



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

CLONACIÓN DE GENES PARA ELABORACIÓN DE CONTROLES
POSITIVOS INTERNOS PARA LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES
QUE AFECTAN EL SECTOR AGROPECUARIO

AUTOR

Juan David Bález Sotomayor

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

**CLONACIÓN DE GENES PARA ELABORACIÓN DE CONTROLES
POSITIVOS INTERNOS PARA LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES QUE
AFECTAN EL SECTOR AGROPECUARIO**

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología.

Profesor Guía

M. Sc. María Gabriela Granja Bastidas

Autor

Juan David Báez Sotomayor

Año

2017

DECLARACION DEL DOCENTE GUIA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

María Gabriela Granja Bastidas

Master en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina: Especialidad el
Patología Molecular.

CI: 1712995149

DECLARACION DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Alina Aguirre Quevedo

Doctora en Ciencias Biológicas

CI: 1756594600

DECLARACION DEL DIRECTOR CIENTIFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientado sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Wladimir Javier Enríquez Villacreses

Ingeniero en Biotecnología

CI: 1720636255

DECLARACION DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Juan David Báez Sotomayor

CI: 1723304588

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas en los Laboratorios de AGROCALIDAD que me ayudaron a concluir con mi proyecto de titulación, en especial a Wladimir, Anita, Paty y David que me brindaron todo su apoyo. A la docente María Gabriela Granja por guiarme en cada paso del proyecto. A Priscila Merino por acompañarme todo este tiempo y brindarme sus consejos. En especial Pamela Calle, una de las mejores personas que he tenido la suerte de conocer, desde el primer instante que nos conocimos hemos compartido aventuras, experiencias, risas y tristezas. Personas como ella son tan difíciles de encontrar que cuando aparecen es imposible dejarlas ir

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis abuelitos, María Beatriz y Luis Antonio los cuales siempre estuvieron apoyándome en todo mientras seguían con vida. A mi tía Sari que siempre me brinda su apoyo incondicional y mis padres Jhasymin y Luis, los cuales me dieron lo necesario para alcanzar mis metas y sueños.

RESUMEN

En este estudio se desarrollaron controles positivos para la validación del diagnóstico, por reacción en cadena de la polimerasa, de enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical y el virus PRRS. Se realizó análisis *in silico* de los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento de interés y de la inserción del ADN en el vector recombinante pGEM®- T Easy de Promega, el cual fue utilizado para realizar la clonación. Se validó exitosamente un protocolo para la obtención de células competentes a partir de la cepa de *Escherichia coli* JM109 y mediante Ingeniería Genética se insertaron los fragmentos de interés para generar los controles positivos. No se encontraron cambios en la secuencia de ADN en relación al molde empleado. La eficiencia de los métodos y protocolos utilizados se comprobó por la similitud de resultados obtenida entre las pruebas “*in silico*” e “*in vitro*”. Los clones obtenidos fueron utilizados para la elaboración de un banco de células conservadas en solución de glicerol al 60% y almacenados a una temperatura de -80°C.

Palabras clave: Ingeniería Genética, *Fusarium oxysporum*, PRRS, *Escherichia coli* JM109

ABSTRACT

Positive controls for diagnose validation of diseases caused by tropical *Fusarium oxysporum* f. sp *cubense* breed 4 and PPRS virus through polymerase chain reaction were developed. In silico analysis of the primers used for both the amplification and the insertion of the DNA fragment into Promega's recombinant vector PGEM®- T Easy was carried. A protocol to obtain competent cells from the *Escherichia coli* JM109 strain was successfully validated, fragments of interest were introduced into them through genetic engineering generating the positive controls. There were no changes found in the used DNA template. Method and protocol efficiency was proven by the similarity of the results obtained in both the "in silico" and "in vitro" tests. The obtained clones were used to create a cell bank that will be kept in a 60% glycerol solution stored at -80°C.

Key words: Genetic engineering, *Fusarium oxysporum*, PPRS, *Escherichia coli* JM109

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Justificación.....	5
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Ingeniería genética.....	5
2.1.1 Generalidades de Ingeniería Genética	5
2.1.2 Etapas de Ingeniería Genética	7
2.1.2.1 Obtención del material genético de interés	9
2.1.2.2 Células hospederas.....	11
2.1.2.3 Vectores de clonación	13
2.1.2.4 Unión del ADN de interés al vector	14
2.1.2.5 Transformación	15
2.1.2.6 Selección de las células transformadas	16
2.1.2.7 Análisis de los clones transformados	18
2.1.2.8 Preservación de los clones de interés.....	20
2.2 Enfermedades relevantes para el sector agropecuario del Ecuador.....	22
2.2.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 4 tropical.....	22
2.2.1.1 Generalidades.....	22
2.2.1.2 Taxonomía	23

2.2.1.3 Distribución	25
2.2.1.4 Sintomatología y detección de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	26
2.2.1.4.1 Ciclo de vida del hongo	26
2.2.1.4.2 Sintomatología y detección en plantas de banano	28
2.2.1.4.3 Detección mediante análisis microbiológico	31
2.2.1.4.4 Detección mediante Biología Molecular.....	33
2.2.2 Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (VPRRS)	34
2.2.2.1 Generalidades	34
2.2.2.2 Taxonomía	34
2.2.2.3 Estructura del virus.....	35
2.2.2.3.1 Morfología.....	35
2.2.2.4 Distribución	36
2.2.2.5 Sintomatología y detección del virus de PRRS	38
2.2.2.5.1 Formas de transmisión del virus	38
2.2.2.5.2 Sintomatología en cerdos	38
2.2.2.5.3 Detección mediante ELISA.....	39
2.2.2.5.4 Detección mediante PCR	40
3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL	40
4. PROCEDIMIENTOS.....	41
4.1 Población y muestra.....	41
4.2 Materiales y métodos.....	42
4.2.1 Obtención de células quimiocompetentes	42
4.2.1.1 Elaboración de la curva de calibrado de células JM109.....	42
4.2.1.2 Curva de crecimiento células JM109.....	44
4.2.1.3 Aislamiento y masificación de células JM109	44

4.2.1.4 Soluciones tamponadoras para la obtención de células quimiocompetentes	44
4.2.1.4.1. Elaboración Solución tampón A.....	45
4.2.1.4.2 Elaboración Solución tampón B.....	45
4.2.1.4.3 Obtención de células quimiocompetente	45
4.2.1.4.4 Cuantificación células quimiocompetentes	47
4.3 Ensayo de clonación con control positivo del kit pGEM [®] -T Easy Vector.....	48
4.3.1 Preparación de medios de cultivos específicos	48
4.3.1.1 Ampicilina para medios de cultivo	48
4.3.1.2 Medios de cultivo con antibióticos	48
4.3.1.3 Medios de cultivo con X-gal	48
4.3.2 Ligazón del vector pGEM [®] -T Easy con control positivo interno	49
4.3.3 Shock térmico para transformación	49
4.4 Ingeniería Genética <i>in silico</i>	50
4.4.1 Análisis de los cebadores a utilizar	50
4.4.2 PCR <i>in silico</i>	51
4.4.3 Ligazón del vector <i>in silico</i>	52
4.5 Ingeniería Genética <i>in vitro</i>	52
4.5.1. Material genético de partida para amplificación mediante PCR.....	52
4.5.2. Amplificación del virus de PRRS por PCR.....	52
4.5.2.1 Obtención de ADNc del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (VPRRS)	52
4.5.2.2. Amplificación del ADNc por PCR	55
4.5.3 Amplificación de <i>Fusarium osysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> raza 4 tropical por PCR	56
4.5.4 Purificación de los productos de PCR en gel de Agarosa.....	58
4.5.5 Cuantificación del ADN purificado	59
4.5.6 Ligazón de los productos de PCR purificados y shock térmico de las células competentes.....	59

4.5.7 Masificación de las colonias transformadas.....	60
4.5.8 Extracción del ADN plasmídico de las colonias transformadas	61
4.5.9 PCR del ADN plasmídico con cebadores específicos.....	62
4.5.10 Visualización de la PCR del ADN clonado en gel de agarosa	62
4.6 Secuenciación de los productos de PCR de ADN plasmídico...	62
4.7 Preservación de células	63
4.8. Análisis de resultados obtenidos	63
4.8.1 Análisis de colonias transformadas	63
4.8.2 Análisis de secuenciación.....	63
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
5.1. Obtención de células quimiocompetentes.....	64
5.1.1. Elaboración de la curva de calibrado de células JM109	64
5.1.2. Curva de crecimiento células JM109	66
5.1.3. Cuantificación células quimiocompetentes	67
5.2. Ensayo de clonación con control positivo del kit pGEM®-T Easy Vector.....	68
5.3. Ingeniería Genética <i>in silico</i>	71
5.3.1. Análisis de los cebadores a utilizar	71
5.3.2. PCR <i>in silico</i>	77
5.3.3. Ligazón del vector <i>in silico</i>	79
5.4. Ingeniería Genética <i>in vitro</i>	80
5.4.1. Amplificación de genes de interés para clonación mediante PCR	80
5.4.3 Eficiencia de transformación	82
5.4.4. PCR, secuenciación y conservación del gen de interés	85
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	93

6.1 Conclusiones	93
6.2 Recomendaciones.....	93
REFERENCIAS	94
ANEXOS	112

Índice de Tablas

Tabla 1. Enzimas de restricción comúnmente empleadas y sus respectivos sitios de reconocimiento.....	19
Tabla 2. Diferentes variedades que afectan cada una de las razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	24
Tabla 3. Países donde se han presentado el virus de PRRS.....	37
Tabla 4. Diluciones seriadas para elaboración de curva de calibrado.....	43
Tabla 5. Volúmenes para ensamblaje del vector -T easy con el control positivo del kit.....	49
Tabla 6. Secuencia y nombre de los cebadores utilizados.....	51
Tabla 7. Master mix 1 para retro transcripción (RT).....	53
Tabla 8. Perfil térmico para master mix 1 de retro transcripción (RT).....	53
Tabla 9. Master mix 2 para retro transcripción (RT) con enzima MLV (PRROMEGA).....	54
Tabla 10. Perfil térmico para master mix 2 de retro transcripción (RT).....	54
Tabla 11. Concentraciones para amplificación del virus de PRRRS mediante PCR.....	55
Tabla 12. Perfil térmico del virus de PRRS.....	55
Tabla 13. Concentraciones para amplificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 4 tropical mediante PCR.....	57
Tabla 14. Perfil térmico de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 4 tropical.....	57
Tabla 15. Master mix para ligazón del vector con gen de interés.....	59
Tabla 16. Absorbancia y concentración celular (mg/L) de caja juego de células quimiocompetentes.....	68
Tabla 17. Resultados del análisis BLAST para el cebador Forward FoCTR4.....	71
Tabla 18. Resultados del análisis BLAST para el cebador Reverse FoCTR4.....	73
Tabla 19. Resultados del análisis BLAST para el cebador Forward P1(PRRS).....	75

Tabla 20. Resultados del análisis BLAST para el cebador Reverse P2(PRRS).....	76
Tabla 21. Eficiencia de transformación a temperatura ambiente.....	83
Tabla 22. Eficiencia de transformación a temperatura 4°C.....	83
Tabla 23. Resultado del analisis BLAST del ADN plasmídico del clon de Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 tropical.....	87
Tabla 24. Resultados del análisis BLAST del ADN plasmídico del clon del virus de PRRS.....	90
Tabla 25. Características de los clones del banco de conservación.....	92

Índice de Figuras

Figura 1. Diseño de pGEM [®] -T Easy Vector Systeme I.....	14
Figura 2. Reacción del Xgal en el medio de cultivo.....	17
Figura 3. Distribución del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> según datos del CABI hasta 2016.....	25
Figura 4. Distribución del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> según datos de EPPO hasta el 18 de abril de 2017.....	26
Figura 5. Diferencias entre “Síndrome de las hojas amarillas” y “Síndrome de las hojas verdes”.....	29
Figura 6. Cortes verticales y transversales en pseudotallo de planta de banano infectada con <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i>	30
Figura 7. Medidas morfométricas de las esporas y aislamiento de PDA del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i>	32
Figura 8. Morfología del virus de PRRS.....	36
Figura 9. Metodología a emplearse para el desarrollo del trabajo de titulación.....	41
Figura 10. Curva de calibrado de células JM109 (<i>E. coli</i>) con absorbancia de 600nm.....	66
Figura 11. Curva de crecimiento de células JM109.....	67
Figura 12. Progreso de crecimiento de las células quimiocompetentes.....	70
Figura 13. Amplicón obtenido mediante PCR in silico de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> raza 4 tropical.....	78
Figura 14. Amplicón obtenido mediante PCR in silico del virus de PRRS.....	78
Figura 15. Diseño del vector pGEM [®] -T Easy con amplicón de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> raza 4 tropical.....	79
Figura 16. Diseño del vector pGEM [®] -T Easy con amplicón del virus de PRRS.....	80
Figura 17. Visualización del producto de PCR de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> raza 4 tropical de 472 bp.....	81
Figura 18. Visualización del producto de PCR del virus de PRRS de ~300 bp.....	82

Figura 19. Visualización del producto de PCR de ADN plasmídico de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza 4 tropical.....	86
Figura 20. Secuencia de ADN original y clonada de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza 4 tropical.....	87
Figura 21. Visualización del producto de PCR de ADN plasmídico del virus de PRRS.....	89
Figura 22. Secuencia de ADN original y clonada del virus de PRRS.....	90

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Los productos derivados de las áreas agrícola y ganadera son comercializados a nivel global entre diferentes países, para lo cual existen diversas normas para su exportación e importación con el fin de no transmitir enfermedades cuarentenarias a otros países (Agrocalidad, 2017; MAPAMA, 2016). Varios organismos a nivel regional e internacional controlan el cumplimiento de las normas establecidas para el intercambio comercial de los productos. A nivel nacional, la institución encargada del cumplimiento de estas normas es la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), institución pública adscrita al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP) encargada de otorgar los permisos fitozoo-sanitarios (Ministerio de Agricultura, Ganadería, 2014) a nivel nacional (MAGAP, 2017).

El Ecuador posee una importante producción tanto en el sector pecuario como en el sector agrícola (INEC, 2016; MAGAP, 2017). En cuanto al sector ganadero, el país cuenta fundamentalmente con bovinos y porcinos (INEC, 2016; MAGAP, 2017; Mestanza & Velasco, 2015), los cuales representan una fuente de ingresos importantes debido al volumen de las exportaciones realizadas. A su vez, en el sector agrícola el Ecuador cuenta con varios productos de importancia en la exportación tales como: el banano, cacao, café, papá, entre otros.

El sector agropecuario es muy importante en la economía de muchos países y representa un rubro económico destacado, por esta razón es indispensable el control de enfermedades en plantas y animales. De hecho, para garantizar el control de las mismas no se permite la exportación de ningún producto que no cumpla con las normas sanitarias del país de exportación, así como aquellas que rigen en el país que importa el producto (EPPO, 2004; FAO, 2007, 2017).

Existen diversos métodos para la detección de las enfermedades en los productos sujetos a exportación e importación. En el caso de las plantas, una de los más utilizados es la comparación entre una planta sana y plantas que se sospecha poseen la enfermedad por simple inspección, no obstante se requiere de mucha experiencia y capacitación para lograr el diagnóstico de forma satisfactoria (Riley, Williamson, & Maloy, 2002).

Adicionalmente, se pueden detectar enfermedades por medio del aislamiento de los patógenos presentes por técnicas microbiológicas, sin embargo, este procedimiento requiere de mucho tiempo para la obtención definitiva de resultados, lo cual puede generar pérdidas económicas (Riley et al., 2002).

Por otro lado, se pueden emplear inmunoensayos basados en la unión antígeno-anticuerpo para la detección de los patógenos. En este tipo de ensayos una reacción positiva nos permite conocer si la enfermedad está presente en el individuo o, en su defecto, si presenta producción de anticuerpos contra la enfermedad por vacunación previa (Acosta, Pinedo, Hernández, & Villarreal, 2013; Enciso et al., 2004; Ochoa et al., 2000; Rodríguez, Rangel, Centeno, Mendoza, & Parra, 2004). Las técnicas de inmunoensayo son aplicables tanto en plantas como en animales para detectar patógenos o enfermedades (Acosta et al., 2013; Rodríguez et al., 2004), sin embargo, se utilizan mayormente para el área animal en comparación con el área vegetal. Pese a sus ventajas las técnicas de inmunoensayo suelen ser costosas y muchas veces se ven limitadas para la detección de algunos patógenos. Por esta razón, en diversos casos se emplean técnicas de biología molecular, las cuales pueden resultar más rápidas, económicas y precisas que las mencionadas anteriormente.

Entre las técnicas más empleadas en biología molecular se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y todas sus variantes. Algunas ventajas que la destacan respecto a otras técnicas de

detección son su sensibilidad y bajo costo ya que se necesita una mínima cantidad de material de partida para que la detección sea efectiva.

El laboratorio de Biología Molecular de AGROCALIDAD se encuentra en capacidad de diagnosticar diversas enfermedades con relevancia para el sector agropecuario, entre las que se incluyen: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical y el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), empleando la técnica de PCR convencional y PCR en tiempo real (qPCR), La sensibilidad, eficiencia y especificidad de esta técnica permite la detección de un amplio rango de enfermedades, lo que posibilita llevar un control efectivo de enfermedades de interés para el sector agropecuario (AGROCALIDAD, 2017).

1.2 Planteamiento del problema

Una de las enfermedades más comunes y devastadoras a nivel internacional en el sector pecuario es la causada por el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (VPRRS). Se conoce que el año 2006 en China el virus de PRRS aquejó a más de 2 millones de cerdos de los cuales 400000 fallecieron por la enfermedad, afectando al sector porcino por 5 meses consecutivos y por ende, la economía de los productores (ANELLI & FAO, 2010; FAO et al., 2011). En el Ecuador actualmente no se registra la presencia de esta enfermedad.

Por otra parte, en el sector agrícola una de las enfermedades más comunes es la causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical. Respecto a ésta enfermedad existen reportes a nivel mundial que dan cuenta de sus efectos. En Indonesia en el año 2002 cuando la enfermedad atacó se estimaron pérdidas de alrededor de 11 millones de dólares al afectar 500 hectáreas de cultivos. A su vez, en el año 2000 China reportó la enfermedad que afectó a 65000 hectáreas de producción, equivalente al 25% de sus cultivos. La enfermedad impactó severamente la economía del sector en ambos casos (Sotomayor & INIAP, 2012). No se ha detectado la presencia de este hongo dentro del territorio ecuatoriano.

El control y prevención de estas enfermedades es fundamental para mantener las exportaciones y evitar importantes afectaciones al sector agropecuario. A cargo de estas actividades de control y prevención en nuestro país se encuentra AGROCALIDAD, que en los últimos años ha implementado una gran variedad de análisis moleculares con el fin de garantizar estándares de calidad en la producción destinada a la exportación. Sin embargo, los controles positivos empleados para validar éstas técnicas han sido, en su mayoría, adquiridos en el exterior lo cual supone costos elevados para la institución. Adicionalmente, algunos de los controles de referencia necesarios son difíciles de adquirir por lo que la validación de las pruebas se ve limitada.

Finalmente, cabe mencionar que en cuanto a las enfermedades *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical y el virus de PRRS en la actualidad no se dispone de controles que permitan validar su presencia mediante la técnica de PCR en esta institución (Agrocalidad, 2017).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Obtener controles positivos internos para la detección de las enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical y el Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (PRRSV) mediante Ingeniería Genética.

1.3.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de clonación de los genes correspondientes a las especies de interés diagnóstico.
- Validar los clones obtenidos mediante métodos de biología molecular.

- Establecer un banco para la conservación de los clones obtenidos como controles positivos internos, para su posterior aplicación en métodos diagnósticos de enfermedades de relevancia en el sector agropecuario del país

1.4 Justificación

De acuerdo con lo antes expuesto, y con el fin de solventar la ausencia de controles positivos internos que permitan validar las técnicas moleculares de detección de las enfermedades de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical y el virus de PRRS, el objetivo de este trabajo está enfocado al desarrollo mediante técnicas de Ingeniería Genética de controles de referencia internos de tipo plasmídico para ser empleados en AGROCALIDAD de forma rutinaria.

La implementación de estos controles gracias a la tecnología del ADN recombinante nos permitirá obtener clones, los cuales, una vez establecidos, garantizarán una fuente ilimitada del material genético de interés, logrando de esta manera que el laboratorio cuente con controles de referencia internos apropiados.

Finalmente, es importante mencionar que el material de referencia obtenido eliminará la dependencia de los controles adquiridos a diferentes casas comerciales que implican un alto costo económico, siendo por tanto un aporte importante para la institución y el país.

2. Marco teórico

2.1 Ingeniería genética

2.1.1 Generalidades de Ingeniería Genética

La Ingeniería Genética es una ciencia relativamente moderna comparada con otras (Buendía, 2010; Chaparro, 2014; Mainero, 2015) y se define como el conjunto de técnicas y tecnologías que permiten la manipulación, edición y transferencia del ADN de un organismo para obtener un fin (Buendía, 2010; Klug, Cummings, & Spencer, 2006; S. B. Primrose, Twyman, Primrose, & Primrose, 2006).

La tecnología para manipular el ADN (ácido desoxirribonucleico) se viene desarrollando aproximadamente hace 40 años (S. Primrose & Twyman, 2006), y es gracias a ésta que la Ingeniería Genética surgió y ha progresado siendo usada para diversos fines, entre los que cabe resaltar el desarrollo de nuevas herramientas para el diagnóstico de múltiples enfermedades (Mainero, 2015; S. Primrose & Twyman, 2006). Actualmente, existen diversas técnicas de manipulación del ADN que podemos aplicar dependiendo de los insumos disponibles y de los fines para los cuales se destinen.

El correcto manejo del ADN requiere de la integración de diferentes ciencias, tales como: física, química, biología, matemáticas, estadística y biología molecular, las cuales se complementan entre ellas con el fin de lograr una mejor manipulación del ADN (Mainero, 2015).

Actualmente, la Ingeniería Genética se aplica en las diversas áreas de la Biotecnología las cuales involucran distintos organismos que van desde los más simples del planeta como son las bacterias hasta organismos tan complejos como el ser humano, pasando por las plantas y animales (Buendía, 2010; Chaparro, 2014; Gutiérrez-Samperio, 2002; Mainero, 2015). En cada área, esta ciencia es utilizada para un fin diferente, sin embargo, en todas se desea obtener un beneficio.

En el área de Biotecnología Vegetal se puede observar que, es utilizada principalmente para la obtención de plantas que posean características que les permitan resistir condiciones climáticas extremas (Chaparro, 2014) o cultivos que

posean mejores cualidades nutricionales para alimentar a personas o animales (Chaparro, 2014; Mainero, 2015). Así mismo, se puede emplear para la detección, prevención y tratamiento de enfermedades vegetales.

