxotrophic *Escherichia coli*-Based Amino Acid Array to Enable Long-Term Ready-to-Use Applications. *Biosensors*, 11(8), 252. doi:10.3390/bios11080252

Bolívar, A., Rojas, A., & García, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3(1), 25-33.

Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M., Lama, C., & Mercado, J. (2019). Corrigendum: Biological Control Agents Against *Fusarium* Wilt of Banana. *Front. Microbiol*, 10:1290.

doi:10.3389/fmicb.2019.01290



- C A Souza, P., Elisei, C., O Soares, C., & L Massard, C. (2000). Criopreservación de *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* con glicerol. *Parasitología al día*, 24(1-2), 22-26. doi:10.4067/S0716-07202000000100003
- Castilla, Y. (2012). Conservación de recursos fitogenéticos de café (*Coffea* spp.) por métodos biotecnológicos: una alternativa para su preservación. *Cultivos tropicales*, 33(4), 29-39. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362012000400004&lng=es&tng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362012000400004&lng=es&tng=es).
- Chan, W., Verma, C., Lane, D., & Gan, S. (2013). A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Representante de Biosci*, 33(6). doi:10.1042/BSR20130098
- Charpentier, E., Gerbaud, G., & Courvalin, P. (1993). Characterization of a new class of tetracycline-resistance gene tet(S) in *Listeria monocytogenes* BM4210. *Gene*, 131(1), 27-34. doi:10.1016/0378-1119(93)90665-p
- Dale, J., James, A., Paul, J., Khanna, H., Smith, M., Peraza, S., . . . Harding, R. (2017). Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nature Communications*, 8, 1496. doi:10.1038/s41467-017-01670-6
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E., & Staver, C. (2018). *Fusarium* Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Front. Plant Sci*, 9:1468. doi:10.3389/fpls.2018.01468
- Farrant, J. (1980). General observations on cell preservation. *Preservation in Medicine and Biology. Pitman Medical.* , 1-18.

- Florencio, J., Alarcón, A., García, C., Ferrera, R., Quezada, A., Almaraz, J., . . . Hernández, L. (2023). Inhibición in vitro de bacterias contra *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 2. *Revista mexicana de fitopatología*, 41(1), 126-142. doi:10.18781/r.mex.fit.2207-2
- García, F. (2015). Transformación genética de *Neochloris oleoabundans* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y electroporación. Retrieved from <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/351/401140.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gómez, E., Tavares, L., & Reyna, A. (2009). Tiempo de supervivencia in vivo y criopreservación de *Trypanosoma Vivax*. *Revista Científica*, 19(3), 225-229. Retrieved from [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592009000300002&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000300002&lng=es&tlng=es).
- Gómez, L., Gómez, S., & Nuñez, V. (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. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-74882018000200009&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882018000200009&lng=en&tlng=es).
- Gómez, R., Reyes, M., Bermúdez, I., Chong, B., & Alvarado, Y. (2010). Nuevo método para la selección rápida de plantas de banano (*Musa* spp. AAA cv. *Grande naine*) transformadas con gen bar procedentes de campo, empleando glufosinato de amonio. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 248-258. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752010000200022&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752010000200022&lng=en&tlng=es)

- Gonzalez, D., Argumedo, R., Morales, A., Pulido, A., Cervantes, L., Grimaldo, O., & Alarcón, A. (2010). A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 162-166.
- Gutiérrez, J., Luna, L., Mendoza, M., Díaz, G., Burguete, J., & Feliciano, J. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 95-102. Retrieved from [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562015000200007&lng=es&tling=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562015000200007&lng=es&tling=es).
- Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *En Methods in Enzymology*, 204, 63-113. doi:10.1016/0076-6879(91)04006-A
- Higuera, L., Ortega, D., Rodríguez, J., & Patiño, R. (2009). Comparación de tres tratamientos para la crioconservación de serovares de *Leptospira* en nitrógeno líquido. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 9(2), 72–76. doi:10.21930/rcta.vol9\_num2\_art:120
- Lebuhn, M., Derenkó, J., Rademacher, A., Helbig, S., Munk, B., Pechtl, A., . . . Klocke, M. (2016). DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison. *Bioengineering*, 3(1), 7. doi:10.3390/bioengineering3010007
- Li, C., Yang, J., Li, W., Sun, J., & Peng, M. (2017). Direct Root Penetration and Rhizome Vascular Colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* are the Key Steps in the Successful Infection of Brazil Cavendish. *Plant Disease*, 101(12), 2073-2078. doi:10.1094/PDIS-04-17-0467-RE