A su vez, las aplicaciones en el área de la Biotecnología Humana y Animal son varias, siendo unas de las más relevantes: la detección y tratamiento de enfermedades, así como la investigación, desarrollo y producción de medicamentos (Buendía, 2010; Gutiérrez-Samperio, 2002; Mainero, 2015).

Finalmente, el uso de organismos modelo y la Ingeniería Genética han facilitado conocer el comportamiento de la mayoría de los seres vivos, permitiendo obtener información acerca de los aspectos bioquímicos y fisiológicos que facilitan procesos tales como: la división celular, la expresión y regulación de la información genética, el uso y asimilación de energía, que permiten extrapolar los datos obtenidos a otros organismos similares o que se relacionen de alguna manera entre ellos (Fields, 2005; Mainero, 2015). Entre los organismos modelos más utilizados para estos fines se encuentran: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* y *Arabidopsis thaliana* (American Society of Plant Biologists, 2017; Fields, 2005; Mainero, 2015; TAIR, 2017).

2.1.2 Etapas de Ingeniería Genética

La Ingeniería Genética se desarrolla a través de varias etapas para obtener el producto deseado, el cual puede ser una proteína, un gen de interés clonado o la obtención de clones para la preservación del material genético (Klug et al., 2006; S. Primrose & Twyman, 2006).

Para esto se inicia con la secuencia genética deseada, para lo cual se debe conocer la función que desempeña y el tamaño de la misma. En caso de ser una

secuencia que codifica una proteína, se requiere identificar las rutas metabólicas involucradas y las modificaciones post-traduccionales en caso de tenerlas. Una vez identificada la secuencia a trabajar se debe analizar a partir de qué fuente se obtendrá, qué método se utilizará para la extracción de la misma y cuáles insumos están disponibles para realizar la obtención. Cuando se tiene toda esta información se selecciona el hospedero a utilizar tomando en cuenta el producto que se desea obtener para la selección del vector adecuado.

Este paso es fundamental para el proceso ya que existe una diversidad de vectores como son: plasmídicos, virales, de tipo cósmidos, YAC, BAC y fagémidos. Cada uno posee características diferentes en función al tamaño de la secuencia que es posible insertar y su estabilidad. Dependiendo del tipo de vector a emplearse se utilizan diferentes métodos de unión del vector con la secuencia genética deseada, al vector que porta el ADN de interés se le llama ADN recombinante. Tras la unión del vector y el gen de interés se debe proceder a insertar el vector dentro de la célula hospedera previamente seleccionada, por cualquier metodología deseada (depende de la implementación de cada laboratorio).

Una vez que el hospedero porta el vector recombinante se selecciona una de las colonias transformadas para analizarla y verificar la correcta inserción del gen de interés. Luego de realizar todos los pasos anteriores se debe conservar la célula hospedera transformada con el vector recombinante. La técnica de preservación puede variar dependiendo lo que se desea obtener al final (Klug et al., 2006; S. Primrose & Twyman, 2006).

2.1.2.1 Obtención del material genético de interés

La obtención del material genético, ya sea este ADN o ARN (Ácido Ribonucleico), es el primer paso o punto de partida de la Ingeniería Genética (Chaparro, 2014; Dahm, 2005; Kennedy et al., 2014; Mainero, 2015).

El proceso se puede realizar por diversos métodos, entre los más utilizados se encuentra el uso de diversos kits, los cuales permiten realizar la extracción de manera rápida y sencilla. No obstante, una de las principales desventajas que presentan los kits de extracción está relacionada con los altos costos de adquisición de los mismos.

Cabe mencionar, que la extracción de ADN y ARN se puede realizar también de forma manual, presentando un menor costo comparado con los kits; pero aumentando el tiempo para la obtención del material. Algunas de las metodologías empleadas para este fin incluyen: el uso de agentes caotrópicos que lisan las células, método de ebullición, método de centrifugación para la obtención del material genético según su peso molecular, etc (Kennedy et al., 2014; McAlexander, Phillips, & Witwer, 2013; Shelke, Lässer, Gho, & Lötvall, 2014; Sonnenberg et al., 2014).

Una vez que se ha obtenido el ácido nucleico correspondiente del organismo blanco se procede a obtener el gen o fragmento de ADN de interés a ser insertado en el vector. Para esto se emplea habitualmente la técnica de PCR. La misma consiste en una técnica molecular que permite la amplificación de un ADN específico dentro del genoma de un organismo de interés. Los componentes necesarios para realizar la amplificación del ADN son: cebadores, nucleótidos (adenina, timina, guanina y citocina), enzima polimerasa y el ADN molde; al combinarse estos elementos empujando un termociclador que regula la

temperatura y el tiempo necesario para cada etapa llamada ciclo (Garibyan & Avashia, 2013; Joshi & Deshpande, 2011; S. Primrose & Twyman, 2006), se produce una masificación del ADN de interés a partir de una muestra pequeña de ADN empleado como molde o templado (Joshi & Deshpande, 2011).

La clonación TA se basa en la complementariedad entre timina, que se encuentra en los extremos 3' del vector linealizado, y adenina que se genera en el fragmento amplificado por PCR del gen de interés (Joshi & Deshpande, 2011; PREMIER Biosoft, 2017; PROMEGA, 2010). La generación de la adenina extra en el gen de interés es producida por una ADN polimerasa recombinante que la incorpora en los extremos 3' del fragmento amplificado, debido a su actividad transferasa terminal. Al ser complementarias las bases se unen y mediante una enzima ligasa se produce la unión del vector con el gen de interés (PREMIER Biosoft, 2017).

A su vez, la clonación por restricción-ligazón, utiliza enzimas de restricción para generar cortes dentro del sitio múltiple de clonación (MSC) que permitan la inserción de un fragmento de ADN deseado. Para lograr la inserción del fragmento deseado se utiliza una PCR de mutagénesis (Basu, 2015; EMBL, 2017; SnapGene, 2017) con el fin de insertar una mutación dirigida dentro de la secuencia de ADN amplificada (Basu, 2015; SnapGene, 2017). La mutación es insertada por los cebadores. La inserción de la secuencia mutada se encuentra en los extremos del gen de interés con el fin de generar una secuencia complementaria entre el vector cortado por la enzima de restricción y el fragmento de ADN de interés con la mutación en sus extremos (Basu, 2015; EMBL, 2017; SnapGene, 2017).

2.1.2.2 Células hospederas

Las células hospederas constituyen uno de los factores más importantes al momento de realizar una transformación, debido a que éstas son las que incorporan el ADN para su preservación y replicación (Camacho, Reyes, Franco, Comach, & Ferrer, 2016; Li et al., 2010; Mainero, 2015). Para que una célula pueda adquirir un ADN exógeno y transformarse es necesario que las adquieran un estado “*competente*”. En este estado las células poseen una mayor permeabilidad en la membrana celular lo cual facilita el ingreso del ADN foráneo además poseen un genotipo alterado en cuanto a la producción de enzimas de restricción endógenas. Actualmente existe una diversidad muy amplia de células competentes, sin embargo entre las más utilizadas se encuentran las células hospederas para realizar electroporación y shock térmico (Chaparro, 2014; Li et al., 2010; Mainero, 2015).

Diversos microorganismos pueden ser utilizados como células hospederas, entre los que se incluyen tanto bacterias, como levaduras. Algunos de los principales organismos utilizados son: *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc. (Chen & Dubnau, 2004; Li et al., 2010; Mainero, 2015).

Entre estos organismos *E. coli* destaca de manera particular, siendo uno de los principales organismos utilizados para este fin (Chen & Dubnau, 2004; Li et al., 2010; Mainero, 2015). Existe una gran variedad de serotipos de *E. coli* que son utilizados como hospederos con características únicas (S. Primrose & Twyman, 2006). La razón para utilizar este microorganismo como una de las principales células hospederas es la gran cantidad de información que se dispone sobre el mismo.

E. coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae y es Gram-negativa. Posee una forma de varilla, y se puede encontrar en casi cualquier tipo de ambiente, por lo que puede ser aislada de diversas partes; entre los materiales más comunes para encontrarla se encuentran las heces fecales (Croxen et al., 2013). Sin embargo, también se la puede encontrar en el medio ambiente, el tracto digestivo de muchos animales, incluyendo el ser humano, en el agua, alimentos, etc (Croxen et al., 2013; Mainero, 2015; Majowicz et al., 2014; Nguyen et al., 2016).

Por otra parte, la duplicación de ésta se produce aproximadamente cada 20 minutos (Mainero, 2015) a 37°C de preferencia (Croxen et al., 2013; Mainero, 2015). Puede adaptarse con facilidad y crecer de forma aeróbica o anaeróbica (Croxen et al., 2013). Actualmente se conoce que existen cepas de *E. coli* que pueden ser fermentadoras de lactosa o no (Croxen et al., 2013). Las cepas fermentadoras de lactosa al ser sembradas en medios específicos para enterobacterias, como el medio de cultivo MacConkey, generan una tonalidad color rojo rosado (Corona, 2011).

La cepa JM109 (PROMEGA, 2017) es ideal para la transformación usando vectores pGEM[®]-T Easy (PROMEGA, 2010), así como para la producción con alta eficiencia de ADN monocatenario a partir del vector binario M13 y vectores de tipo fagémidos. Al poder ser hospedera de diversos vectores posee la cualidad de transformarse por diversos métodos (según la necesidad del investigador). No existe restricción o recombinación del ADN de interés con el ADN cromosómico del hospedero, lo que se debe a que carece de *recA*- y no posee sistema de restricción *E. coli* K. No posee actividad β -galactosidasa al poseer el genotipo *lacZ* Δ M15. Cabe mencionar que el genotipo completo de esta cepa es: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rK-,mK+), *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lacI*^q Δ M15] (4) (PROMEGA, 2010, 2017).

2.1.2.3 Vectores de clonación

Los vectores son moléculas transportadoras las cuales son insertadas dentro de un hospedero (Klug et al., 2006; S. Primrose & Twyman, 2006). Poseen la capacidad de transferirse y replicarse dentro del hospedero y son utilizados para insertar fragmentos de ADN de interés o genes de interés (Klug et al., 2006; S. Primrose & Twyman, 2006) dentro del hospedero para la producción de medicamentos, conservación de genes y preservación de material genético de interés en bibliotecas de genómicas (Klug et al., 2006; S. Primrose & Twyman, 2006).

Los vectores poseen algunas partes esenciales que son: el origen de replicación, que permite la replicación del vector dentro del hospedero; un promotor unido al sitio de unión al ribosoma que permitirá tanto la transcripción como la traducción de la proteína de interés; un marcador de selección, que dependiendo del vector podrá ser tanto de apreciación visual como de resistencia y el sitio múltiple de clonación (MSC) donde se insertará el gen de interés (Klug et al., 2006; S. B. Primrose et al., 2006).

El sistema de clonación pGEM[®]-T Easy Vector System I (Figura 1), permite realizar la clonación de una manera sencilla. Es un vector linealizado que posee timinas en cada extremo 3', las cuales son salientes que mejoran la eficiencia de inserción del producto de PCR amplificado mediante una ADN polimerasa recombinante o que genere una adenina en cada extremo 3' del producto de PCR (PROMEGA, 2010). Es un vector con alto número de copias dentro del hospedero. Las partes que lo conforman son: los promotores T7 y SP6 ARN polimerasa, una región con el codón α -péptido que codifica para β -galactosidasa, utilizada como marcador de selección produciendo colonias color blanco/azul y un gen de resistencia para ampicilina como segundo marcador de selección de transformación, como se observa en la figura 1 (PROMEGA, 2010). La ligazón

del vector y el gen de interés se realiza rápido por medio del 2X Rapid Ligation Buffer que posee el vector y la enzima Ligasa T4 (PROMEGA, 2010). La capacidad de clonación del vector es amplia por lo que se ha reportado la inserción de genes de interés, mayores a 2kb, sin afectar la estabilidad del vector o del hospedero (PROMEGA, 2010).

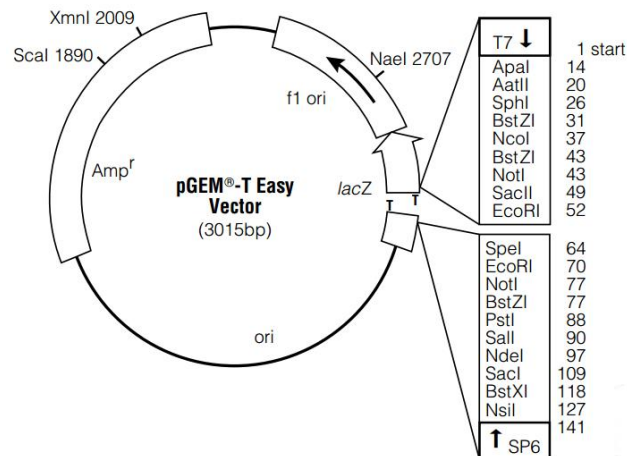


Figura 1. Diseño de pGEM®-T Easy Vector System I.

Tomado de: (PROMEGA, 2010).

2.1.2.4 Unión del ADN de interés al vector

Un vector es una molécula de ADN al cual se incorpora el material genético de interés actuando como un vehículo que la transporta, tras lo cual es capaz de ingresar al citoplasma de una célula hospedera transformándola. El vector logra replicarse debido a que posee la secuencia de inicio de la replicación, la cual es similar a la secuencia de replicación de la célula hospedera (S. Primrose & Twyman, 2006). Para este fin, utiliza los mecanismos de la célula hospedera (Mainero, 2015; S. Primrose & Twyman, 2006).

Actualmente, existe una gran variedad de vectores, que se ajustan a las necesidades del trabajo que se esté realizando. Cada vector tiene diferentes maneras de ligar la secuencia deseada (S. Primrose & Twyman, 2006).

Dependiendo de qué tipo de vector es usado, la unión del fragmento de ADN deseado será diferente. Entre la gran variedad de enzimas que ligan los vectores podemos encontrar la Topoisomerasa I. Esta es una enzima que se encuentra de manera natural en los organismos vivos, actúa al mismo tiempo como enzima de restricción y ligazón y, por tanto permite ligar fragmentos de ADN de interés en el sistema conocido como clonación de tipo TA tradicional (S. Primrose & Twyman, 2006; Reid & Lazinski, 2000; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2015; Fasching, Cejka, Kowalczykowski, & Heyer, 2015; Hsiang, Lihou, & Liu, 1989).

Por otra parte, la enzima Ligasa T4 cataliza la formación de enlaces fosfodiéster, entre los extremos contiguos de 5'- fosfato y un extremo 3'-hidroxilo de la doble cadena de ADN, con la necesidad de la hidrólisis de ATP como aporte de energía para la reacción (Lehman, 1974; S. Primrose & Twyman, 2006; Sugimoto, Okazaki, & Okazaki, 1968). La utilización de la ligasa T4 forma parte de los protocolos rutinarios de una gran variedad de sistemas de clonación, debido a su simplicidad de operación, y será el proceso a emplearse en este estudio (Lehman, 1974; S. Primrose & Twyman, 2006; PROMEGA, 2010).

2.1.2.5 Transformación

La transformación es uno de los pasos fundamentales para lograr que el vector recombinante ingrese en las células hospederas de manera correcta, al tiempo que se deben considerar varios aspectos para lograr que ésta sea exitosa (S. Primrose & Twyman, 2006). Se puede realizar una transformación mediante electroporación o choque térmico. Para cualquiera de los métodos seleccionados se debe primero contar con células hospederas que tengan una mayor permeabilidad de su membrana y sistemas de restricción disminuidos o ausentes, de tal manera que permitan el paso del plásmido a su interior y no lo degra (Mainero, 2015; S. Primrose & Twyman, 2006).

La electroporación es el método que al emplear un aumento de la conductividad eléctrica de manera externa al aplicar un campo eléctrico, permite la apertura de los poros de la membrana de forma reversible, facilitando así el incremento en su permeabilidad lo que resulta a su vez en el ingreso del ADN plasmídico dentro de la célula hospedera (Yang, 2007). Para la aplicación de esta técnica se requiere de un equipo que permita regular el voltaje de la corriente eléctrica y la duración de la misma, llamado electroporador.

Por otra parte, el choque térmico que se empleará en esta investigación permite el ingreso del ADN exógeno a una célula hospedera, gracias a un cambio de temperatura que varía, de 0°- 42°C bruscamente y por unos pocos segundos. Este choque térmico en conjunto con los iones Ca^{2+} , que se incorporan al medio, facilitan la neutralización de las cargas negativas de la membrana y la subsecuente apertura temporal de poros que permiten el ingreso del ADN exógeno (Angel, 2015; S. Primrose & Twyman, 2006).

2.1.2.6 Selección de las células transformadas

Una vez que ha ingresado el ADN exógeno plasmídico a la célula hospedera se procede a seleccionar las células que han sido transformadas (S. Primrose & Twyman, 2006). Para este fin se aplican diversas estrategias, siendo una de las más empleadas la selección por resistencia en un medio de cultivo selectivo. La función de este medio es proporcionar las condiciones necesarias para el crecimiento y desarrollo de la célula transformada, pero que adicionalmente sólo permita la supervivencia de las células que hayan incorporado el ADN plasmídico, el cual porta como ya -se explicó previamente- un gen que codifica para otorgar la respectiva resistencia (S. Primrose & Twyman, 2006). Las células que no posean resistencia al antibiótico no sobrevivirán en el medio selectivo (Blanco, Valverde, & Gómez, 2003; S. Primrose & Twyman, 2006).

Los antibióticos que se colocan en los medios selectivos dependen del gen de resistencia presente en el vector, por lo cual pueden variar de sistema en sistema, y pueden ser uno o varios, entre los más empleados tenemos: ampicilina, kanamicina y cefotaxima. A pesar de su amplio uso se han diseñado adicionalmente otras estrategias de selección, como la basada en reacciones colorimétricas que permiten la detección visual de las células transformadas. Uno de los marcadores visuales más empleados es la coloración azul/blanca producida por el gen *lac Z* (Polaina, 2004; S. Primrose & Twyman, 2006). Este gen codifica para la enzima β -galactosidasa y se puede encontrar de manera natural en una gran diversidad de organismos.

El gen *lac Z* produce la enzima β -galactosidasa, cuya actividad produce la hidrólisis del sustrato cromatogénico del medio de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal), de esta enzima. Cuando este gen se encuentra intacto se produce la reacción que se evidencia por una coloración azul de las colonias, mientras que, sí el gen ha sido interrumpido, se visualizarán colonias de color blanco debido a la ausencia de la actividad enzimática y por tanto no se produce la reacción., tal como se observa en la Figura 2 (S. Primrose & Twyman, 2006).

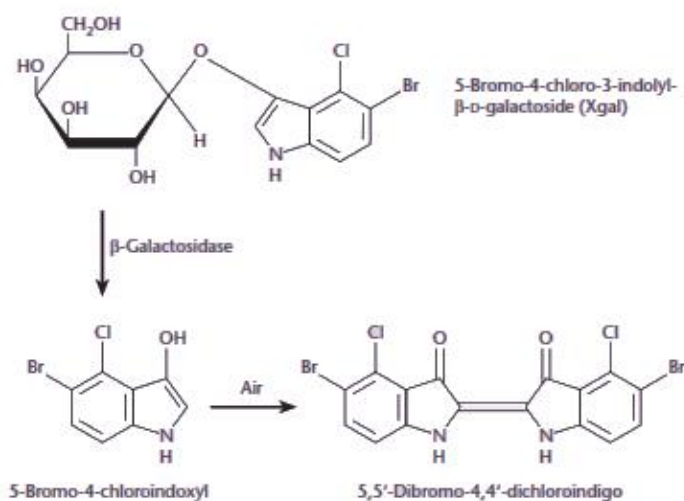


Figura 2. Reacción del Xgal en el medio de cultivo.

Tomado de: (S. Primrose & Twyman, 2006).

Para lograr esta hidrólisis las células utilizadas como hospederas bajo este sistema no suelen presentar este gen, o lo presentan alterado con el fin de efectuar una complementación al momento de la transformación. Habitualmente, se encuentra el sitio múltiple de clonaje interrumpiendo el gen lac Z en los vectores de clonación que emplean este marcador de selección (Polaina, 2004; S. Primrose & Twyman, 2006), lo que permite seleccionar las colonias blancas, que poseerán el vector recombinante en su interior, permitiendo discriminarlas de aquellas células que sólo han incorporado el vector vacío (Primrose & Twyman, 2006).

2.1.2.7 Análisis de los clones transformados

Las células que han sido transformadas deben ser analizadas para comprobar si el ADN de interés se ha incorporado en la dirección correcta, o si existe alguna mutación o problema en el mismo. La comprobación se puede realizar por diferentes métodos, en dependencia de los recursos con los que cuente el laboratorio (S. Primrose & Twyman, 2006).

En primer lugar se puede realizar un análisis de restricción con el cual es posible verificar la orientación así como la secuencia a grosso modo del fragmento de ADN insertado dentro del vector. Existen una variedad muy amplia de enzimas de restricción disponibles actualmente en el mercado. Cada enzima posee un sitio de reconocimiento y de corte único (Tabla 1) (S. Primrose & Twyman, 2006).

Tabla 1.

Enzimas de restricción comúnmente empleadas y sus respectivos sitios de reconocimiento.

Nombre de la enzima	Sitio de reconocimiento
<i>Mbol</i>	/GATC
<i>DpnI</i>	
<i>Sau3AI</i>	
<i>MspI</i>	C/CGG
<i>HpaII</i>	
<i>AluI</i>	AG/CT
<i>HaeIII</i>	GG/CC
<i>TaqI</i>	ACGT/
<i>BglII</i>	A/GATCT
<i>ClaI</i>	AT/CGAT
<i>PvuII</i>	CAG/CTG
<i>PvuI</i>	CGAT/CG
<i>KpnI</i>	GGTAC/C
<i>NotI</i>	GC/GGCCGC
<i>SbfI</i>	CCTGCA/GG

Adatado de: S. Primrose & Twyman, (2006).

Otro método que permite la verificación de las secuencias de ADN insertada dentro del vector es la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), con cebadores específicos que permiten la amplificación del fragmento de interés. Al utilizar cebadores específicos, los cuales sólo se unen a la secuencia blanco correspondiente, se logra la amplificación de la secuencia deseada. Luego de la amplificación por PCR los productos obtenidos deben ser visualizados, para lo cual se utilizan geles de agarosa donde se verifica el tamaño del amplicón (S. Primrose & Twyman, 2006).

Finalmente, cabe recalcar que actualmente la secuenciación es el mejor método para comprobar la secuencia insertada dentro del vector. Esta técnica abarca un conjunto de métodos de carácter bioquímico y de biología molecular, y tiene como finalidad conocer el orden de los nucleótidos presentes en una secuencia de ADN (Gilbert, 1981; Luckey et al., 1990). Esta determinación permite comparar las secuencias de manera visual y comprender dónde pueden existir cambios en la secuencia (Gilbert, 1981; Lander et al., 2001; Luckey et al., 1990).

2.1.2.8 Preservación de los clones de interés

La conservación de los clones transformados de interés es fundamental, debido a la necesidad de preservar las células transformadas para futuros ensayos, o como es el caso de este estudio con el fin de poseer un banco inagotable de controles positivos internos para las pruebas de diagnóstico (Arrebola & Fernández, 2008).

Una colección que tenga como fin la conservación de microorganismos debe cumplir con un buen proceso conservación de la cepa; el cultivo debe ser puro y evitar una contaminación cruzada durante el proceso de elaboración de la colección; el índice de supervivencia a debe encontrarse entre el 70% y el 80% (puede ser considerado una colección fiable); y, la estabilidad genética debe estar conservada durante la preservación de la colección (Arrebola & Fernández, 2008).

Se pueden dar dos clasificaciones generales a los métodos de conservación, la primera es la conservación a corto plazo y la segunda es la conservación a largo plazo. La conservación a corto plazo se emplea generalmente cuando no se cuentan con los equipos necesarios para realizar la conservación a largo plazo,

o la cepa que se desea conservar no resiste la conservación a largo plazo; lo que generalmente se da en cepas que contengan construcciones genéticas inestables que se puedan perder con el tiempo (Arrebola & Fernández, 2008).

Entre los métodos de conservación a corto plazo podemos encontrar:

- Conservación por transferencia periódica o mediada por subcultivos de la cepa desea.
- Conservación de la cepa en una suspensión de agua destilada o agua de mar esterilizada.

La conservación de cepas a largo plazo garantiza que la estabilidad genética de la cepa sea alta y no presente mutaciones durante el tiempo de preservación de la misma (Arrebola & Fernández, 2008).

Liofilizar es uno de los métodos para conservar microorganismos a largo plazo, a través de este método se elimina toda el agua de una muestra para su conservación. Para eliminar el agua primero se debe congelar la muestra y luego mediante una bomba al vacío eliminarla como consecuencia de este procedimiento toda actividad en el microorganismo se detiene (Arrebola & Fernández, 2008). Adicionalmente, se debe colocar un preservante para que el microorganismo no sufra daño por la congelación y las altas temperaturas (Arrebola & Fernández, 2008; Biocison, 2017).

La congelación de microorganismos es uno de los métodos utilizados más comunes y requiere tomar en cuenta diversos factores para su obtención (Arrebola & Fernández, 2008; Biocison, 2017). El criopreservante es fundamental, el glicerol es un criopreservante excelente (Arrebola & Fernández,

2008; Biocison, 2017) y uno de los más comunes. Otro factor a tomar en cuenta es el estadio del microorganismo, por lo que es recomendable preservarlo cuando se encuentra iniciando la fase estacionaria (Arrebola & Fernández, 2008), debido a que proporciona mayor estabilidad al microorganismo en comparación a las otras fases. El almacenamiento se debe realizar en temperaturas inferiores a los 0°C (Arrebola & Fernández, 2008; Biocison, 2017), lo ideal sería la preservación en nitrógeno líquido o en ultra congeladores (Arrebola & Fernández, 2008; Biocison, 2017).

2.2 Enfermedades relevantes para el sector agropecuario del Ecuador

2.2.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical

2.2.1.1 Generalidades

El sector agropecuario se encuentra conformado por dos subsectores, el agrícola y el ganadero. Dentro de cada uno existen algunas enfermedades que poseen relevancia desde el punto de vista económico para el Ecuador.

Dentro del sector agrícola una de las enfermedades más devastadoras que puede presentarse es el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* o conocido también como “Mal de Panamá”. Este hongo aniquiló la industria del banano a mediados del siglo XX en las regiones de Centroamérica y El Caribe, donde se produce aproximadamente el 28% de la producción mundial del banano (Agrocalidad & FAO, 2013; M. Dita, Martínez, & Vicente, 2014; García et al., 2014; O’Neill et al., 2016). En 1960 el continente asiático fue atacado por este hongo, lo cual produjo un descenso considerable en la producción de banano en el continente y simultáneamente determinó el aumento del precio de producción del mismo. En 1990 atacó los cultivos en Indonesia y Malasia donde se perdieron miles de hectáreas de banano, afectando la producción de estos

países y causando pérdidas económicas valoradas en millones de dólares (Agrocalidad & FAO, 2013; M. Dita et al., 2014).

2.2.1.2 Taxonomía

Existen más de 100 formas especiales de *Fusarium oxysporum* y dentro de éstas se encuentra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (Agrocalidad & FAO, 2013; ProMusa, 2016; M. Dita et al., 2014; O'Neill et al., 2016; García et al., 2014). La taxonomía de este hongo es:

- Dominio: Eucariontes
- Reino: Fungi
- Filo: Ascomycota
- Subfilo: Pezizomycotina
- Clase: Sordariomycetes
- Orden: Hypocreales
- Familia: Nectriaceae
- Género: *Fusarium*
- Especie: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*

Para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* existen diferentes razas, actualmente se han reportado 4 pero se cree que pueden existir más aún no identificadas (Agrocalidad & FAO, 2013; M. Dita et al., 2014; García et al., 2014; O'Neill et al., 2016; ProMusa, 2016). Es posible diferenciar a cada una conociendo los diferentes tipos de cultivos que infectan (Tabla 2) (Agrocalidad & FAO, 2013; M. Dita et al., 2014; ProMusa, 2016).

Tabla 2.

Diferentes variedades vegetales que afectan cada una de las razas de Fusarium oxysporum f. sp. cubense.

<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>				
	Raza 1	Raza 2	Raza 3	Raza 4
V			-Gros Michel (AAA)	-Gros Michel (AAA)
a	-Gros Michel (AAA)		-Manzano (AAB)	-Manzano (AAB)
r			-Pome (AAB)	-Pome (AAB)
i	-Manzano (AAB)		-Latundan	-Latundan
e		-Bluggoe (ABB)	-Pisang awak (ABB)	-Pisang awak (ABB)
d	-Pome (AAB)		-Cavendish (AAA)	-Cavendish (AAA)
a	-Latundan		(algunas variedades)	(algunas variedades)
d	-Pisang awak (ABB)			-Bluggoe (ABB)
e			-Heliconia	-Heliconia
s			-Musa balbisiana	-Musa balbisiana

Adaptado de: (M. A. Dita, Waalwijk, Buddenhagen, Souza Jr, & Kema, 2010; M. Dita et al., 2014; García et al., 2014)

Actualmente no existe ninguna variedad de banano con resistencia al *Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 tropica*, por lo que se considera una de las peores plagas dentro de la industria bananera de cualquier país (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014; García et al., 2014; O'Neill et al., 2016; ProMusa, 2016).

2.2.1.3 Distribución

El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* actualmente se encuentra distribuido por diversos lugares del planeta, esto se debe a la facilidad de transmisión que éste posee y que puede realizarse a través de diversos medios como son: el agua de riego utilizada, la tierra de los sembradíos, plantas transportadas y frutos. Adicionalmente, se considera que el viento contribuye grandemente a la dispersión (Agrocalidad & FAO, 2013; M. Dita et al., 2014; García et al., 2014; O'Neill et al., 2016; ProMusa, 2016). Actualmente, se ha reportado la presencia de este hongo en diversas partes del planeta presentando ligeras mutaciones, pero el centro del origen del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* es el continente asiático (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014; ProMusa, 2016).

Existen diversas entidades de control alrededor del mundo encargadas de registrar la presencia del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* y conocer cómo éste se ha propagado, como son: el Centro de Bociencia Agrícola Internacional (CABI), la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (EPPO) y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (Figuras 3 y 4).

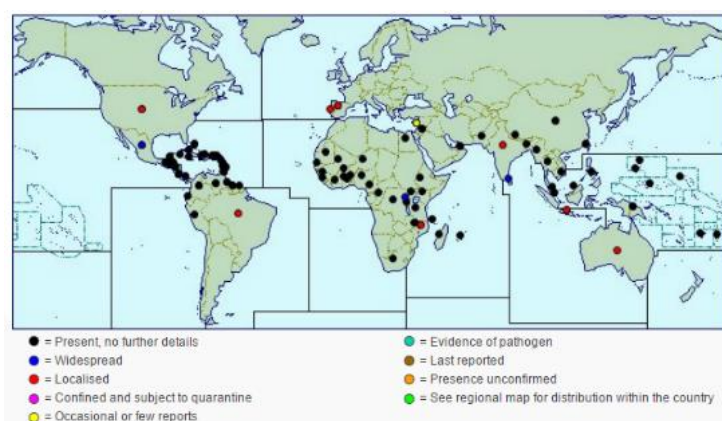


Figura 3. Distribución del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* según datos del CABI hasta 2016

Tomado de: (CABI, 2016).

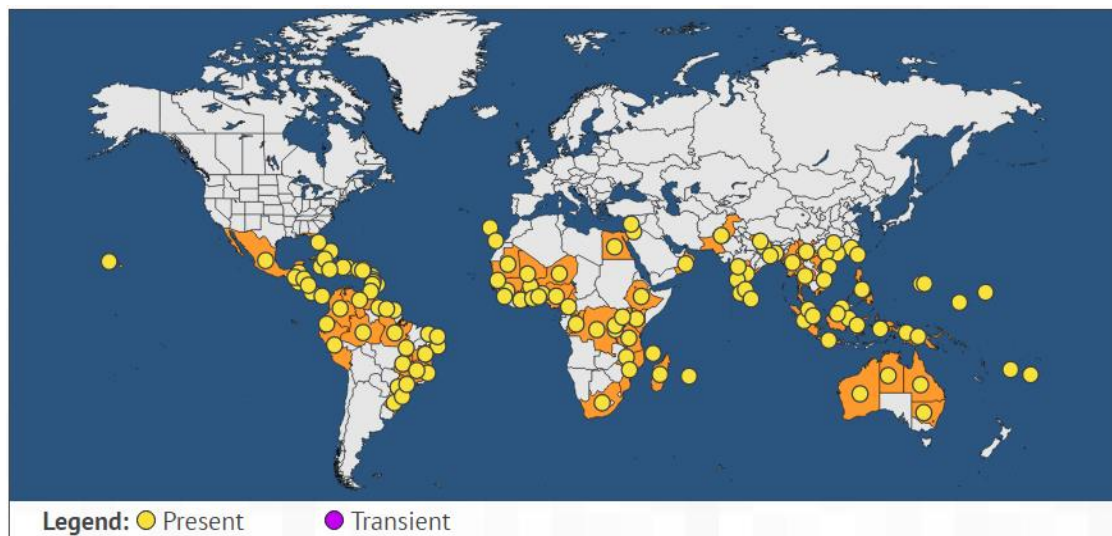


Figura 4. Distribución del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* según datos de EPPO hasta el 18 de abril de 2017

Tomado de: (EPPO, 2017).

En Ecuador se ha encontrado presencia de *Fusariumm oxysporum* f. sp. *cubens* raza 1 y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubens* raza 2, pero no se ha encontrado o reportado la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubens* raza 4 tropical (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014; EPPO, 2017; ProMusa, 2016).

2.2.1.4 Sintomatología y detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

2.2.1.4.1 Ciclo de vida del hongo

Este hongo afecta el sistema de las plantas de banano. A medida que crece el hongo la planta va decayendo hasta llegar a una fase de muerte. El desarrollo del hongo se produce en los tejidos que rodean el xilema (CABI, 2016; M. Dita et al., 2014). Las esporas son liberadas al momento de la muerte de la planta, infectando de esta manera a las plantas circundantes (CABI, 2016; M. Dita et al., 2014).

El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, no presenta una fase sexual sólo una fase asexual donde se producen tres tipos de esporas:

- Clamidosporas: poseen una pared gruesa para sobrevivir, son producidas por las plantas de banano en un estadio de muerte. Una de las características más notables que poseen éstas es su tiempo de latencia, así se han encontrado esporas con más de 30 años aún viables. Su estadio germinativo se inicia en respuesta a los exudados generados por la raíz y al desarrollarse éstas penetran al interior de la misma (M. Dita et al., 2014; ProMusa, 2016).
- Microconidias: son esporas con forma de riñón ovalado con una o dos celdas unidas entre sí. Son producidas en gran cantidad cuando la planta se encuentra infectada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (ProMusa, 2016).
- Macroconidios: estas esporas se encuentran conformadas entre 4 a 8 celdas unidas entre sí por una pared delgada y muy fina, poseen una forma de oz. Generalmente se encuentran en la superficie de las plantas infectadas que se encuentran en estadio de muerte (O'Neill et al., 2016; ProMusa, 2016).

El ciclo de las esporas inicia al momento de tener contacto las mismas con la planta de banano, la formación del micelio tarda entre 6 a 8 horas en el caso de microconidios y macroconidios; en cuanto a clamidiosporas tarda aproximadamente entre 2 a 3 días (CABI, 2016; M. Dita et al., 2014; ProMusa, 2016). Posterior al desarrollo de cualquier espora, éstas infectan las raíces secundarias o terciarias para continuar infectando el resto de la planta (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014; ProMusa, 2016). Cabe destacar que dependiendo la raza de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* que infecta la planta ésta puede generar una respuesta inmune específica, no obstante, actualmente ninguna planta de banano posee resistencia para

Fusarium oxysporum f. sp. *ubense* raza 4 tropical (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014; García et al., 2014; ProMusa, 2016).

Una vez que cualquiera de estas esporas infecta una planta de banano y posee condiciones óptimas para el desarrollo del hongo, la infección inicia. Estas condiciones son: una temperatura de 25 a 28°C, pH en un rango de 7.5 a 8.5 y presencia de oscuridad continua (Agrocalidad & FAO, 2013; M. Dita et al., 2014; ProMusa, 2016).

Entre las diferentes razas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, la más problemática y peligrosa es la raza 4 tropical debido a que no existe ninguna variedad de banano resistente a ésta. Al momento se continúa investigando una forma efectiva de eliminar las esporas de esta raza. Diversos estudios han demostrado que es posible deshacerse al menos de dos tipos de esporas, las microconidias y macroconidios, utilizando agua a 65°C por 20 minutos como mínimo (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014; ProMusa, 2016). Sin embargo, el agua caliente no puede eliminar las clamidosporas, las cuales sólo pueden eliminarse en un autoclave a 121°C por 15 minutos (CABI, 2016; M. Dita et al., 2014; García et al., 2014; O'Neill et al., 2016; ProMusa, 2016).

2.2.1.4.2 Sintomatología y detección en plantas de banano

Los síntomas externos de la planta de banano infectada se pueden presentar de dos maneras, la primera es mediante el “Síndrome de las hojas amarillas”, el cual suele presentarse mayoritariamente en las plantas infectadas. Inicia en la base del pecíolo de las hojas viejas (en muchas ocasiones este síntoma se confunde con deficiencia de potasio en la planta) (Agrocalidad & FAO, 2013; M. Dita et al., 2014; ProMusa, 2016). La decoloración continúa hacia la nervadura central de la hoja; luego de producirse en las hojas viejas pasa a las jóvenes donde inicia el proceso de igual manera que en las hojas viejas (Agrocalidad &

FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014); la decoloración continúa hasta que la hoja adquiere una coloración café y se pudre por completo (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014; García et al., 2014; Hafizi, Salleh, & Latiffah, 2014; ProMusa, 2016). En algunos casos las hojas infectadas pierden su rigidez y quedan colgadas del pseudotallo de la planta (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014).

La segunda forma de manifestación de la enfermedad es el “Síndrome de la hoja verde” en contraste con el anterior, en éste las hojas no presentan una decoloración amarillenta en su totalidad sino que mantienen un color verde pálido iniciando de igual manera por el peciolo (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014). La enfermedad comienza por las hojas viejas y se propaga a las hojas jóvenes; como en el síntoma de hojas amarillas, las hojas infectadas pierden su rigidez en el peciolo, sin embargo, muchas veces las hojas jóvenes infectadas pueden permanecer en su posición por un tiempo, al final termina cayendo la hoja a causa de la enfermedad (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014; ProMusa, 2016) (Figura 5).



Figura 5. Diferencias entre “Síndrome de las hojas amarillas” y “Síndrome de las hojas verdes”

Tomado: (Dita et al., 2014)

Síntomas externos de marchitez por *Fusarium*.

- A. Planta que muestra amarillamiento general y necrosis de las hojas ("síndrome de la hoja amarilla") etapa avanzada de la enfermedad.
- B. Fisuración del pseudotallo.
- C. Planta afectada por marchitez de *Fusarium* con hojas verdes ("síndrome de hoja verde").
- D. Detalle de la caída de la hoja por colapso potil.

Para la detección de esta enfermedad en el tallo de la planta de banano se realiza un corte de manera vertical del pseudotallo donde se pueden observar líneas con una coloración marrón o café oscuro, amarillo o rojizas. En contraste, al realizar un corte en sentido transversal se pueden apreciar manchas de diversos colores en los anillos, las manchas pueden ser púrpuras o moradas y pueden tomar una coloración marrón, denominándose "bolsillos gomosos" (Agrocalidad & FAO, 2013; M. Dita et al., 2014) (Figura 6).

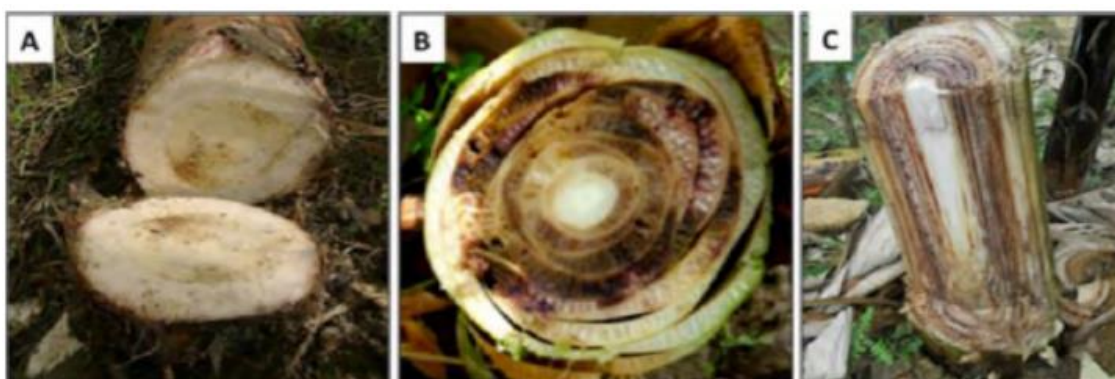


Figura 6. Cortes verticales y transversales en pseudotallo de planta de banano infectada con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Tomado: (Dita et al., 2014).

Síntomas internos de marchitez por *Fusarium* en banano.

- A. Sección transversal del rizoma que muestra necrosis tisular.
- B. Corte transversal de pseudotallo mostrando una necrosis avanzada del tejido vascular.
- C. Corte longitudinal de pseudotallo con necrosis de los cordones vasculares.

Los frutos de las plantas afectadas con este hongo presentan una reducción en su tamaño y la planta experimenta una disminución en su producción (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. Dita et al., 2014; ProMusa, 2016).

2.2.1.4.3 Detección mediante análisis microbiológico

El aislamiento del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* es muy complejo y puede demandar algunos meses de trabajo lograrlo. Esto se debe a que este hongo no posee una forma definida por lo cual se clasifica como un hongo anamórfico y carece de reproducción sexual, por tal motivo es telomorfo (CABI, 2016; M. Dita et al., 2014). Su forma de reproducción es por medio de esporas, como ya se ha mencionado. Mediante técnicas de microscopía se identifican cada una de las esporas:

- Los macroconidios, las cuales se encuentran en mayor número que el resto de esporas y su desarrollo se genera en las hifas; el tamaño del polen es de 27-55 x 3.3-5.5 μm , tienen forma falciforme con paredes donde se puede diferenciar entre 3 a 5 septos, encontrado usualmente sólo 3 septos (CABI, 2016; M. Dita et al., 2014).
- Las microconidias, generalmente carecen de septos, su forma es ovalada en forma de riñones con cabezas monoafiladas cortas y falsas, su tamaño va desde 5-16 x 2.4-3.5 μm (CABI, 2016; M. Dita et al., 2014).
- Las clamidósporas son producidas en las hifas o los conidios, las cuales pueden generarse una a la vez o varias unidas en forma de cadena (generalmente en parejas), su tamaño es de 7-11 μm ; al momento de aislar las esporas estas pueden tener un desarrollo más lento comparado con el resto de esporas (CABI, 2016; M. Dita et al., 2014) (Figura 7).

El medio por excelencia para el aislamiento es el Papa Dextrosa Agar (PDA), sin embargo las colonias pueden tener una morfología variable, con lo cual se dificulta su identificación (M. Dita et al., 2014). La forma del micelio puede presentarse en forma de un micelio peludo algodonoso, de manera abundante o

muy poco, y con una gama de colores que va desde el blanco hasta el violeta pálido pasando por el color salmón (M. Dita et al., 2014). En algunos casos los aislamientos en PDA pueden producir una esclerosis en gamas de color negro a violeta (M. Dita et al., 2014).

Se ha descubierto que algunos aislados en PDA algunas veces pueden producir pigmentos de colores violeta pálido o rojo oscuro. En algunos casos se puede detectar *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical por la presencia de colonias radiales laciniadas, las cuales no se presentan en la raza 1 y 2, sin embargo, no es una característica presente en todas las variedades de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical (M. Dita et al., 2014) (Figura 7).

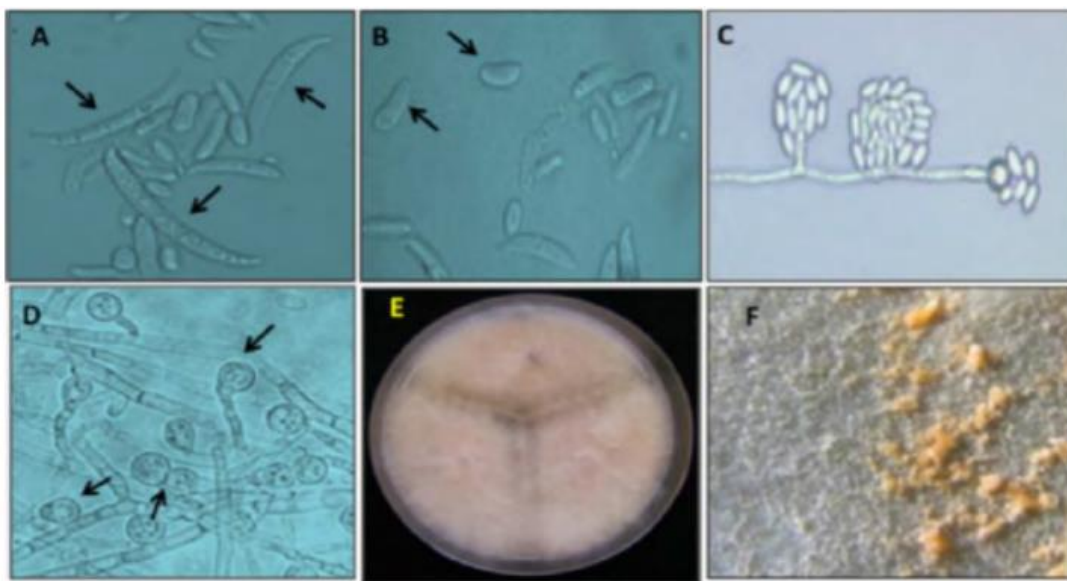


Figura 7. Medidas morfométricas de las esporas y aislamiento de PDA del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*

Tomado: (Dita et al., 2014)

Estructura reproductiva de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cupense*.