- López, S., & Castaño, J. (2019). Manejo integrado del mal de Panamá [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. sp. cubense (E.F. SM.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2).  
doi:10.31910/rudca.v22.n2.2019.1240
- Luo, Z., & Farand, S. (1999). Cloning and Characterization of a Tetracycline Resistance Determinant Present in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *J Bacteriol*, 181.  
doi:doi.org/10.1128/jb.181.2.618-626.1999
- Luo, Z., Farand, S., & Clemente, T. (2007). Construction of a Derivative of *Agrobacterium tumefaciens* C58 That Does Not Mutate to Tetracycline Resistance. *MPMI*, 14(1).  
doi:10.1094/MPMI.2001.14.1.98
- Main, G., Reynolds, S., & Gartland, J. (1995). Electroporation Protocols for *Agrobacterium*. In: Gartland, K.M.A., Davey, M.R. (eds) *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology™*, 44. doi:10.1385/0-89603-302-3:405
- Martínez, G., Rey, J., Pargas, R., & Manzanilla, E. (2020). Marchitez por *Fusarium* raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano. *Agronomía Mesoamericana*, 31(1), 259-276. doi:10.15517/am.v31i1.37925
- Nagel, R., Elliott, A., Masel, A., Birch, R., & Manners, J. (1990). Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, 67(3), 325–328. doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb04041.x
- Ozuna, C., Rojas, A., Arias, L., Meza, T., Guillén, Y., & Acosta, M. (2019). Criopreservación de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* utilizando como criopreservante DMSO y glicerol. *Revista científica ciencias de la salud*, 1(1), 46-51. doi:10.53732/rccsalud/01.01.2019.46

- Peraza, S., Dale, J., Harding, R., Smith, M., & Collet, C. (2008). Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from banana and correlation of a transcriptional polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4. *Molecular Breeding*, 22, 565-579. doi:10.1007/s11032-008-9199-x.
- Petti, C., Wendt, T., Meade, C., & Mullins, E. (2009). Evidence of genotype dependency within *Agrobacterium tumefaciens* in relation to the integration of vector backbone sequence in transgenic *Phytophthora infestans*-tolerant potato. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(3), 301-306. doi:10.1016/j.jbiosc.2008.11.012.
- Poon, N., & Teo, C. (2019). Fusarium Wilt Disease of Banana: Current Development of *Fusarium* Resistant Banana. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 8(3). doi:10.23880/oajmb-16000134
- Porteles, M., Rodríguez, D., Ulacio, D., & Torres, J. (2015). Determinación de razas y grupos de compatibilidad vegetativa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en *Musa*, en los estados Carabobo, Cojedes, Guárico y Miranda, Venezuela. *Saber*, 27(2), 334-340. Retrieved from [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-01622015000200016&lng=es&tIng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622015000200016&lng=es&tIng=es).
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). Molecular cloning a laboratory manual. *Edition 3a*, New York, Cold spring harbor laboratory press. , 1.35-1.37.
- Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402-419. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es&tIng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es&tIng=es).

- Utermark, J., & Karlovsky, P. (2008). Genetic transformation of filamentous fungi by *Agrobacterium tumefaciens*. *Protocol Exchange*. Retrieved from <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/427>.
- Vazquez, A., & Morales, A. (2014). Microsatélites. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 75-100.
- Villanta, J. (2014). Optimización de un protocolo de transformación genética mediada por *agrobacterium tumefaciens* para el mejoramiento de café (*coffea arabica* L. Var. Catuai). Retrieved from <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/3298>
- Wilson, K. (2001). Current Protocols in Molecular Biology Unit 2.4, basic Protocol preparation of Genomic DNA from bacteria. 7.
- Yang, C., Hamid, S., & Wong, M. (2016). Characterisation of pathogenesis-related genes and resistance gene candidates in banana (*Musa acuminata*) and their expression during host-pathogen interaction. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 39 (1), 55-72.
- Yang, J., & Yang, Y. (2012). Plasmid size can affect the ability of *Escherichia coli* to produce high-quality plasmids. 34(11), 2017-2022. doi:10.1007/s10529-012-0994-4