A. Macroconidia (27 - 55 x 3.3 - 5.5 μ m, 4 - 8 células ligeramente falciformes y células basales en forma de pie).

B. Microconidia (5 - 16 x 2,4 - 3,5 μm , 1 o 2 células con forma de riñón ovalado). C. Phialides y microconidios agrupados en cabezas falsas.

D. Clamidósporas (7 - 11 μm diámetro, normalmente globosa en cadenas).

E. *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense* tropical 4 en medio PDA. F. Esporodocia de color naranja desarrollada en un medio de cultivo PDA.

2.2.1.4.4 Detección mediante Biología Molecular

Al ser *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* el causante de una enfermedad que puede ocasionar grandes pérdidas en las plantaciones de banano es necesaria la identificación de este hongo de manera rápida y oportuna (Agrocalidad & FAO, 2013; CABI, 2016; M. A. Dita et al., 2010; M. Dita et al., 2014; O'Neill et al., 2016). Con este fin se utilizan técnicas de biología molecular para su detección, la técnica que más utiliza para este fin es la PCR, al ser un método fiable, sensible, reproducible y rápido (M. A. Dita et al., 2010; M. Dita et al., 2014; O'Neill et al., 2016; S. Primrose & Twyman, 2006).

El análisis mediante PCR presenta diversas ventajas, no es necesario el aislamiento del hongo y se puede trabajar directamente con la muestra de campo (CABI, 2016; M. A. Dita et al., 2010; M. Dita et al., 2014; O'Neill et al., 2016), reduciendo el tiempo de respuesta en caso de presentarse esta enfermedad. Por otra parte, al ser una técnica reproducible es posible extender el diagnóstico a otros lugares para evitar una contaminación al momento de realizar importaciones o exportaciones de banano.

Otra de las ventajas que presenta la PCR sobre cualquier otro método de identificación es poder distinguir entre las diferentes razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* existente. Cabe destacar que al poder identificar la raza 4 tropical se puede prevenir la dispersión del hongo y evitar pérdidas

económicas importantes en las plantaciones de banano (Agrocalidad & FAO, 2013; M. A. Dita et al., 2010; M. Dita et al., 2014; O'Neill et al., 2016).

2.2.2 Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (VPRRS)

2.2.2.1 Generalidades

El segundo sub sector que conforma al agropecuario es el ganadero, la crianza de animales es una de las actividades económicas más antiguas del mundo gracias a la cual se pueden obtener diversos productos entre los cuales se destacan además de la carne, la leche, huevos, lana, cuero, etc (Cañete, 2013; Giraldo & FAO, 2014). Se estima que el sector ganadero crecerá en un 70% para el 2050, con el fin de proveer alimento para la mayoría de personas en el mundo (FAO, 2017a).

En Ecuador uno de los sectores que ha crecido es el sector porcino. En el 2007 una persona al año consumía alrededor de 7.3 kg, sin embargo, para el año 2011 el consumo de carne porcina se elevó a 9.5 kg al año por persona (ASPE, 2017). En la industria porcina es posible encontrar diversas enfermedades que pueden afectar la economía del sector, una de las más frecuentes es el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), el cual fue reportado en los años 80 en Estados Unidos de Norte América (Albina, 1997; Arias, Barceló, Muñoz, & Sánchez, 2013; Isique & Fernando, 2011; Nelson et al., 1993; OIE, 2014; Zimmerman, Benfield, Hennings, Dee, & Stevenson, 2015).

2.2.2.2 Taxonomía

El Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (VPRRS) es un virus de ARN, su clasificación es:

- Orden: Nidovirales

- Familia: Arteriviridae
- Género: Arterivirus

Actualmente, existen dos tipos de serotipos del virus de PRRS. El primero proviene de la región de Europeo y Asiático (Albina, 1997; Aranda, 2010a; Arias et al., 2013; FAO et al., 2011; Nelson et al., 1993; PRRS Control, 2015; Sebastián, 2009; Zimmerman et al., 2015). El segundo serotipo de Estados Unidos y Canadá (Albina, 1997; Aranda, 2010a; Arias et al., 2013; FAO et al., 2011; Nelson et al., 1993; PRRS Control, 2015; Sebastián, 2009; Zimmerman et al., 2015). El serotipo 1 es de Europa y el serotipo 2 es Estados Unidos y Canadá (Quezada et al., 2004; Sebastián, 2009; Tian et al., 2007)

2.2.2.3 Estructura del virus

2.2.2.3.1 Morfología

Mediante microscopía electrónica se ha podido observar la forma que posee el virus de PRRS, posee una forma redonda con un tamaño aproximado de 45 a 80nm, y un promedio de 60 a 63nm (Aranda, 2010b; Arias et al., 2013; PRRS Control, 2015). Además, posee una nucleocápside isométrica con un tamaño de 25 a 35nm (Figura 8) (Aranda, 2010b; Arias et al., 2013; PRRS Control, 2015). La cápside rodea al virus para su protección, y es una capa lipídica con proyecciones de superficie de 5nm (Aranda, 2010b).

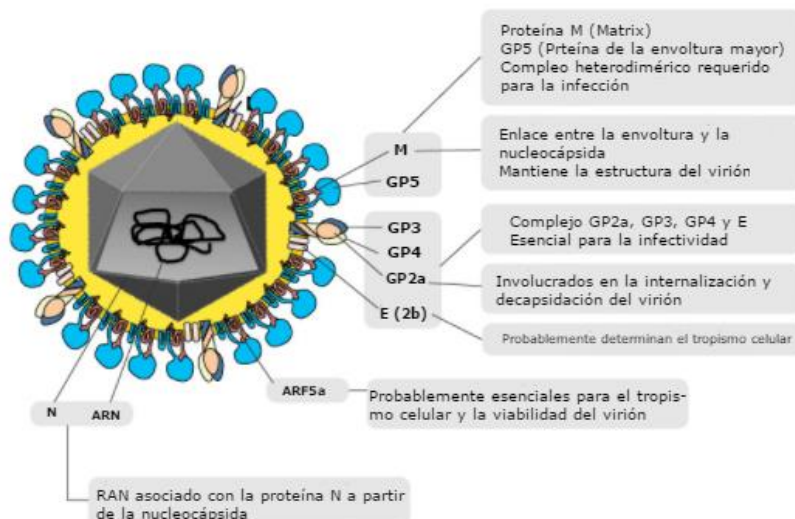


Figura 8. Morfología del virus de PRRS.

Tomado de: (PRRS Control, 2015).

La estabilidad del virus se ve comprometida con los cambios de temperatura, no obstante, conserva su estabilidad a temperaturas de entre -80 a 4°C (Aranda, 2010b; Arias et al., 2013; PRRS Control, 2015). El virus posee estabilidad en pH de 6.5 a 7.5 (Aranda, 2010b; Arias et al., 2013; PRRS Control, 2015).

2.2.2.4 Distribución

Se conoce que los primeros reportes del virus fueron en Estados Unidos en el año 1987 y luego se extendió hacia Canadá en el año de 1990 (ANELLI & FAO, 2010; Aranda, 2010a; Nelson et al., 1993; E. Ramírez et al., 2006; Sebastián, 2009; Universo Porcino, 2005; Zimmerman et al., 2015). En el mismo año se extendió hacia Europa y finalmente llegó a Asia (PRRS Control, 2015).

Actualmente, uno de los países con mayor prevalencia de la enfermedad es Vietnam donde para el año 2007 se registraron aproximadamente 44000 casos reportados; un segundo brote se registró en los meses de Junio y Julio y un último caso en agosto del mismo año, con una mortalidad de 24% de los cerdos

infectados; durante la epidemia murieron aproximadamente 9000 cerdos (ANELLI & FAO, 2010; FAO et al., 2011; OIE, 2008).

En China se han reportado casos del virus desde 1990. En el año 2007 murieron 4000000 cerdos en 26 provincias de este país (ANELLI & FAO, 2010; FAO et al., 2011; OIE, 2008).

Existen diversas entidades encargadas de registrar cómo avanza la enfermedad, como la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y FAO, entre otras. De acuerdo a publicaciones de la FAO respecto de los lugares donde se encuentra la enfermedad, es posible conocer cuándo y dónde inició ésta hasta la actualidad (Tabla 3).

Tabla 3.

Países donde se han presentado el virus de PRRS.

Situación de la enfermedad	Países que reportan la enfermedad
Presencia de infección (Sin enfermedad clínica)	Republica Checa, Lituania, México y Eslovaquia
Presencia de infección (Con enfermedad clínica)	Canadá, Colombia, Costa Rica, Francia, Alemania, Irlanda, Japón, República de Corea, Países Bajos, Filipinas, Portugal, España, Reino Unido, EEUU
Enfermedad restringida a ciertas zona(s)/región(s) de un país	Bolivia, Chile, Rumania y Republica Dominicana

Tomado de: (FAO et al., 2011)

2.2.2.5 Sintomatología y detección del virus de PRRS

2.2.2.5.1 Formas de transmisión del virus

Existen diversas vías de transmisión del virus por lo cual es muy importante la detección del mismo con el fin de prevenir que la enfermedad se propague. Existen dos formas de transmisión que se producen entre granjas y dentro de la granja. Dentro de la granja todos los individuos pueden contagiarse de la enfermedad a través del contagio vertical, que se produce de madre a hijos; cuando la madre es portadora de la enfermedad contagia al hijo cuando se encuentra en contacto con la placenta (FAO et al., 2011; Isique & Fernando, 2011; OIE, 2008; PRRS Control, 2015). Otra manera de contagio de la enfermedad se produce de forma horizontal y ocurre por contacto con secreciones, fluidos, heces y orina de los cerdos infectados (Arias et al., 2013; Isique & Fernando, 2011; PRRS Control, 2015). Recientemente se ha reportado que el semen es una fuente de contagio del virus dentro de la granja (Arias et al., 2013). Las heridas permiten la transmisión del virus entre animales de una manera rápida y simple (Arias et al., 2013; Isique & Fernando, 2011).

La transmisión entre granjas se puede dar por animales portadores que lleven el virus de un lugar a otro. Los ácaros son transmisores de la enfermedad y pueden llevarla de un lugar otro sin problema, al ser microscópicos es muy difícil su detección (Arias et al., 2013; Isique & Fernando, 2011). Al infectarse un cerdo éste se convierte en un foco de infección para toda la granja siendo muy difícil erradicar la enfermedad dentro del primer año de contagio (Arias et al., 2013; Isique & Fernando, 2011; PRRS Control, 2015).

2.2.2.5.2 Sintomatología en cerdos

Los síntomas principales asociados a PRRS son respiratorios y reproductivos en cerdos jóvenes y adultos (Aranda, 2010b; Isique & Fernando, 2011; PRRS

Control, 2015). Los signos en los lechones infectados incluyen el crecimiento de una capa sobre el pelo en forma de cáscaras y de textura áspera; el crecimiento es más bajo en comparación a cerdos no infectados, presentando también temblores musculares, rigidez o parálisis de la parte posterior del cuerpo (Aranda, 2010b).

En hembras infectas éstas pueden presentar signos leves o severos al virus de PRRS, como son la anorexia acompañada de fiebre y somnolencia. En algunos casos pueden presentar un cambio de coloración en las orejas, la vulva y la cola. En hembras en periodos de gestación se presentan abortos y nacimientos de lechones débiles (Aranda, 2010b; Arias et al., 2013; PRRS Control, 2015).

En caso de los machos o también conocidos como verracos, los síntomas del virus son presencia de anorexia con fiebre y somnolencia al igual que las hembras. Una reducción del libido sexual, disminución en la producción de semen y baja calidad del mismo presentando baja cantidad de espermatozoides y aumento en las mutaciones de los espermatozoides (Aranda, 2010b; Arias et al., 2013; PRRS Control, 2015).

2.2.2.5.3 Detección mediante ELISA

La técnica de ELISA o Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas es una manera de detección indirecta para detectar la presencia del virus de PRRS, actualmente en el mercado existen una variedad de ELISAS disponibles para la detección de este virus, pero cabe la posibilidad de encontrar un falso positivo al momento de realizar el análisis por lo cual siempre se debe verificar el resultado del ensayo (Aranda, 2010b; Arias et al., 2013; Isique & Fernando, 2011; PRRS Control, 2015).

2.2.2.5.4 Detección mediante PCR

El análisis mediante PCR es uno de los métodos más utilizados actualmente, al ser reproducible, rápido y sencillo permite una eficiencia de trabajo alta. El material de partida para esta PCR es el ARN extraído; con lo cual primero se realiza una retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc) y se realiza la PCR. Otra metodología es utilizar la Reacción en cadena de la Polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en un solo paso realizar la retrotranscripción del ARN a ADNc y la amplificación del mismo (Aranda, 2010b; PRRS Control, 2015; V. Ramírez et al., 2013).

3. Diseño del plan experimental

El diseño experimental describe la metodología empleada durante la etapa experimental del presente trabajo (Figura 9). La fase experimental inicia con la obtención de células quimiocompetentes, seguido del diseño *in silico* y finalizando con la obtención de controles positivos, secuenciación y conservación de los mismos

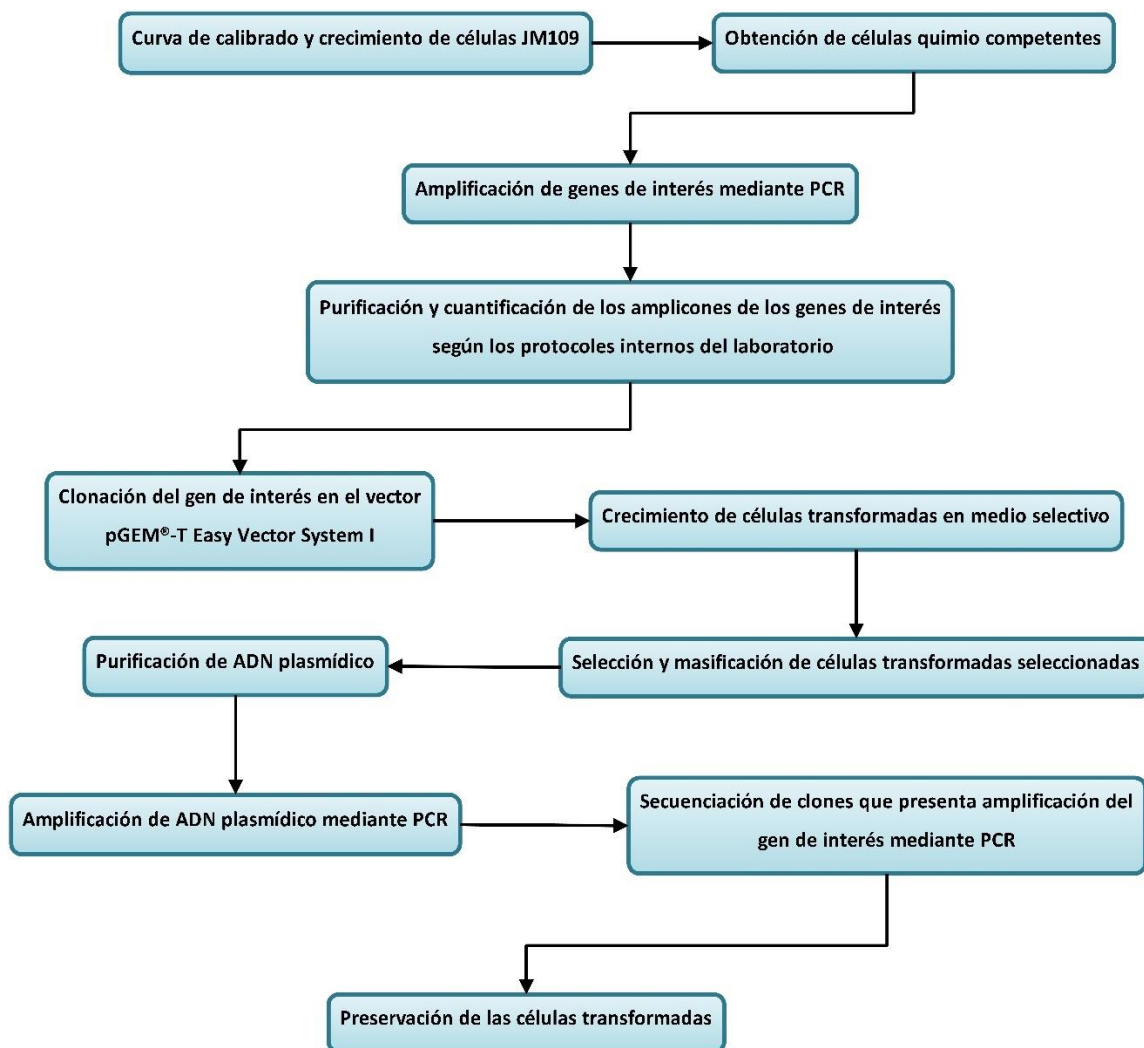


Figura 9. Metodología a emplearse para el desarrollo del trabajo de titulación.

4. Procedimientos

4.1 Población y muestra

Los materiales de partida para la realización del presente trabajo fueron: el vector pGEM®-T Easy, la cepa de *Escherichia coli* JM109, así como el material genético de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical y del virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS). Los cuales fueron entregados por

la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agro-AGROCALDAD).

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la M. SC. Ana Garrido y el Ing. Wladimir Enríquez, los permisos para trabajar con las secuencias actualmente se encuentran en trámite.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Obtención de células quimiocompetentes

4.2.1.1 Elaboración de la curva de calibrado de células JM109

Se realizaron 16 diluciones en un volumen de 15 μ L de las células JM109 en caldo Luria Bertani (LB) (SIGMA-ALDRICH, USA) (Tabla 4). Posteriormente, se realizó una microcentrifugación de 6 segundos a 1000 rpm en el equipo MiniSpin plus (Eppendorf, Ibérica). Se cuantificaron 3 μ L de cada una de las diluciones con una absorbancia de 600nm (OD_{600}) (Arnáiz, Isac, & Lebrato Martínez, 2000, 2000; Green & Sambrook, 2012) en NanoDrop 2000 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA)

Tabla 4.

Diluciones seriadas para elaboración de curva de calibrado.

N°	Células JM109 (μL)	Caldo LB (μL)	Volumen Total (μL)
1	0	15	15
2	1	14	15
3	2	13	15
4	3	12	15
5	4	11	15
6	5	10	15
7	6	9	15
8	7	8	15
9	8	7	15
10	9	6	15
11	10	5	15
12	11	4	15
13	12	3	15
14	13	2	15
15	14	1	15
16	15	0	15

4.2.1.2 Curva de crecimiento células JM109

Se preparó caldo LB (SIGMA-ALDRICH, USA) y se dispensaron 2 mL en microtubos. En un tubo con caldo LB se colocaron 200 μ L de células JM109 y se incubó a 37°C con agitación de 300rpm. La medida de absorbancia fue a 600nm (OD_{600}) en cada punto y se tomó cada 30 minutos por 6 horas.

Se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2016 versión 1703 para el procesamiento de los datos, en el eje X se colocó el tiempo en minutos y en el eje Y se colocó la concentración celular en “mg/L” para obtener la gráfica y ecuación correspondiente.

4.2.1.3 Aislamiento y masificación de células JM109

En Agar MacConkey (SIGMA-ALDRICH, USA) se sembraron 20 μ L de células JM109 y con una asa de Driglaski se extendió por todo el agar (Li et al., 2010). Posterior a las siembras se incubó por 24h a 37°C.

Pasadas las 24h de incubación de las células JM109, con un asa bacteriológica se tomó una de las colonias aisladas y se sembró en 6 mL de caldo LB. Después se incubó a 37°C por 24h (Arnáiz, Isac, & Lebrato Martínez, 2000; Green & Sambrook, 2012; Li et al., 2010) y se almacenó a 4°C.

4.2.1.4 Soluciones tamponadoras para la obtención de células quimiocompetentes

Para la obtención de las células quimiocompetentes se elaboraron dos soluciones tamponadoras diferentes, a las cuales se les dio el nombre de Solución tampón A y Solución tampón B como se describe en (Green & Sambrook, 2012, pp. 163, 164; Li et al., 2010).

4.2.1.4.1. Elaboración Solución tampón A

Se colocaron 150 mL de glicerol y 8.323g de CaCl_2 y se añadió ddH₂O hasta alcanzar un volumen de 1000 mL. Posteriormente se esterilizó la solución autoclavando a 121°C por 20 minutos (Li et al., 2010b). Finalmente se dividió en alícuotas en tubos de 50 mL y se almacenaron a -20°C hasta ser utilizado.

4.2.1.4.2 Elaboración Solución tampón B

Se mezclaron los 10 mL de CH_3COOK , 4 g de MnCl_2 , los 2g de MgCl_2 , 11.8 g de CaCl_2 y 100 mL de glicerol y se aforó a 1000 mL con ddH₂O. Posteriormente se ajustó el pH a 6.4 con HCl 1M (Green & Sambrook, 2012, p. 167).

La solución se esterilizó mediante un filtro con tamaño de poro de 0.45 μM con la ayuda de una bomba al vacío (previo a su uso la bomba fue esterilizada 20 minutos a 121°C) (Green & Sambrook, 2012, p. 167). Después se realizaron alícuotas del solución tampón en tubos falcon de 50 mL y se almacenaron a 4°C antes de su uso (Green & Sambrook, 2012, p. 167).

4.2.1.4.3 Obtención de células quimiocompetente

Se preparó un sólo inóculo, el cual se usó para preparar las células competentes con cada una de las soluciones tamponadoras. En un matraz se prepararon 200 mL de caldo LB y se autoclavó 20 minutos a 121°C, luego se inoculó el medio con 3 mL de las células JM109 masificadas en el paso 4.1.3 y se incubó por aproximadamente 3 horas hasta alcanzar un $\text{OD}_{600} \geq 0.45$ (Green & Sambrook, 2012; Li et al., 2010).

Para elaborar las células competentes se colocaron 50 mL del medio de cultivo (cuando alcanzo un $OD_{600} \geq 0.45$) en un tubo de 50 mL para trabajar con cada uno de las soluciones tamponadoras.

4.2.1.4.3.1 Obtención de células quimiocompetentes con solución tampón A

El tubo que contenía los 50 mL de caldo con las células masificadas fue colocado en baño de hielo que cubrió al mismo, completamente, por 5 minutos, tras lo cual se centrifugó usando una centrifuga refrigerada (SIGMA-Alemania) a 4°C a 1000 gravedades por 5 minutos, luego de centrifugar se descartó el sobrenadante con cuidado sin dañar el precipitado y se añadieron 20 mL de solución tampón A (el cual debe estar frio previamente). Con la ayuda de la pipeta se disgregó el sobrenadante suavemente y se colocó en un baño de hielo (que cubra a todo el frasco) durante 5 minutos. Se repitieron los mismo pasos dos veces más, al descartar por última vez el sobrenadante se colocó en el tubo de 50 mL boca abajo por 30 segundos y luego se resuspendieron las células en 4 mL de solución tampón A (Li et al., 2010b).

Luego de resuspender las células en solución tampón A se realizaron alícuotas de las células competentes en crioviales. Se prepararon dos tipos de alícuotas con la siguiente codificación:

- 1A: volumen de la alícuota de 400 μ L, con 400 μ L de células quimiocompetentes resuspendidas en solución tampón A
- 2A: volumen de la alícuota de 500 μ L, con 400 μ L de caldo LB + 100 μ L de células quimiocompetentes resuspendidas en solución tampón A (Green & Sambrook, 2012; Li et al., 2010).

Posterior a realizar las alícuotas se almacenaron las células a -80°C hasta que fueron utilizadas (Green & Sambrook, 2012; Li et al., 2010).

4.2.1.4.3.2 Obtención de células quimiocompetentes con solución tampón B

El tubo Falcon que contenía los 50 mL de caldo con las células masificadas en hielo se centrifugó en centrifuga refrigerada (SIGMA-Alemania) a 4°C a máxima velocidad por 10 minutos, se descartó el sobrenadante sin dañar el precipitado formado. Se añadieron 20 mL de solución tampón B y se disgregó el precipitado mediante pipeteo; luego que el precipitado se encontraba completamente disgregado se añadieron 30mL de solución tampón B y se incubó por 20 minutos en hielo. Al concluir los 20 minutos se centrifugó a 4°C a máxima velocidad por 10 minutos, al salir de la centrífuga se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 5 mL de solución tampón B y homogenizo mediante pipeteo (Green & Sambrook, 2012).

Tras resuspender las células en la solución tampón B se realizaron alícuotas de las células competentes en crioviales, se prepararon dos tipos de alícuotas con la siguiente codificación:

- 3B: volumen de la alícuota de 400 μ L, con 400 μ L de células quimiocompetentes resuspendidas en solución tampón B
- 4B: volumen de la alícuota de 500 μ L, con 400 μ L de caldo LB + 100 μ L de células quimiocompetentes resuspendidas en solución tampón B (Green & Sambrook, 2012; Li et al., 2010)

4.2.1.4.4 Cuantificación células quimiocompetentes

Se midió la absorbancia OD₆₀₀ de los crioviales que contenían las células quimiocompetentes mediante el equipo NanoDrop 2000 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA) para cada juego de células se utilizó un blanco diferente:

- 1A: solución tampón A 500 μ L

- 2A: se mezcló 400 μ L de caldo LB + 100 μ L de solución tampón A
- 3B: solución tampón B 500 μ L.
- 4B: se mezcló 400 μ L de caldo LB + 100 μ L de solución tampón B

4.3 Ensayo de clonación con control positivo del kit pGEM[®]-T Easy Vector

4.3.1 Preparación de medios de cultivos específicos

4.3.1.1 Ampicilina para medios de cultivo

Se prepararon 12 mL de ampicilina con una concentración final de 50 mg/mL (Santa Cruz Biotechnology, USA), la cual se almacenó en tubo falcón estéril cubierto con aluminio a 4°C.

4.3.1.2 Medios de cultivo con antibióticos

El medio utilizado para la transformación fue agar LB, el cual se autoclavó por 20 minutos a 121°C. Luego de ser autoclavado se enfrió al ambiente y se colocó una concentración de 0.1 mg/mL. Después se dispensó en cajas Petri con un volumen final de 14 mL. Los medios ya solidificados se almacenaron a 4°C hasta ser utilizados.

4.3.1.3 Medios de cultivo con X-gal

A cada medio de cultivo antes de utilizarse se colocó en la incubadora a 37°C por 30 minutos, pasado los 30 minutos a cada medio de cultivo se colocaron 20 μ L de X-gal (PROMEGA, USA) con una concentración de 50mg/mL y con una espátula de Driglaski se extendió por todo el agar. Al terminar de colocar el X-gal en los medios con antibiótico se colocaron los medios a 37°C por 30 minutos antes de ser utilizados (PROMEGA, 2010).

4.3.2 Ligazón del vector pGEM[®]-T Easy con control positivo interno

Siguiendo las instrucciones del vector de PROMEGA (USA) pGEM[®]-T Easy Vector Systems I se realizó la mezcla de ligazón (Tabla 5).

Tabla 5.

Volúmenes para ensamblaje del vector -T easy con el control positivo del kit.

Reactivo	Volumen (µL) 1RX
2X Rapid Ligation Buffer	5
pGEM [®] -T Easy Vector	1
Control Insert Dna	2
T4 DNA Ligase	1
DEPCE H ₂ O	1
Volumen Final	10

Luego de realizar la mezcla de ligazón se incubó durante una hora a temperatura ambiente (PROMEGA, 2010).

4.3.3 Shock térmico para transformación

Pasado el tiempo de incubación de la mezcla de ligazón se procedió a realizar el shock térmico de las células competentes de acuerdo al siguiente protocolo:

Se descongeló un criovial de cada juego de células quimiocompetentes (1A, 2A, 3B y 4B) en hielo, se centrifugó el tubo a 6000 rpm por 5 segundos. En cada microtubo se colocaron 2 µL de mezcla de ligazón con 50 µL de células quimiocompetentes. Se realizó el shock térmico, 20 minutos en hielo, 50 segundos a 42°C y 2 minutos en hielo. El shock térmico se realizó con cada uno de los juegos de células quimiocompetentes preparados (1A, 2A, 3B y 4B).

Posteriormente, se añadieron 950 μL de caldo LB e incubo a 37°C por 110 minutos a 150rpm. Tras la incubación se sembraron 100 μL en los medios previamente preparados (PROMEGA, 2010).

Después de realizar la siembra de las células quimiocompetentes se incubaron los medios a 37°C por 24 horas. Pasadas las 24 horas se observaron los medios de cultivo para verificar su crecimiento.

4.4 Ingeniería Genética *in silico*

4.4.1 Análisis de los cebadores a utilizar

Los cebadores que se utilizaron para el diseño *in silico* de los controles positivos internos fueron los mismos que se utilizarán para realizar la amplificación de los fragmentos de identificación de cada uno de los genes deseados mediante PCR (Tabla 6).

Tabla 6.

Secuencia y nombre de los cebadores utilizados.

Enfermedad	Nombre del cebador	Sentido	Secuencia (5' - 3')
<i>Fusarium osysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza 4 <i>tropical</i>	FocTR4-F	Forward	CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG
	FocTR4-R	Reverse	GCCAGGACTGCCTCGTGA
(VPRRS)	P1(PRRS)	Forward	CCAGCCAGTCAATCARCTGTG
	P2(PRRS)	Reverse	GCGAATCAGGCGCACWGTATG

Tomado de: (Laboratorio de Biología Molecular – AGROCALIDAD Dita et al, 2010 y Rodríguez, 2015)

El análisis de las secuencias se realizó mediante NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.4.2 PCR *in silico*

La PCR *in silico* se realizó mediante el programa SerialCloner 2.6.1 (Goodson et al., 2012) con las secuencias de los cebadores a ser utilizados para amplificar los fragmentos deseados a ser insertados dentro del pGEM-T VECTOR SYSTEM I (PROMEGA, USA) (Tabla 6). Las secuencias utilizadas como molde para la PCR *in silico* fueron extraídas de GenBank de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), el código de acceso de la secuencia para *Fusarium osysporum* f. sp. *cupense* raza 4 *tropical* fue LT571434.1 y para Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (VPRRS) fue KX249761.1.

4.4.3 Ligazón del vector *in silico*

La inserción de los productos de PCR *in silico* dentro del vector pGEM-T Easy se realizó mediante el programa Geneious 9.1.7 (Biomatters, 2016).

4.5 Ingeniería Genética *in vitro*

Las PCR de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical y el virus de PRRS fueron optimizadas por el laboratorio de Biología Molecular de Agro-AGROCALIDAD, en el presente trabajo no se optimizó ninguno de los parámetros de amplificación de la PCR y cualquiera de sus variantes, solamente fueron aplicadas.

4.5.1. Material genético de partida para amplificación mediante PCR

La obtención del ARN del virus de PRRS se realizó mediante el kit de Roche “High Pure Viral RNA” siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Roche, 2017), a partir de una cepa de control del virus de la que se disponía en el laboratorio.

A su vez, en cuanto a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical se contaba con pocos microlitros de ADN previamente extraído como control positivo almacenado en -80°C, el mismo que fue empleado directamente para este estudio.

4.5.2. Amplificación del virus de PRRS por PCR

4.5.2.1 Obtención de ADNc del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (VPRRS)

La obtención del ADNc se realizó mediante el protocolo de retro transcripción con la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA, USA), el cual fue modificado de acuerdo a un protocolo interno del Laboratorio de Biología Molecular de Agro-AGROCALIDAD.

El protocolo de RT fue dos pasos, el primer paso es el ensamble del master mix A e incubación en termociclador T100 Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) (Tablas 7 y 8).

Tabla 7.

Master mix 1 para retro transcripción (RT).

Reactivo	Concentración inicial	1Rx (μL)
H ₂ O	-	3
Random cebadores	50ng/ μL	1
dNTP's	10mM	1
ARN	-	5
Volumen Final		10

Tomado de: (Laboratorio de Biología Molecular – AGROCALIDAD).

Tabla 8.

Perfil térmico para master mix 1 de retro transcripción (RT).

Ciclos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min:seg)
1	65	05:00
1	12	∞

Tomado de: (Laboratorio de Biología Molecular – AGROCALIDAD).

Los 10 μL del master mix A se colocaron el master mix B y se siguió el protocolo de incubación el termociclador T100 Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) (Tabla 9 y 10).

Tabla 9.

Master mix 2 para retro transcripción (RT) con enzima MLV (PRROMEGA).

Reactivo	Concentración inicial	1RX (μL)
H ₂ O	-	2
Buffer RT	5X	4
0,1M DTT	0,1M	2
RNaseOUT	40U/ μL	1
Incubar a 37°C por 2 minutos y añadir		
MLV	200U/ μL	1
Volumen final		10

Tomado de: (Laboratorio de Biología Molecular – AGROCALIDAD).

Tabla 10.

Perfil térmico para master mix 2 de retro transcripción (RT).

N° de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)
1	25	15:00
1	37	50:00
1	70	15:00
1	12	∞

Tomado de: (Laboratorio de Biología Molecular – AGROCALIDAD).

Luego de salir del termociclador se almacenaron los ADNc en -80°C hasta que fueron utilizados.

4.5.2.2. Amplificación del ADNc por PCR

La amplificación del ADNc se realizó mediante PCR con el protocolo estandarizado por el Laboratorio de Biología Molecular de Agro-AGROCALIDAD (Tablas 11 y 12).

Tabla 11.

Concentraciones para amplificación del virus de PRRRS mediante PCR.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	1RX (μL)
H ₂ O	-	-	26,75
Buffer PCR Green Flexi	5X	1X	10
MgCl ₂	25mM	2,5mM	5
dNTP's	10mM	0,2mM	1
Cebador 1 (PRRS)	25μM	0,2mM	1
Cebador 2 (PRRS)	25μM	0,5μM	1
Enzima Go Taq Hot Start	5U/μL	1,25U/μL	0,25
ADN	-	-	5
Volumen Total			50

Tomado de: (Laboratorio de Biología Molecular – AGROCALIDAD).

Tabla 12.

Perfil térmico del virus de PRRS.

N° de Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)
1	95	05:00
40	95	00:30
	55	00:30
	72	01:00
1	72	10:00
1	4	∞

Tomado de: (Laboratorio de Biología Molecular – AGROCALIDAD).

Los fragmentos amplificados por PCR se almacenaron al -80°C hasta que fueron utilizados.

4.5.3 Amplificación de *Fusarium osyспорum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical por PCR

El protocolo utilizado para la amplificación del producto de *Fusarium osyспорum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical fue provisto por el Laboratorio de Biología Molecular de Agro-AGROCALIDAD de acuerdo a lo descrito a continuación (Tablas 13 y 14).

Tabla 13.

Concentraciones para amplificación de Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 tropical mediante PCR.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	1RX (μL)
H ₂ O	-	-	15,88
Buffer PCR Green Flexi	5X	1X	5
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5
dNTP's	10mM	0,2mM	0,5
Cebador FocTR4-F	25μM	0,2mM	0,5
Cebador FocTR4-R	25μM	0,5μM	0,5
Enzima Go Taq Hot Start	5U/μL	25U/μL	0,12
ADN	-	-	1
Volumen Total			25

Tomado de: (Laboratorio de Biología Molecular – AGROCALIDAD).

Tabla 14.

Perfil térmico de Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 tropical.

N° de Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)
1	95	5:00
30	95	1:00
	60	1:00
	72	3:00
1	72	10:00
1	4	∞

Tomado de: (Laboratorio de Biología Molecular – AGROCALIDAD)

Los fragmentos amplificados por PCR fueron almacenados a -80°C hasta ser utilizados.

4.5.4 Purificación de los productos de PCR en gel de Agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% con solución tampón TBE 0.5X y 1 μL de SYBER Safe (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA) por cada 10 mL de solución tampón TBE 0.5X. El gel se corrió durante 30 minutos a 100 voltios. La lectura del gel se realizó en un transiluminador de luz Dark reader DR-46B de Clare Chemical® Technology

Luego de haber corridos los productos de PCR en gel de agarosa de 1.5% se purificaron mediante el kit PureLink® Quick Gel Extraction Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante, como lo detalla el siguiente protocolo:

Se pesaron microtubos de 2 mL, luego de lo cual se cortó el gel de agarosa de 1.5% con los fragmentos deseados. Se pesaron los microtubos con el fragmento deseado; se colocó el Buffer L3 e incubó a 50°C durante 10 minutos a 400rpm. Se transfirió el contenido a la columna Quick Gel Extraction, se procedió a centrifugar en miniSpin Plus (EPPENDRF, IBÉRICA) por un minuto a 14000rpm. El sobrenadante se descartó y se colocaron 500 μL de Buffer Wash (W1), se centrifugó por un minuto a 14000rpm. Se descartó el sobrenadante y centrifugó de nuevo por 2 minutos a máxima velocidad. La columna se colocó en un microtubo de 1.5 mL y añadieron 50 μL de Buffer Elution (E1) e incubó el tubo durante un minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó el microtubo y conservó a -80°C .

4.5.5 Cuantificación del ADN purificado

El ADN purificado se cuantificó con el equipo NanoDrop 2000 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA) utilizando como blanco el Solución tampón Elution (E1) de PureLink® Quick Gel Extraction Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA).

4.5.6 Ligazón de los productos de PCR purificados y shock térmico de las células competentes

El radio del vector que se utilizó fue de 3:1, empleándose para conocer la concentración de ADN (ng) la ecuación del manual del vector (PROMEGA, 2010):

$$\frac{50ng \text{ vector} \times (\text{tamaño del inserto en kilobases})}{3.0kb \text{ del vector}} \times \frac{3}{1} \quad \text{Ecuación 1}$$

= Concentración de ADN a ser insertada (ng)

$$\frac{\text{Concentración de ADN a ser insertada (ng)} \times 1\mu l}{\text{Concentración de ADN cuantificación (ng)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

= Volumen de ADN a ser insertado (μl)

Luego de calcular el volumen de ADN (μL) que iba a ser insertado dentro del vector, se añadió el resto de reactivos a la mezcla de clonación (Tabla 15).

Tabla 15.

Master mix para ligazón del vector con gen de interés.

Reactivo	Volumen (μL)
2X Rapid Ligation Buffer	5
pGEM®-T Easy Vector	1
ADN purificado	*
T4 DNA Ligase	1
DEPCE H ₂ O	-
Volumen Final	10

Nota

(*) Volumen de ADN (μL) depende de los cálculos realizados anteriormente

(-) El volumen de DEPCE H_2O (μL) se calcula hasta llegar un volumen de $10\mu\text{L}$.

Tomado de: (Laboratorio de Biología Molecular – AGROCALIDAD).

La ligazón del vector se realizó a temperatura ambiente y a 4°C en termociclador overnight. Después de la incubación a temperatura ambiente o a 4°C en termociclador se realizó el shock térmico, de acuerdo al siguiente protocolo:

Se descongeló un criovial de cada juego de células quimiocompetentes (1A, 2A, 3B y 4B) en hielo y se centrifugó el tubo a 6000 rpm por 5 segundos. En microtubo se colocaron $2\mu\text{L}$ de mezcla de ligazón con $50\mu\text{L}$ de células quimiocompetentes. Se realizó el shock térmico, 20 minutos en hielo, 50 segundos a 42°C y 2 minutos en hielo. Se añadieron $950\mu\text{L}$ de caldo LB e incubo a 37°C por 110 minutos a 150rpm. Tras la incubación se sembraron $100\mu\text{L}$ en los medios previamente preparados (PROMEGA, 2010).

Después de realizar la siembra de las células se incubaron los medios a 37°C por 24 horas. Pasadas las 24 horas se observaron los medios de cultivo para verificar su crecimiento.

4.5.7 Masificación de las colonias transformadas

Luego de la incubación de las células competentes a 37°C por 24 horas se observaron las colonias de color blanco que crecieron en el medio específico. Luego se seleccionó una colonia, se tomó la mitad de la colonia con un asa bacteriológica, la cual se sembró en 5 mL de caldo LB (SIGMA-ALDRICH, USA) con una concentración de ampicilina (Santa Cruz Biotechnologi, USA) de 0.1mg/mL y la cual se incubo a 37°C a 150rpm.

La otra mitad de la colonia se sembró en medio agar LB con una concentración de ampicilina (Santa Cruz Biotechnologi, USA) de 0.1mg/mL y X-gal (PROMEGA, USA) con el asa bacteriológica se realizó una siembra por estriado y se incubó a 37°C por 24 horas (PROMEGA, 2010).

Luego de la incubación de 24 horas se almacenó el medio LB con la colonia masificada y se almacenó en la refrigeradora de 4°C.

4.5.8 Extracción del ADN plasmídico de las colonias transformadas

La extracción del ADN plasmídico se logró mediante el Kit de purificación PureYield™ Plasmid Miniprep System (PROMEGA, USA), de acuerdo al protocolo descrito a continuación (PROMEGA, 2009):

Se tomó un 1 mL de caldo LB y centrifugó por 30 segundos a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el precipitado con 600 µL de agua DEPEC. Se colocaron 100 µL de Cell Lysis Buffer (Blue) y homogenizó por inversión. A la mezcla se añadieron 350 µL de Neutralization Solution (previamente fría) y pasó a centrifugar la mezcla por 3 minutos a máxima velocidad. El sobrenadante fue transferido a la columna PureYiel™ Minicolum y se centrifugó por 15 segundos a máxima velocidad. Se añadieron 200 µL de Endotoxin Removal Wash (ERB) y se centrifugó por 15 segundos a máxima velocidad. A la columna se añadieron 400 µL de Column Wash Solution (CWC) y centrifugó 30 segundos a máxima velocidad. Se colocó la columna en microtubo de 1.5 mL, se añadieron 30 µL de Elution Buffer y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Tras la incubación se centrifugó por 15 segundos a máxima velocidad.

Las muestras de ADN plasmídico extraídas se almacenaron en el congelador de -80°C hasta ser utilizadas.

4.5.9 PCR del ADN plasmídico con cebadores específicos

Se realizó una PCR a partir del ADN plasmídico extraído con los cebadores específicos para cada una de las enfermedades (Tabla 6). Se utilizó el protocolo específico para cada uno de las enfermedades estandarizadas por el Laboratorio de Biología Molecular de Agro-AGROCALIDAD.

4.5.10 Visualización de la PCR del ADN clonado en gel de agarosa

Para la visualización de los productos de PCR del ADN plasmídico se realizó un gel de agarosa al 1.5% disuelto con Solución tampón TBE al 0.5X. Se corrió el gel con Solución tampón TBE 0.5X por 30 minutos a 100 voltios.

4.6 Secuenciación de los productos de PCR de ADN plasmídico

Las muestras fueron secuenciadas por la empresa Macrogen (Corea). Se enviaron 50 µL con una concentración mínima de 20 ng/µL de ADN en microtubos de 1.5 mL por cada amplicón obtenido mediante PCR del gen clonado para cada enfermedad.

La empresa realizó la purificación de los amplicones de PCR a través de una malla Millipore MSNU030 (Millipore SAS, Molsheim, France), y posteriormente procedieron a una secuenciación de Sanger en el secuenciador 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA) con el kit BigDye terminator v3.1. El resultado final es la secuencia entregada por Macrogen (Macrogen, 2017).

El análisis de las secuencias se realizó mediante el programa Geneious 9.1.7

4.7 Preservación de células

La preservación de las células transformadas y confirmadas mediante secuenciación, se realizó en tubos de 1.5 mL con glicerol al 60% según el protocolo descrito por (Granja, 2011), la resuspensión se realizó en agar LB con ampicilina. Las células se almacenaron en el congelador de -80°C.

4.8. Análisis de resultados obtenidos

4.8.1 Análisis de colonias transformadas

Se realizó un recuento de las colonias obtenidas en cada ensayo de clonación, y mediante el programa Microsoft Office Excel 2016 versión 1703 se obtuvo la eficiencia de transformación aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{número de colonias obtenidas}}{\mu\text{g de ADN obtenido}}$$

Ecuación 3

$$= \text{eficiencia de transformación} \frac{\text{cfu}}{\mu\text{g ADN}}$$

4.8.2 Análisis de secuenciación

Las secuencias de los amplicones de los clones obtenidos fueron analizadas mediante el software Geneious 9.1.7 (Biomatters, 2016) en el cual se efectuó un alineamiento para generar una secuencia consenso. Se comparó la secuencia consenso, con la secuencia que poseía el laboratorio de Biología Molecular de Agro-AGROCALIDAD.

5. Resultados y Discusión

5.1. Obtención de células quimiocompetentes

5.1.1. Elaboración de la curva de calibrado de células JM109

Se elaboro una curva de calibrado mediante diluciones seriadas en caldo LB con el fin de construir la curva de calibrado.

Se obtuvieron 16 puntos para la gráfica de la curva de calibrado (Figura 10), en la cual se observó un R^2 de 0.9631 y la ecuación de la recta:

$$x = \frac{(y - 0.0324)}{74.115} \quad \text{Ecuación 4}$$

El R^2 de 0.9631 que se obtuvo se puede considerar bajo, lo cual pudo deberse al volumen utilizado para elaborar la curva de calibrado, la acumulación de errores de pipeteo y la medición de la absorbancia puede verse afectada por compuestos del medio de cultivo.

Las empresas encargadas de la venta, distribución y elaboración de materiales e insumos de laboratorio, sugieren que al trabajar con volúmenes pequeños se debe tener extremo cuidado al momento de sumergir la punta de la pipeta. Al trabajar con volúmenes pequeños se debe introducir la punta de 1 a 2 mm dentro de la solución de trabajo (Koeman, 2014; METLER TOLEDO, 2017). Otros errores a tomar en cuenta son la densidad de la solución de trabajo; la reutilización la punta de la pipeta, éstas pueden conservar residuos de la solución de trabajo y generan errores (Koeman, 2014; METLER TOLEDO, 2017).

Otro aspecto a tomar en cuenta es la longitud de onda utilizada para la medición de la absorbancia. Cabe mencionar que en diversos estudios describen que la medida de la longitud de onda debe ser de 600 nm para trabajar con biomasa (Contreras, Bertola, Giannuzzi, & Zaritzky, 2001; Neira, 2010; Riu & Boqué, 2003; Sutton, 2017; Universidad de Valencia, 2017; VEGA & VOLTOLINA, 2007). Se debe considerar que muchas veces es probable que exista una interferencia en la medida óptica por compuestos residuales provenientes del mismo medio de cultivo utilizado. Se debe resaltar que homogenizar la solución de trabajo antes de realizar su medición puede ayudar a obtener un mejor R^2 (Contreras et al., 2001; Koeman, 2014; VEGA & VOLTOLINA, 2007).

El valor obtenido de R^2 en el presente trabajo fue de 0.9631. En 2017 Sutton describe que trabajar con materiales biológicos genera errores, por este motivo él obtuvo un R^2 de 0.9000. Considerado el R^2 descrito por Sutton, se puede concluir que el valor obtenido de R^2 al realizar la curva de calibrado es un valor válido (Alarcón, 2001; Arnáiz, Isac, & Lebrato, 2000; Marabel & Álvarez, 2014; Rehbein, 2013; Riu & Boqué, 2003; Sutton, 2017; Universidad de Valencia, 2017).

Curva de Calibrado células JM109

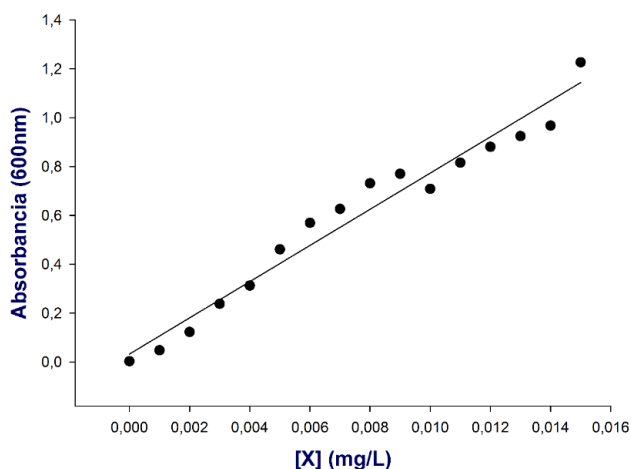


Figura 10. Curva de calibrado de células JM109 (*E. coli*) con absorbancia de 600nm

5.1.2. Curva de crecimiento células JM109

La curva de crecimiento se realizó durante un periodo de 6 horas y tomando los puntos cada 30 minutos, la cual se observa en la figura 11.

La fase exponencial se alcanzó a los 90 minutos post inoculación, lo cual es concordante con lo recopilado en bibliografía; donde se describe que la fase exponencial de *Escherichia coli* se alcanza entre los 80 y 120 minutos posteriores a la inoculación de la bacteria (Arnáiz, Isac, & Lebrato, 2000; Green & Sambrook, 2012; Li et al., 2010; Rehbein, 2013; Santos, Ferrat, & Eichelmann, 2005; Sezonov, Joseleau, & D'Ari, 2007), por lo tanto, se puede concluir que la cepa de *E. coli* JM109 se encontraba viable y en óptimas condiciones para su masificación.

Cabe mencionar que el medio de cultivo y la cantidad del inóculo utilizado pueden favorecer el crecimiento y masificación de *E. coli*. El medio de cultivo donde se produce el crecimiento es fundamental en este caso el medio LB fue

ideal para el desarrollo de *E. coli* (Green & Sambrook, 2012; Li et al., 2010; Santos, Ferrat, & Eichelmann, 2005; Sekse et al., 2012; Sezonov et al., 2007). De igual manera la concentración de inóculo en el medio influyó considerablemente permitiendo que la fase de latencia fuera menor en el tiempo (Arnáiz, Isac, & Lebrato, 2000; Sekse et al., 2012; Sezonov et al., 2007). Al incrementar la concentración del inicial el tiempo de duración de la fase estacionaria se redujo permitiendo iniciar la fase exponencial en un menor tiempo (Izarra, Santayana, Villena, & Gutiérrez, 2010; Santos et al., 2005; Sezonov et al., 2007).

Curva de crecimiento células JM109

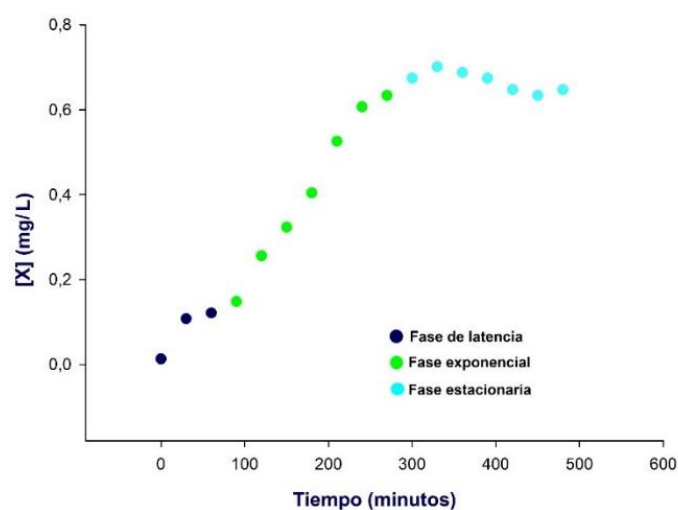


Figura 11. Curva de crecimiento de células JM109

5.1.3. Cuantificación células quimiocompetentes

A cada preparado de células quimiocompetentes se realizó la medida de OD₆₀₀ para conocer su concentración final. Las células quimiocompetentes que resultaron con una mayor concentración celular fueron las 3B (mg/L) (Tabla 16).

Las altas concentraciones en estas células quimio competentes pueden explicarse ya que se tomaron células en la fase exponencial de crecimiento. Este resultado concuerda con lo descrito por Li en 2010 y también Green y Sambrook

en 2012 las células quimiocompetentes deben elaborarse cuando alcanzan una $OD > 0.26$ y en nuestro caso las empleamos con una $OD > 0.50$.

Tabla 16.

Absorbancia y concentración celular (mg/L) de caja juego de células quimiocompetentes.

Juego de células	OD600 (nm)	[X] (mg/L)
1A	0,124	0,00123592
2A	0,039	0,0000890
3B	0,304	0,00366458
4B	0,045	0,00017001

5.2. Ensayo de clonación con control positivo del kit pGEM[®]-T Easy Vector

Se realizó la ligazón del vector pGEM[®]-T con el control positivo del vector, para verificar el estado de las células quimiocompetentes elaboradas. El crecimiento de las células se observó a partir de las 36 horas (Figura 12). Lo cual difiere a lo descrito para el control positivo del kit pGEM[®]-T Easy Vector.

Diversos factores pueden afectar el crecimiento de las células tales como los nutrientes y el estrés celular. El medio LB utilizado en comparación con el medio SOC, posee una menor cantidad de nutrientes (PROMEGA, 2010; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017b, 2017a), lo cual puede afectar el crecimiento de las células *E. coli*. La cantidad de nutrientes presente en el medio puede afectar el crecimiento. En diversos estudios se describe que una cantidad muy baja de nutrientes puede la fase de latencia de las células de *E. coli* al verse afectados los mecanismos de replicación de dichas células (Alarcón, 2001; Barth et al., 2000; Li et al., 2010b; Mendoza, 2008; Santos et al., 2005).

Cabe mencionar, que el estrés en una célula bacteriana puede deberse a diversos factores como la temperatura, los componentes del medio selectivo y la cepa utilizada. La temperatura de 37 °C empleada para el crecimiento de *E. coli*, durante todos los ensayos de este trabajo, fue constante, por lo que sería prudente descartarla como factor de estrés. Por ello se presume que los componentes del medio selectivo, como ampicilina y X-gal, pueden generar estrés. Como se indica en el manual del vector pGEM[®]-T Easy se recomienda una concentración de ampicilina de 100 µg/mL de medio LB, porque una concentración superior puede afectar los mecanismos de adaptación y el gen de resistencia, produciendo que el crecimiento en el medio selectivo se produzca en un periodo de tiempo mayor (Chung, Bang, & Drake, 2006; Lennen & Herrgard, 2014; PROMEGA, 2010).

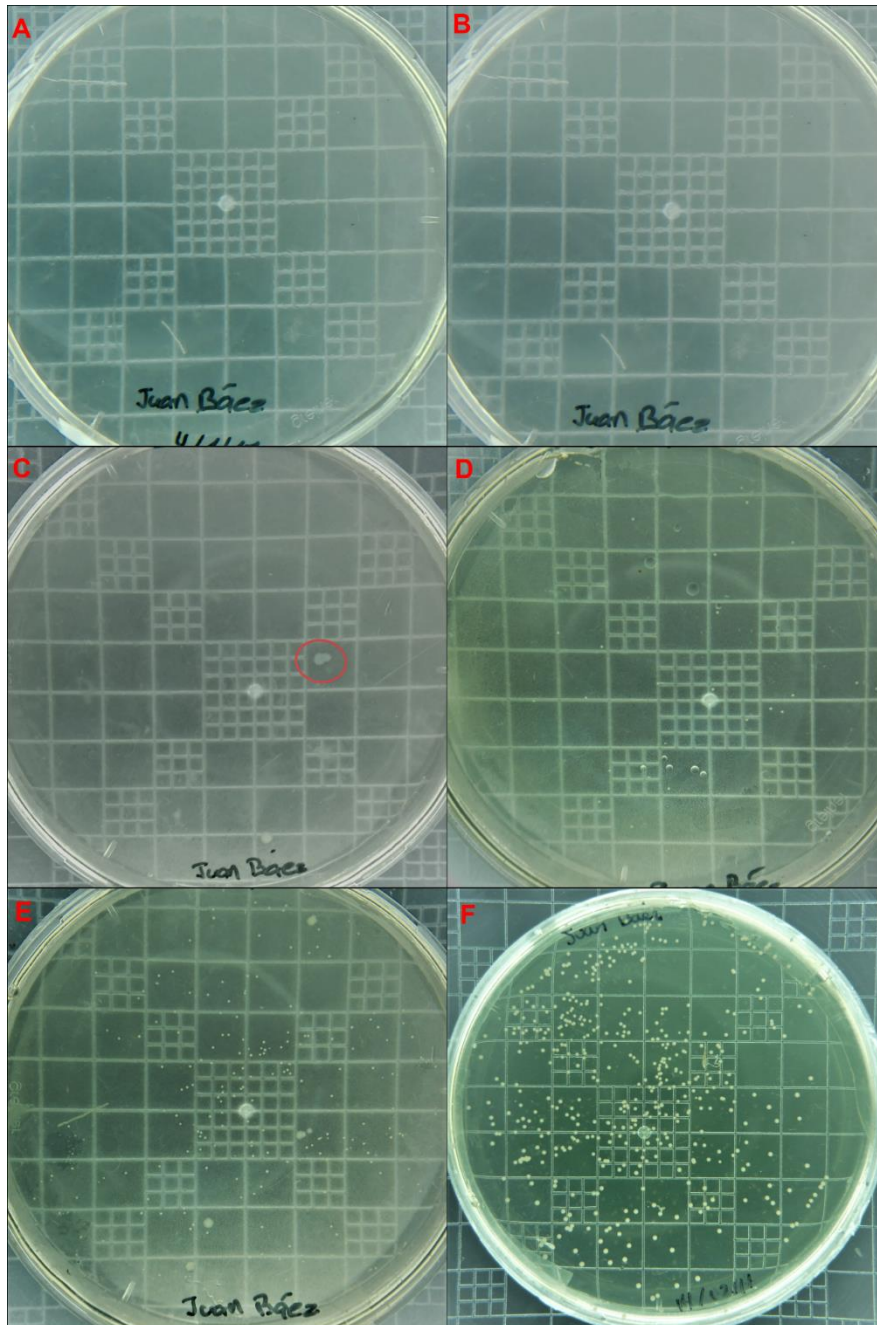


Figura 12. Progreso de crecimiento de las células quimiocompetentes.

En la figura

A: 24 horas, B: 30 horas y C: 36 horas de crecimiento a 37°C de células quimiocompetente con solución tampón

A. La figura D: 24 horas, E: 30 horas y F: 36 horas de crecimiento a 37°C de células quimiocompetentes con solución tampón B.

5.3. Ingeniería Genética *in silico*

La Ingeniería Genética *in silico* permite predecir el resultado que se puede obtener, en la parte *in vitro*. Simultáneamente permite analizar los resultados que se obtendrán.

5.3.1. Análisis de los cebadores a utilizar

Se observó que los cebadores son específicos para la amplificación del gen deseado para cada enfermedad. Los cebadores Forward y Reverse de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical (Tabla 17 y 18) presentan una identidad del 100%, así como los cebadores del virus de PRRS (Tabla 19 y 20) que también presentan una identidad del 100%.

El alto porcentaje de identidad que presenta cada uno de los cebadores a ser utilizados evidencia que fueron diseñados adecuadamente, lo cual se corrobora con el alineamiento local realizado en BLAST/NCBI en las tablas 17, 18, 19 y 20 (Collado, 2010).

Tabla 17.

Resultados del análisis BLAST para el cebador Forward FoCTR4.

N°	Nombre	Número de Acceso GenBank	Identidad (%)
1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cupense</i> 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KX101211.1	100%
2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cupense</i> voucher BRIP 62347a 28S ribosomal	KX101210.1	100%

	RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence		
3	TPA_inf: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> race 4 strain B2 rDNA repeat region	LT571434.1	100%
4	<i>Fusarium oxysporum</i> strain Xuwen-N2 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM108312.1	100%
5	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i> cubense</i> voucher INISAV CV1-5 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM047064.1	100%
6	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i> cubense</i> voucher INISAV CV6.2.9 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM047063.1	100%
7	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i> cubense</i> voucher INISAV Indo19 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM047062.1	100%
8	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i> cubense</i> voucher INISAV NT 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM047061.1	100%
9	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i> cubense</i> strain XJg-8-1 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KC869396.1	100%

10	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cupense</i> strain FOC4 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KC869392.1	100%
----	--	------------	------

Tomado de: (NCBI, 2017).

Tabla 18.

Resultados del análisis BLAST para el cebador Reverse FoCTR4.

N°	Nombre	Número de Acceso GenBank	Identidad (%)
1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cupense</i> 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KX101211.1	100%
2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cupense</i> voucher BRIP 62347a 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KX101210.1	100%
3	<i>Agromyces flavus</i> strain CICC 202695 genome assembly, chromosome: I	LT629755.1	100%
4	TPA_inf: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> race 4 strain B2 rDNA repeat region	LT571434.1	100%

5	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lycopersici isolate FO-7 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KP898396.1	100%
6	<i>Fusarium oxysporum</i> strain Xuwen-N2 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM108312.1	100%
7	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cupense</i> voucher INISAV CV1-5 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM047064.1	100%
8	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cupense</i> voucher INISAV CV6.2.9 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM047063.1	100%
9	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cupense</i> voucher INISAV Indo19 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM047062.1	100%
10	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cupense</i> voucher INISAV NT 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM047061.1	100%

Tomado de: (NCBI, 2017).

Tabla 19.

Resultados del análisis BLAST para el cebador Forward P1(PRRS).

N°	Nombre	Número de Acceso GenBank	Identidad (%)
1	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, partial genome	KX249761.1	100%
2	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, partial genome	KX249760.1	100%
3	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, partial genome	KX249759.1	100%
4	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, partial genome	KX249758.1	100%
5	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, partial genome	KX249752.1	100%
6	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, partial genome	KX249751.1	100%
7	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, partial genome	KX249750.1	100%
8	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, partial genome	KX249749.1	100%
9	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, partial genome	KX249748.1	100%
10	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, complete genome	KU131560.1	100%

Tomado de: (NCBI, 2017).

Tabla 20.

Resultados del análisis BLAST para el cebador Reverse P2(PRRS).

N°	Nombre	Número de Acceso GenBank	Identidad (%)
1	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, complete genome	KX815419.1	100%
2	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, complete genome	KY348850.1	100%
3	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, complete genome	KY348847.1	100%
4	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, complete genome	KU131565.1	100%
5	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain 14-68, complete genome	KT257947.1	100%
6	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain 14-67, complete genome	KT257946.1	100%
7	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain 14-64, complete genome	KT257945.1	100%

8	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain 14-60, complete genome	KT257944.1	100%
9	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA, nearly complete genome, strain: Jpn5-37	LC008532.1	100%
10	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate XW014, complete genome	KF724406.1	100%

Tomado de: (NCBI, 2017).

5.3.2. PCR *in silico*

Es una estimación realizada para conocer el tamaño resultante del amplicón a obtener si se realiza la PCR con los cebadores deseados.

La PCR *in silico* para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical rindió como resultado un amplicón de 472 bp (Figura 13) y un amplicón de ~292 bp para el virus de PRRS (Figura 14), lo cual se corresponde con lo esperado para el diseño de los cebadores realizado en el presente estudio.

Cabe mencionar, que los amplicones obtenidos con softwares bioinformáticos permiten predecir el resultado que se obtendrá en el laboratorio. En la actualidad estos constituyen una de las herramientas más utilizadas en la predicción de resultados esperados (Bevilacqua, Menolascina, Aurora, Lucivero, & Quatela, 2010; Dourado et al., 2010; Kalendar, Lee, & Schulman, 2011, 2014). Mediante los algoritmos que utilizan los softwares bioinformáticos se puede predecir los

resultados, sin embargo, existe una limitación para las predicciones que pueden realizar, muchas veces los cebadores no se unen a la secuencia blanco debido a su especificidad e impide la amplificación de la secuencia (Bevilacqua et al., 2010; Dourado et al., 2010; Kalendar et al., 2014).

```

1      10      20      30      40      50
CACGTTTAAAGGTGCCATGAGAGGCCACCTCTCCGAGACGACCTCAACGGTACCACCGATG
60      70      80      90      100     110
TGGTGGTCGGGCTCCTGTGCGGGCCGTCCAGGGCGGGATATGTAGAGAATGTGGTGGTGT
120     130     140     150     160     170
AGGGTAGGTGGCCAGGTCCAGGGTAGGTTCTCAAATCCGTCAATCCGGCTTGAATCGG
180     190     200     210     220     230
AGGACAGGTCTAGGGTAGGCCAGAGTCGGGTCTAGGGTAGGCAGCTCTAACCCCTCGAAG
240     250     260     270     280     290
TGGTCTACCCGGTAGTCAACTTCAATCGCCTCTCACGGCCGCCACGGACCTCGCATGAC
300     310     320     330     340     350
GACGGGACCACCACCATCGGATTTGCCTTGGTTCGAAATAGTTGGTATATGCACTTTTTGA
360     370     380     390     400     410
AAAAATGCGTGCAAAAAGGTTTTGTGGTTTTGGTGGCCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTTTC
420     430     440     450     460     467
CCATACAAATGAATTTTTGCGGAAAATAAAAAGTGGCTCACGAGGCAGTCCCTGGC

```

Figura 13. Amplicón obtenido mediante PCR in silico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4 tropical.

Tomado de: (Biomatters, 2016)

```

1      10      20      30      40      50
CCAGCCAGTCAATCAACTGTGCCAGTTGCTGGGTGCAATGATAAAGTCCC
60      70      80      90      100
AGCGCCAGCAACCTAGGGGAGGACAGGCTAAAAAGAAAAAGCCTGAGAAG
110     120     130     140     150
CCACATTTTTCCCCTAGCTGCAGAAGATGACATCCGGCACCCACCTCACCCA
160     170     180     190     200
GACTGAACGCTCCCTCTGCTTGCAATCGATCCAGACGGCTTTTTAATCAGG
210     220     230     240     250
GCGCAGGAACTGCGTCGCTTTTCATCCAGCGGGAAGGTCAGTTTCCAGGTT
260     270     280     290     292
GAGTTTATGCTGCCGGTTGCTCATACAGTGCGCCTGATTTCG

```

Figura 14. Amplicón obtenido mediante PCR in silico del virus de PRRS. (Tomado de: Biomatters, 2016)

5.3.3. Ligazón del vector *in silico*

La ligazón *in silico* del vector pGEM[®]-T Easy con el gen de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4 tropical dio un peso molecular de 3455 bp (Figura 15), en cuanto al virus de PRRS se obtuvo un peso molecular de ~3277 bp (Figura 16).

La ligazón *in silico* permitió determinar cómo resultaría la construcción genética final y ayudó a predecir los resultados obtenidos *in vitro*. Es importante recalcar que en los últimos años los softwares bioinformáticos permiten predecir la unión del vector con el gen de interés, tomando en cuenta las diferentes posibilidades de de unión que pueden producirse usando cada vector (Bevilacqua et al., 2010; Kalendar et al., 2011).

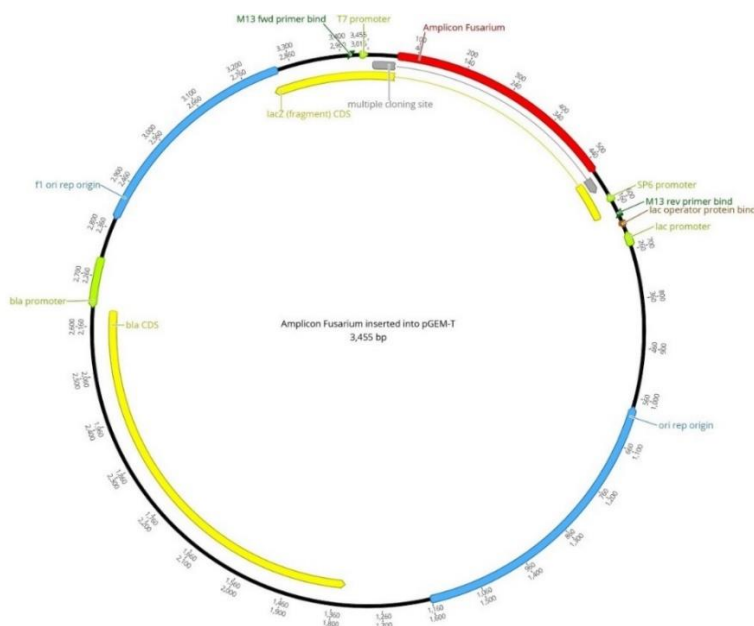


Figura 15. Diseño del vector pGEM[®]-T Easy con amplicón de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4 tropical

Tomado de: (Biomatters, 2016)



Figura 16. Diseño del vector pGEM[®]-T Easy con amplicón del virus de PRRS Tomado de: (Biomatters, 2016)

5.4. Ingeniería Genética *in vitro*

5.4.1. Amplificación de genes de interés para clonación mediante PCR

La amplificación del gen de interés de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical resultó en un amplicón de 460 bp (Figura 17), mientras que para el virus de PRRS se obtuvo un amplicón de ~300 bp (Figura 18).

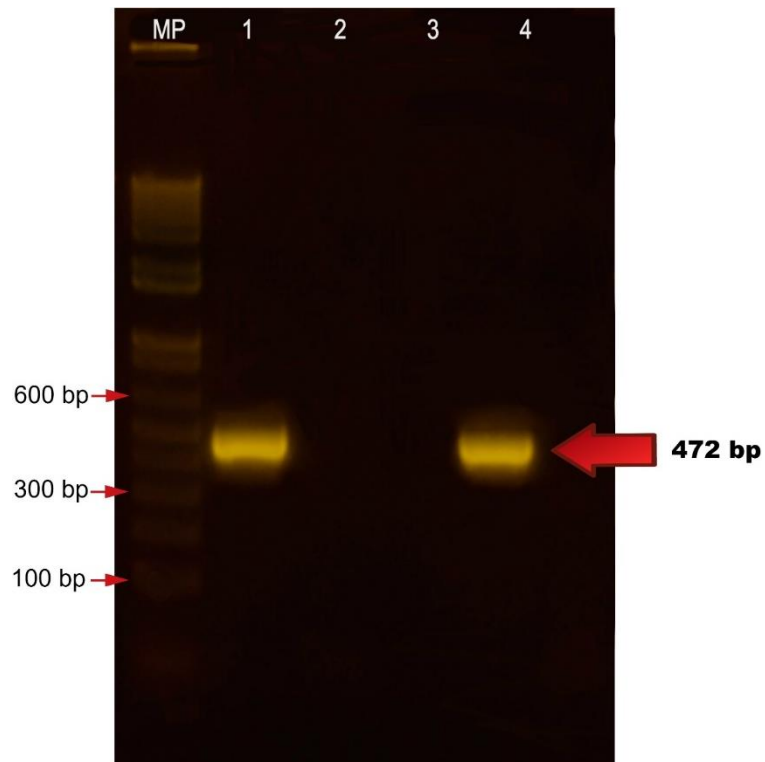


Figura 17. Visualización del producto de PCR de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical de 472 bp.

En la figura 17 se muestra el producto de PCR para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical de 472 bp. amplificado con los cebadores FoCTR4-F y FoCTR4-R en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) teñido con SYBER®Safe DNA gel stain, aplicando un voltaje de 100V. durante 30 minutos. En la figura MP: Marcador de peso molecular (1kb DNA ladder, Invitrogen), 1: Control positivo, 2: Carril vacío, 3: Control negativo y 4: Producto de PCR de 463 bp

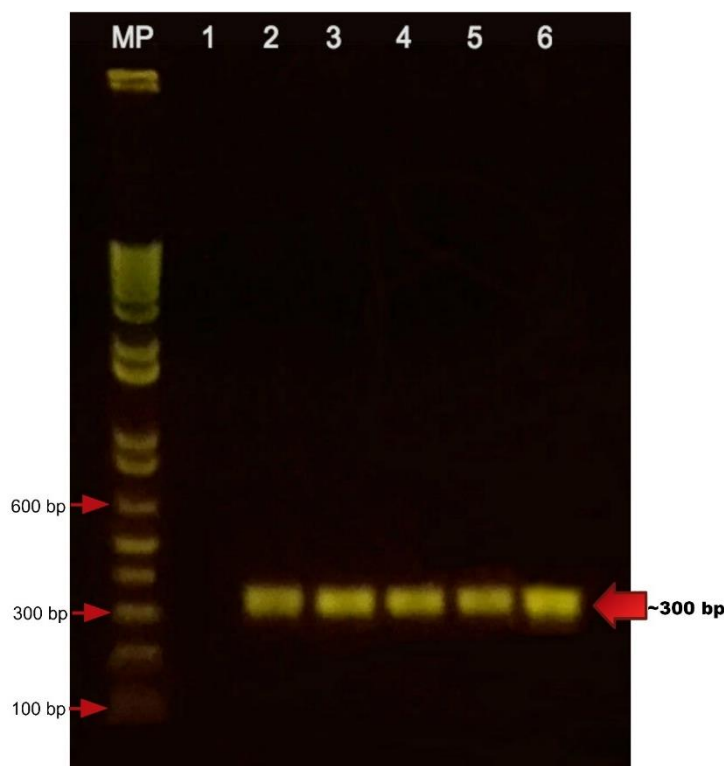


Figura 18. Visualización del producto de PCR del virus de PRRS de ~300 bp.

En la figura 18 se muestra el producto de PCR para el virus de PRRS de ~300 bp. amplificado con los cebadores P1(PRRS) y P2(PRRS) en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) teñido con SYBER®Safe DNA gel stain, aplicando un voltaje de 100V. durante 30 minutos. En la figura MP: Marcador de peso molecular (1kb DNA ladder, Invitrogen), 1: Control negativo, 2: Control positivo, 3, 4, 5 y 6: Producto de PCR de ~300 bp.

5.4.3 Eficiencia de transformación

La mayor eficiencia se presentó a temperatura ambiente en el juego de células 3B para los dos genes de interés, donde se obtuvieron los valores de 1.23×10^4 cfu/ μ g ADN para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical y 1.924×10^4 cfu/ μ g ADN para el virus de PRRS (Tabla 21 y 22). Estos valores son bajos con respecto a lo descrito por el fabricante para este tipo de células, donde se espera una eficiencia de transformación de 2×10^8 cfu/ μ g ADN.

Estos resultados pudieron deberse a diversos factores como el método empleado para obtener las células quimiocompetentes; el método de

transformación empleado; el ratio molar; y, la concentración celular de cada preparación de células quimiocompetentes.

Tabla 21.

Eficiencia de transformación a temperatura ambiente.

Temperatura ambiente						
Muestra	Células competentes	Repetición 1	Repetición 2	Promedio	µg de ADN utilizados	Eficiencia de transformación (cfu/µg ADN)
FoCTR4	1A	0	0	0	0,0236	0
	2A	0	0	0	0,0236	0
	3B	296	289	292,5	0,0236	$1,23 \times 10^4$
	4B	51	47	49	0,0236	$2,076 \times 10^3$
VPRRS	1A	0	0	0	0,0146	0
	2A	0	0	0	0,0146	0
	3B	264	298	281	0,0146	$1,924 \times 10^4$
	4B	78	63	70,5	0,0146	$4,828 \times 10^3$

Nota

FoCTR4: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 tropical

VPRRS: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

Tabla 22.

Eficiencia de transformación a temperatura 4°C

Temperatura ambiente						
Muestra	Células competentes	Repetición 1	Repetición 2	Promedio	µg de ADN utilizados	Eficiencia de transformación (cfu/µg ADN)
FoCTR4	1A	0	0	0	0,0236	0
	2A	0	0	0	0,0236	0
	3B	124	100	112	0,0236	$4,74 \times 10^3$
	4B	42	38	40	0,0236	$1,694 \times 10^3$
VPRRS	1A	0	0	0	0,0146	0
	2A	0	0	0	0,0146	0
	3B	132	142	137	0,0146	$9,383 \times 10^3$
	4B	36	37	36,5	0,0146	$2,5 \times 10^3$

Nota

FoCTR4: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 tropical

VPRRS: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

Cabe mencionar que al encontrarse caducadas las células de *E. coli* JM109, esto puede influir en los resultados ya que como indica el manual del vector pGEM-T® el estado de las células competentes es fundamental para la obtención de una alta eficiencia de las mismas. Lo cual concuerda con lo reportado en bibliografía acerca de la importancia del estado de las células competentes para obtener un valor óptimo de transformación (Briones, 2008; Joshi & Deshpande, 2011; Klug et al., 2006; Marchuk, Drumm, Saulino, & Collins, 1991; PREMIER Biosoft, 2017; PROMEGA, 2010, 2017; Rodriguez & Denhardt, 2014; SnapGene, 2017; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010).

Por otra parte, los métodos empleados para la obtención de células competentes pueden afectar en gran medida la eficiencia de transformación. Los resultados de este estudio presentan una eficiencia menor como ya se mencionó y esto podría deberse a que los métodos empleados difieren de los recomendados por el fabricante. De hecho otras investigaciones como las de Li en 2010, indican que la concentración de cloruro de calcio empleada es un factor a considerar, la cual en altas dosis puede afectar la eficiencia de transformación y puede ser uno de los motivos de los resultados obtenidos en este trabajo experimental.

Otro factor a considerar, es la metodología empleada para transformar las células JM109, que consiste en el shock térmico de acuerdo a lo descrito por el fabricante. Sin embargo, al utilizar células quimiocompetentes diferentes a lo recomendado por la casa comercial se puede esperar una eficiencia de

transformación menor a lo descrito; debido a que la duración del shock térmico en cada una de las células competentes empleadas puede ser distinto y generar un error al momento de la transformación (Briones, 2008; Cortez, 2013; Klug et al., 2006).

Adicionalmente el ratio molar empleado en los ensayos fue de 1:3, ADN :Vector. El manual del vector pGEM-T® Easy describe que el vector y las células competentes JM109 adquiridas del fabricante se encuentran optimizadas para trabajar con una relación de 1:1, sin embargo, se recomienda trabajar con una relación 1:3. Cabe destacar que la eficiencia de transformación puede verse afectada al no encontrarse optimizada para las células competentes utilizadas en los ensayos (Briones, 2008; Cortez, 2013; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010; Zhou & Gomez, 2000). El ratio molar es uno de los factores a tomar en cuenta al momento de realizar los cálculos para obtener una mayor eficiencia de transformación en los ensayos.

Adicionalmente debe considerarse la concentración celular de cada preparación células quimiocompetentes. En la bibliografía podemos encontrar La PCR del ADN plasmídico de *Fusarium oxysporum* que es indispensable poseer una concentración óptima, pues una concentración elevada de células quimiocompetentes que presenten crecimiento en el medio selectivo dificulta el posterior análisis de los transformantes (Green & Sambrook, 2012; PROMEGA, 2017; Valenzuela, 2016).

5.4.4. PCR, secuenciación y conservación del gen de interés

La PCR del ADN plasmídico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4 tropical generó un fragmento de 472 bp (Figura 19) y para el virus de PRRS uno de ~300bp (Figura 21). La secuenciación a su vez resultó una lectura de 444 bp

(Figura 20) con un análisis de identidad del 100% (Tabla 23) y se obtuvo 303 bp (Figura 22) con un análisis de identidad del 98% (Tabla 24) respectivamente.

Estos resultados denotan que los clones obtenidos fueron los adecuados y esto permitió establecer satisfactoriamente el banco de células transformadas (Tabla 25).

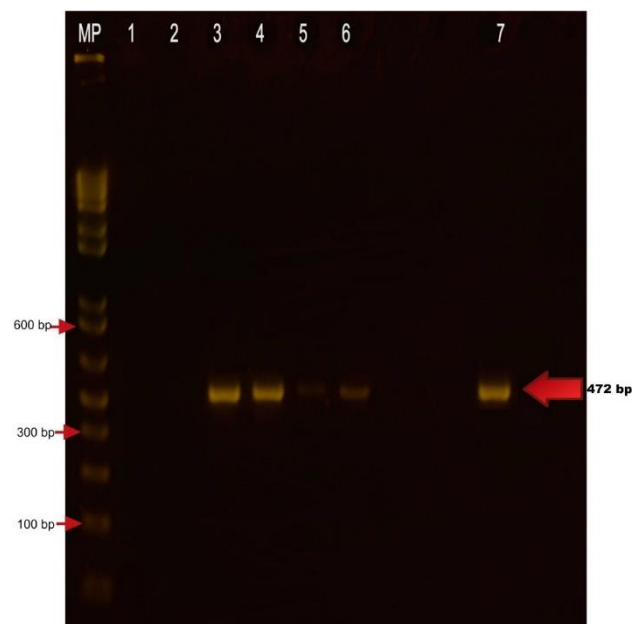


Figura 19. Visualización del producto de PCR de ADN plasmídico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical.

En la figura 19 se muestra el producto de PCR de ADN plasmídico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical de 472 bp. amplificado con los cebadores FoCTR4-F y FoCTR4-R en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) teñido con SYBER®Safe DNA gel stain, aplicando un voltaje de 100V. durante 30 minutos. En la figura MP: Marcador de peso molecular (1kb DNA ladder, Invitrogen), 1 y 2: Control negativo, 3, 4, 5 y 6: Producto de PCR de 472 bp, 7: Control positivo

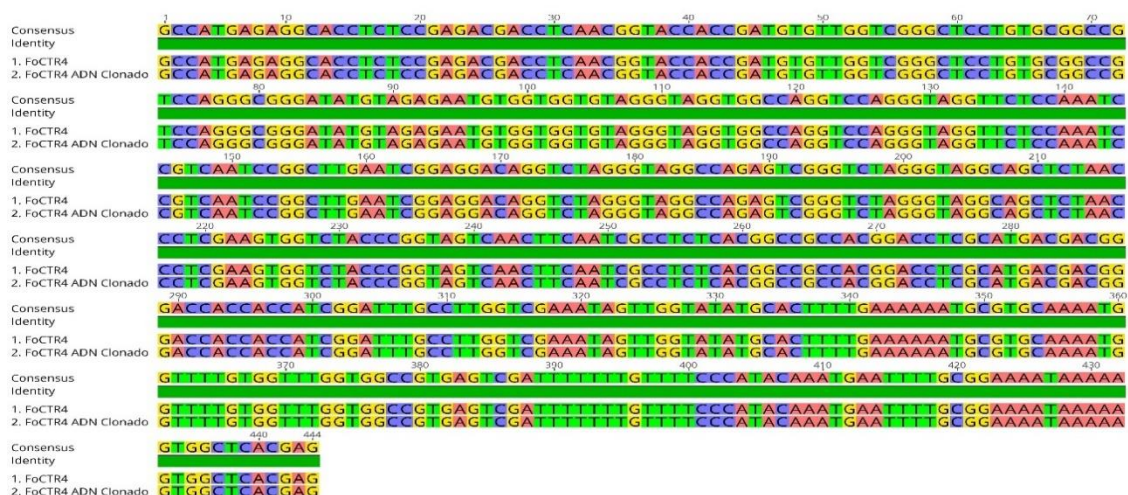


Figura 20. Secuencia de ADN original y la clonada de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 tropical

Tomado de: (Biomatters, 2016).

Tabla 23.

Resultado del análisis BLAST del ADN plasmídico del clon de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 tropical.

N°	Nombre	Número de Acceso GenBank	Identidad (%)
1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. cubense voucher BRIP 62353a 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KX101211.1	100%
2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. cubense voucher BRIP 62347a 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA	KX101210.1	100%

	intergenic spacer, partial sequence		
3	TPA: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4 strain B2 rDNA repeat region	LT571434.1	100%
4	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i> voucher INISAV CV1-5 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM047064.1	100%
5	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i> voucher INISAV CV6.2.9 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM047063.1	100%
6	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i> voucher INISAV Indo19 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KM047061.1	100%
7	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i> voucher INISAV NT 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KC869396.1	100%
8	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i> strain XJg-8-1 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	KC869392.1	100%

9	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i> strain FOC4 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	FJ664984.1	100%
10	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i> strain CAV312 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	FJ664978.1	100%

Tomado de: (NCBI, 2017).

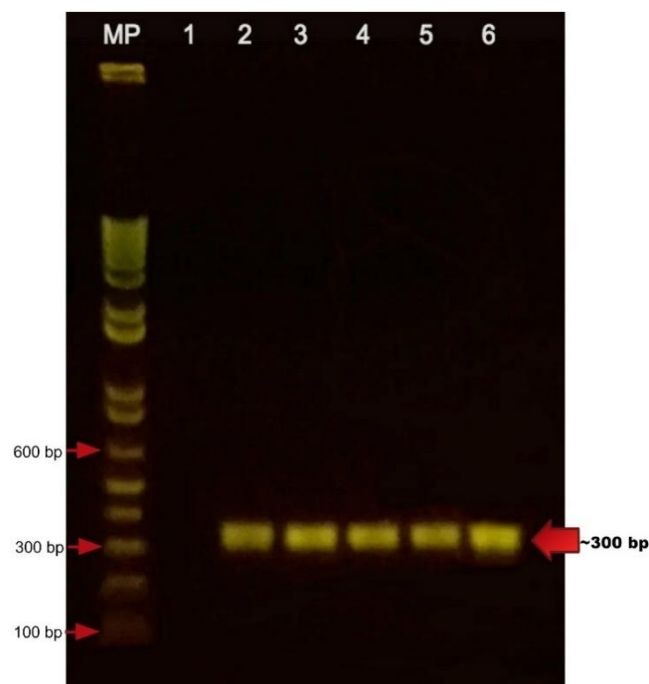


Figura 21. Visualización del producto de PCR de ADN plasmídico del virus de PRRS.

En la figura 21 se muestra el producto de PCR de ADN plasmídico del virus de PRRS de ~300 bp. amplificado con los cebadores P1(PRRS) y P2(PRRS) en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) teñido con SYBER®Safe DNA gel stain, aplicando un voltaje de 100V. durante 30 minutos. En la figura MP: Marcador de peso molecular (1kb DNA ladder, Invitrogen), 1: Control negativo, 2: Control positivo, 3, 4, 5 y 6: Productos de PCR de ~300 bp.



Figura 22. Secuencia de ADN original y la clonada del virus de PRRS

Tomado de: (Biomatters, 2016)

Tabla 24.

Resultados del análisis BLAST del ADN plasmídico del clon del virus de PRRS.

N°	Nombre	Número de Acceso GenBank	Identidad (%)
1	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain ISU-P, complete genome	EF532816.1	99%
2	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain WSV, complete genome	KP998429.1	98%
3	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain TY, complete genome	KP998428.1	98%
4	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	KP998405.1	98%

	strain cw46, complete genome		
5	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate ISU-P nucleocapsid protein gene, complete cds	AF043974.1	98%
6	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain 14-68, complete genome	KT257947.	98%
7	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain 14-67, complete genome	KT257946.1	98%
8	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain 14-64, complete genome	KT257945.1	98%
9	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate 15 nucleocapsid protein gene, complete cds	KP208800.1	98%
10	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate C7 nucleocapsid protein (ORF7) gene, complete cds	KM229521.1	98%

Tomado de: (NCBI, 2017).

Tabla 25.

Características de los clones del banco de conservación.

	VPRRS	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> raza 4 tropical
Vector	pGEM®-T Vector (PROMEGA)	pGEM®-T Vector (PROMEGA)
Hospedero	<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>Escherichia coli</i> JM109
Tamaño del inserto	~303 bp	472 bp
Criopreservante	Glicerol al 60%	Glicerol al 60%
Almacenamiento	Congelador -80°C	Congelador -80°C

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

El tiempo de crecimiento de las células quimiocompetentes de este estudio se fue menor a lo reportado en la literatura debido a que las condiciones empleadas difieren a las recomendadas por el fabricante.

Los resultados obtenidos *in vitro* coinciden con los predichos *in silico*, lo cual denota un que el diseño de Ingeniería Genética aplicado fue el adecuado.

Factores tales como la caducidad, el método de transformación y la concentración del inóculo inicial influyen de forma directa en la eficiencia de transformación obtenida en el presente estudio.

6.2 Recomendaciones

Se recomienda probar diversos protocolos de extracción del ADN plasmídico.

En caso de realizar cambios en el protocolo para obtención de células quimiocompetentes se recomendaría revisar los protocolos disponibles en el libro de Sambrook "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"

Optimizar el shock térmico, con el fin de obtener una eficiencia mayor de transformación.

Emplear software bioinformáticos para predecir los resultados esperados en los experimentos *in vitro*.

Referencias

- Acosta, L., Pinedo², J., Hernández³, E., & Villarreal, J. (2013). *Comparison between the Vitek immunodiagnostic Assay System and PCR for the detection of Salmonella spp. in foods. Revista Salud Uninorte, 29(2), 174182.*
- Agrocalidad. (2017). Agrocalidad. Recuperado 24 de enero de 2017, de <http://www.agrocalidad.gob.ec> AGROCALIDAD. (2017). Biología Molecular. Recuperado 30 de mayo de 2017, de <http://www.agrocalidad.gob.ec/coord-gral-laboratorios/biologiamolecular/>
- Agrocalidad, & FAO. (2013). Plan Nacional de Contingencia para Fusarium oxysporum f. sp. cubense (Foc R4T) [Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura]. Recuperado 7 de mayo de 2017, de http://www.fao.org/fileadmin/templates/banana/documents/Docs_Resources_2015/PLAN-DE-CONTINGENCIA-COMPLETO-REVISION-11.pdf
- Alarcón, L. (2001). Manual de practicas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Programa de Nutrición. (Vol. 1). Ciudad de Juarez: UACJ.
- Albina, E. (1997). Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview. *Veterinary Microbiology, 55(1), 309-316.* [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01322-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01322-3)
- American Society of Plant Biologists. (2017). *ASPB | Arabidopsis Seed Mitochondria Are Bioenergetically Active Immediately upon Imbibition and Specialize via Biogenesis in Preparation for Autotrophic Growth.* Recuperado 26 de marzo de 2017, de <http://aspb.org/feeditems/arabidopsis-seed-mitochondria-are->

bioenergetically-activeimmediately-upon-imbibition-and-specialize-
via-biogenesis-inpreparation-for-autotrophic-growth/

- ANELLI, J., & FAO. (2010). *Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)*. Recuperado 10 de mayo de 2017, de <http://www.fao.org/3/a-i0264e/i0264e02.pdf>
- Angel, J. (2015). Transformación de células competentes. Recuperado 26 de abril de 2017, de http://joseangelalonso.blogspot.com/2012/12/blog-post_3441.html
- Aranda, E. (2010a). Interpretación de la deshidrogenasa láctica. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 49(2), 132–134.
- Aranda, E. (2010b). SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO DEL CERDO (PRRS) Y SU IMPORTANCIA EN LA PRODUCCIÓN PORCINA. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 49(2), 132–134.
- Arias, M., Barceló, J., Muñoz, A., & Sánchez, J. (2013). Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) - Patogenia y Transmisión. Recuperado 10 de mayo de 2017, de <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/inf.htm>
- Arnáiz, C., Isac, L., & Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. I Métodos directos e indirectos. *Tecnología del agua*, 20, 45-52.
- Arnáiz, C., Isac, L., & Lebrato Martínez, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. I Métodos directos e indirectos. *Tecnología del agua*, 20 (205), 45-52. Recuperado de <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/34261>
- Arrebola, D. F. A., & Fernández, L. A. R. (2008). Métodos generales de conservación de microorganismos Autores: Daniel Francisco Arencibia Arrebola¹, Luis Alfredo Rosario Fernández², Rafael Gámez Menéndez¹. Instituciones: Centro de Productos Naturales (CPN,

CNIC), Centro de Química Farmacéutica (CQF) 2. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Arencibia/publication/262724715_Metodos_generales_de_conservacion_de_microorganismos/links/00b7d5388d7db4203b000000.pdf

ASPE. (2017). Datos porcícolas. Recuperado 10 de mayo de 2017, de <http://www.aspe.org.ec/index.php/informacion/estadisticas/datosporcicola-2011>

Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E. A., & Engert, A. (2000). *Compatible-Solute-Supported Periplasmic Expression of Functional Recombinant Proteins under Stress Conditions. Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1572-1579. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1572-1579.2000>

Basu, C. (2015). *PCR primer design (Second edition)*. New York: Humana Press.

Bevilacqua, V., Menolascina, F., Aurora, D., Lucivero, S., & Quatela, N. F. (2010). *A Novel Tool for Assisted In-silico Cloning and Sequence Editing in Molecular Biology*. En D.-S. Huang, M. McGinnity, L. Heutte, & X.-P. Zhang (Eds.), *Advanced Intelligent Computing Theories and Applications (Vol. 93, pp. 239-245)*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14831-6_32

Biocision. (2017). Criopreservacion de Celulas. Recuperado 30 de mayo de 2017, de <http://biocision.com.s219960.gridserver.com/campaigns/cellcryopreservation-espanol>

Biomatters. (2016). Geneious (Versión 9.1.7) [Windows 10]. USA. Recuperado de <http://www.geneious.com>

Blanco, M., Valverde, R., & Gómez, L. (2003). Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense*, 27(1), 19–28.

- Briones, M. C. (2008). Construcción de un vector para clonar productos de PCR. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, México. Recuperado de <http://repositorio.ipicyt.edu.mx/handle/11627/228>
- Buendía, D. (2010). Michael Sandel. Contra la perfección. La ética en la era de la ingeniería genética. Barcelona: Marbot, 2007. Dilemata, 0(3). Recuperado de <http://www.dilemata.net/revista/index.php/dilemata/article/view/43>
- CABI. (2016). *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (*Panama disease of banana*). Recuperado de <http://www.cabi.org/isc/datasheet/24621#toDistributionMaps>
- Camacho, D., Reyes, J., Franco, L., Comach, G., & Ferrer, E. (2016). Clonación de secuencias de alfavirus y flavivirus para su uso como controles positivos en el diagnóstico molecular. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 33(2), 269-273. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.332.2101>
- Cañete, M. (2013). El sector primario: la ganadería. Recuperado 10 de mayo de 2017, de <http://acercatealassociales.blogspot.com/2013/01/elsector-primario-la-ganaderia.html>
- Chaparro, A. (2014). LA INGENIERÍA GENÉTICA DE PLANTAS EN COLOMBIA: UN CAMINO EN CONSTRUCCIÓN. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 10. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n2.43412>
- Chen, I., & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial *transformation*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 241-249. <https://doi.org/10.1038/nrmicro844>
- Chung, H., Bang, W., & Drake, M. (2006). *Stress Response of Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), 52-64. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00002.x>
- Collado, A. (2010). Análisis y caracterización de trabajos BLAST para la planificación eficiente en entorno Grid y Supercomputación.

Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. Recuperado de <https://riunet.upv.es/handle/10251/13855>

Contreras, E. M., Bertola, N. C., Giannuzzi, L., & Zaritzky, N. E. (2001). UN MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA EN CULTIVOS PUROS Y SISTEMAS DE BARROS ACTIVADOS. *Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos*, 1(1), 12.

Corona, M. (2011). Historia de la Biotecnología y sus aplicaciones. Obtenido de: <http://siladin.cch>. Recuperado de http://portalacademico.cch.unam.mx/materiales/prof/matdidac/sitpro/exp/bio/bio1/GuiaBiol/ANEXO_5Ing.pdf

Cortez, F. (2013). *How is possible to avoid plasmid self-ligation during cloning*. Recuperado 31 de mayo de 2017, de https://www.researchgate.net/post/How_is_possible_to_avoid_plasmid_self-ligation_during_cloning Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B.

B. (2013). *Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822-880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

Dahm, R. (2005). *Friedrich Miescher and the discovery of DNA*. *Developmental Biology*, 278(2), 274-288. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.028>

Dita, M. A., Waalwijk, C., Buddenhagen, I. W., Souza Jr, M. T., & Kema, G. H. J. (2010). *A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen*. *Plant Pathology*, 59(2), 348-357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x>

Dita, M., Martínez, E., & Vicente, L. (2014). *Technical Manual Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by Fusarium oxysporum f. sp. cubense Tropical Race 4 (TR4)*. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Einar_Martinez_de_la_Parte/pu

blication/273632807_Technical_Manual_Prevention_and_diagnostic_of_Fusarium_Wilt(Panama_Disease)_of_banana_caused_by_Fusarium_oxysporum_f._sp._cubense_Tropical_Race_4(TR4)/links/55072e450cf27e990e050b7b.pdf

- Dourado, A., Alves, P., Tenreiro, T., Ferreira, E., Tenreiro, R., Fareleira, P., & Barreto, M. (2010). *Identification of Sinorhizobium (Ensifer) medicae based on a specific genomic sequence unveiled by M13-PCR fingerprinting*. *International Microbiology*, 12(4), 215–225.
- EMBL. (2017). *Cloning using restriction enzymes*. Recuperado 29 de mayo de 2017, de https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/cloning_methods/restriction_enzymes/
- Enciso, C., Montilla, M., Santacruz, M. M., Nicholls, R. S., Rodríguez, A., Mercado, M., & Puerta, C. (2004). *Comparison of the indirect immunofluorescent (IFAT), ELISA test and the comercial Chagatek test for anti-Trypanosoma cruzi antibodies detection*. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud*, 24(1), 104-108.
- EPPO. (2004). *European and Mediterranean Plant Protection Organization*. OilbWprs.Org.Et.Www.Eppo.Org,1-15. <https://doi.org/10.1111/j.13652338.1999.tb01431.x>
- EPPO. (2017). *Fusarium oxysporum f. sp. cubense (FUSACB) [World distribution]* EPPO Global Database. Recuperado 7 de mayo de 2017, de <https://gd.eppo.int/taxon/FUSACB/distribution>
- FAO. (2007). La propagación de la lengua azul confirma el aumento de enfermedades animales. Recuperado 22 de enero de 2017, de <http://www.fao.org/Newsroom/es/news/2007/1000675/index.html>
- FAO. (2017a). La ganadería y el medio ambiente. Recuperado 10 de mayo de 2017, de <http://www.fao.org/livestock-environment/es/>

- FAO. (2017b). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado 24 de enero de 2017, de <http://www.fao.org/home/es/>
- FAO, Dietze, K., Pinto, J., Wainwright, S., Hamilton, C., & Khomenko, S. (2011). *Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virulence jumps and persistent circulation in Southeast Asia*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-al849e.pdf>
- Fasching, C. L., Cejka, P., Kowalczykowski, S. C., & Heyer, W.-D. (2015). *Top3Rmi1 Dissolve Rad51-Mediated D Loops by a Topoisomerase-Based Mechanism*. *Molecular Cell*, 57(4), 595-606. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.022>
- Fields, S. (2005). *CELL BIOLOGY: Whither Model Organism Research Science*,307(5717),1885-1886. <https://doi.org/10.1126/science.1108872>
- García, F., Ordóñez, N., Konkol, J., Al-Qasim, M., Naser, Z., Abdelwali, M., ... Kema, G. (2014). *First Report of Fusarium oxysporum f. sp. cubense Tropical Race 4 Associated with Panama Disease of Banana outside Southeast Asia*. *Plant Disease*, 98(5), 694-694. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0954-PDN>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). *Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), e6. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gilbert, W. (1981). DNA sequencing and gene structure. *Bioscience Reports*, 1(5), 353–375.
- Giraldo, A., & FAO. (2014). A PECUÁRIA LEITEIRA EO EFEITO ESTUFA1 PRODUÇÃO DE LECHE Y EL CAMBIO CLIMÁTICO GLOBAL. Recuperado 10 de mayo de 2017, de <http://cbql.com.br/biblioteca/cbql3/IIICBQL205.pdf>

- Goodson, M., Benaroch, P., Schreiner, H., Flammann, H., Annaiah, C., Nedvetskaya, T., ... Seckute, J. (2012). *Serial Cloner* (Versión 2.6.1). United States.
- Granja, M. (2011). Detección de los genes ampC, ampR, ampD, ampE y ampG mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e identificación por secuenciación automática de mutaciones asociadas a la resistencia frente a antibióticos-Lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*. ESPE. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec:8080/handle/21000/5207>
- Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cuarta, Vol. 1). New York: Cold Spring Harbor. Gutiérrez-Samperio, C. (2002). Bioética en ingeniería genética. *Gac Med Mex*, 138(1), 109–119.
- Hafizi, R., Salleh, B., & Latiffah, Z. (2014). *Morphological and molecular characterization of Fusarium solani and F. oxysporum associated with crown disease of oil palm*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 959-968.
- Hsiang, Y.-H., Lihou, M. G., & Liu, L. F. (1989). *Arrest of replication forks by drugstabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin*. *Cancer research*, 49(18), 5077–5082.
- INEC. (2016). Instituto Nacional de Estadística y Censos. Recuperado de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/institucional/home/>
- Isique, C., & Fernando, J. (2011). Anticuerpos contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino y la frecuencia de problemas respiratorios en porcinos de una granja tecnificada en etapas de recría y acabado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/4238>
- Izarra, M., Santayana, M., Villena, G., & Gutiérrez, M. (2010). Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanas por

- Aspergillus niger*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 139-150.
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). *Polymerase chain reaction: methods, principles and application*. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81–97.
- Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A. (2011). *Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis*. *Genomics*, 98(2), 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.04.009>
- Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A. (2014). *Fast PCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis*. *DNA Cloning and Assembly Methods*, 271–302. Kennedy, N. A., Walker, A. W., Berry, S. H., Duncan, S. H., Farquarson, F. M.,
- Louis, P., & Thomson, J. M. (2014). *The Impact of Different DNA Extraction Kits and Laboratories upon the Assessment of Human Gut Microbiota Composition by 16S rRNA Gene Sequencing*. *PLOS ONE*, 9(2), e88982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088982>
- Klug, W., Cummings, M., & Spencer, C. (2006). *Conceptos de Genética* (8va ed.). España: Pearson.
- Koeman, K. (2014). *10 Ways to Prevent Pipetting Errors*. Recuperado 29 de mayo de 2017, de <http://www.ttelaboratories.com/Accuracy-Matters-Blog/entryid/25/10-ways-to-prevent-pipetting-errors>
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., ... others. (2001). *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature*, 409(6822), 860–921.
- Lehman, I. R. (1974). *DNA Ligase: Structure, Mechanism, and Function*. *Science*, 186(4166), 790-797. <https://doi.org/10.1126/science.186.4166.790>
- Lennen, R., & Herrgard, M. (2014). *Combinatorial Strategies for Improving Multiple-Stress Resistance in Industrially Relevant Escherichia coli*

Strains. Applied and Environmental Microbiology, 80(19), 6223-6242.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01542-14>

- Li, X., Sui, X., Zhang, Y., Sun, Y., Zhao, Y., Zhai, Y., & Wang, Q. (2010). *An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells*. African Journal of Biotechnology, 9(50), 8549–8554.
- Luckey, J. A., Drossman, H., Kostichka, A. J., Mead, D. A., D’Cunha, J., Norris, T. B., & Smith, L. M. (1990). *High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis*. Nucleic Acids Research, 18(15), 4417-4421.
- Macrogen. (2017). *Macrogen Sequencing*. Recuperado 29 de mayo de 2017, de <http://foreign.macrogen.com/eng/>
- MAGAP. (2017). Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca – Ecuador. Recuperado 24 de enero de 2017, a partir de <http://www.agricultura.gob.ec/>
- Mainero, F. X. S. (2015). La ingeniería genética, la nueva biotecnología y la era genómica (1.a ed., Vol. 12). México: Fondo de Cultura Económica.
- Majowicz, S. E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J. M., Stapleton, J., Angulo, F. J., ... Kirk, M. D. (2014). *Global Incidence of Human Shiga Toxin–Producing Escherichia coli Infections and Deaths: A Systematic Review and Knowledge Synthesis*. Foodborne Pathogens and Disease, 11(6), 447-455. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1704>
- MAPAMA. (2016). Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Recuperado 23 de enero de 2017, de <http://www.mapama.gob.es/es/>
- Marabel, M., & Álvarez, F. (2014). Estimación de biomasa en herbáceas de datos hiperespectrales, regresión PLS y la transformación continuum removal. Revista de Teledetección, (42), 49. <https://doi.org/10.4995/raet.2014.2286>

- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., & Collins, F. (1991). *Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products*. *Nucleic Acids Research*, 19(5), 1154.
- McAlexander, M. A., Phillips, M. J., & Witwer, K. W. (2013). *Comparison of Methods for miRNA Extraction from Plasma and Quantitative Recovery of RNA from Cerebrospinal Fluid*. *Frontiers in Genetics*, 4. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00083>
- Mendoza, V. (2008). Bacterias: CUCHICHEO, ESTRÉS Y MUERTE. *synthesis*, 18(8). Recuperado de http://www.uach.mx/extension_y_difusion/synthesis/2008/10/21/bacterias.pdf
- Mestanza, J., & Velasco, B. (2015). La Costa produce el 70% de la carne de res. Recuperado 23 de enero de 2017, de <http://www.elcomercio.com/actualidad/costa-produccion-carnederesganado-consumo.html>
- METLER TOLEDO. (2017). Cinco técnicas de pipeteo para potenciar su rendimiento. Recuperado 29 de mayo de 2017, de http://www.mt.com/mx/es/home/supportive_content/news/po/pipe/pipettin g-techniques.html
- NCBI. (2017). *National Center for Biotechnology Information*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Neira, M. (2010). Guia TP 2 Química II 2010. Recuperado 11 de mayo de 2017, de https://www.ucursos.cl/odontologia/2010/2/OD0903/1/material_docente/o/566977
- Nelson, E. A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J. E., & Benfield, D. A. (1993). *Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(12), 3184-3189.

- Nguyen, D. P., Nguyen, T. A. D., Le, T. H., Tran, N. M. D., Ngo, T. P., Dang, V. C., ... Kumeda, Y. (2016). *Dissemination of Extended-Spectrum β Lactamase- and AmpC β -Lactamase-Producing Escherichia coli within the Food Distribution System of Ho Chi Minh City, Vietnam*. *BioMed Research International*, 2016, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2016/8182096>
- Ochoa, R., Martínez, J. C., Estrada, E., García, A. M., Ferriol, X., Blanco, R., & Sotolongo, F. (2000). Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *Vaccimonitor*, 9(1), 17-20.
- OIE. (2008). *PPRS: the disease, its diagnosis, prevention and control*. Recuperado de http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/PPRS_guide_web_bulletin.pdf
- OIE. (2014). ¿Qué es el síndrome disgénésico y respiratorio porcino? Recuperado de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/PPRS-ES.pdf
- O'Neill, W., Henderson, J., Pattemore, J., O'Dwyer, C., Perry, S., Beasley, D., ... Shivas, R. (2016). *Detection of Fusarium oxysporum f. sp. cubense tropical race 4 strain in northern Queensland*. *Australasian Plant Disease Notes*, 11(1). <https://doi.org/10.1007/s13314-016-0218-1>
- Polaina, J. (2004). ESTRUCTURA, FUNCIÓN E INGENIERÍA MOLECULAR DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA DIGESTIÓN DE CARBOHIDRATOS. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq04v28p061_Polaina_04.pdf

- PREMIER Biosoft. (2017). *TA Cloning Technology*. Recuperado 29 de mayo de 2017, de http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/TA_Cloning.html
- Primrose, S. B., Twyman, R. M., Primrose, S. B., & Primrose, S. B. (2006). *Principles of gene manipulation and genomics (7th ed)*. Malden, MA ; Oxford: Blackwell Pub.
- PROMEGA. (2009). *PureYield™ Plasmid Miniprep System Protocol*. Recuperado 24 de abril de 2017, de <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technicalbulletins/101/pureyield-plasmid-miniprep-system-protocol/>
- PROMEGA. (2010). *pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual TM042 - pgem-t and pgem-t easy vector systems protocol.pdf*. Recuperado 23 de enero de 2017, de <https://www.promega.co.uk/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgemt%20and%20pgemt%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf>
- PROMEGA. (2017). *Bacterial Strain JM109*. Recuperado 28 de mayo de 2017, de <https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dnamarkers/bacterial-strains-and-competent-cells/bacterial-strain-jm109/>
- ProMusa. (2016). *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. Recuperado 7 de mayo de 2017, de <http://www.promusa.org/Fusarium+oxysporum+f.+sp.+cubense>
- PRRS Control. (2015). *Porcine Reproductive & Respiratory Syndrome Virus Control*. Recuperado 10 de mayo de 2017, de <http://www.prrscontrol.com/wps/portal/prrscontrol/prrs-knowledge#>
- Quezada, M., Varas, F., Ruiz, A., Islas, A., Diaz, N., & Lecocq, C. (2004). Detección inmunohistoquímica del antígeno del virus del síndrome respiratorio y reproductivo (vPRRS) en cerdos inoculados. Archivos

de medicina veterinaria, 36(2), 183-195.
<https://doi.org/10.4067/S0301-732X2004000200009>

- Ramírez, E., Ruiz, A., Islas, A., Lecocq, C., Carrasco, L., & Quezada, M. (2006). Características hematológicas y patológicas de cerdos inoculados experimentalmente con el aislado chileno del virus síndrome respiratorio y reproductivo porcino. *Archivos de medicina veterinaria*, 38(2), 151-159. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200009>
- Ramírez, V., Rivera, G., Manchego, S., More, B., Chiok, C., & others. (2013). *Isolation and genotyping of porcine respiratory and reproductive syndrome virus on pig farms in Lima and Arequipa, Peru*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP)*, 24(2), 222–232.
- Rehbein, P. (2013). *How to exactly determine the OD600 of E.coli suspension*. Recuperado 11 de mayo de 2017, a partir de https://www.researchgate.net/post/How_to_exactly_determine_the_OD600_of_Ecoli_suspension
- Reid, C. E., & Lazinski, D. W. (2000). *A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1), 424429.
- Riley, M. B., Williamson, M. R., & Maloy, O. (2002). *Plant disease diagnosis*. The Plant Health Instructor. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2002-1021-01>
- Riu, J., & Boqué, R. (2003). Calibración lineal. *TECNICAS DE LABORATORIO-BARCELONA-*, 676–681.
- Roche. (2017). *High Pure Viral RNA Kit*. Recuperado 29 de mayo de 2017, de <https://shop.roche.com/shop/products/high-pure-viral-rna-kit>
- Rodríguez, R. L., & Denhardt, D. T. (2014). *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*. Butterworth-Heinemann.
- Rodríguez, V. (2015). Nuevas aportaciones epidemiológicas y diagnósticas para el estudio de la interacción entre la fauna doméstica y silvestre.

Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Recuperado de <http://eprints.ucm.es/30016/1/T36044.pdf>

- Rodríguez, Y., Rangel, E., Centeno, F., Mendoza, O., & Parra, A. (2004). Detección de enfermedades virales afectando al pimentón en los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del estado Lara, Venezuela, utilizando la técnica ELISA. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 21(2), 105-115.
- Santos, R., Ferrat, G., & Eichelmann, G. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Rev. Latinoamericana Microbiología*, 47, 92–101.
- Sebastián, F. (2009). Estudio Sanitario del Jabalí (*Sus scrofa*) en Cataluña (Noreste de España). Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/48527/fcs1de1.pdf?sequence=1>
- Sekse, C., Bohlin, J., Skjerve, E., & Vegarud, G. (2012). *Growth comparison of several Escherichia coli strains exposed to various concentrations of lactoferrin using linear spline regression*. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2, 5. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-5>
- Sezonov, G., Joseleau, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth*. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746-8749. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- Shelke, G. V., Lässer, C., Gho, Y. S., & Lötval, J. (2014). *Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(0). Recuperado de <http://journals.cocaction.net/index.php/jev/article/view/24783>
- SnapGene. (2017). *Tips for Restriction Cloning*. Recuperado 29 de mayo de 2017, de http://www.snapgene.com/resources/cloning_tips/

- Sonnenberg, A., Marciniak, J. Y., Rassenti, L., Ghia, E. M., Skowronski, E. A., Manouchehri, S., ... Heller, M. J. (2014). *Rapid Electrokinetic Isolation of Cancer-Related Circulating Cell-Free DNA Directly from Blood*. *Clinical chemistry*, 60(3), 500-509. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.214874>
- Sotomayor, I., & INIAP. (2012). La raza tropical 4 de mal de Panamá: amenaza para la industria bananera y platanera del Ecuador. Recuperado de http://www.fao.org/fileadmin/templates/banana/documents/Docs_Resources_2015/TR4/bananera1.pdf
- Sugimoto, K., Okazaki, T., & Okazaki, R. (1968). *Mechanism of DNA chain growth, II. Accumulation of newly synthesized short chains in E. coli infected with ligase-defective T4 phages*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 60(4), 1356–1362.
- Sutton, S. (2017). *Measurement of Cell Concentration in Suspension by Optical Density*. Recuperado 11 de mayo de 2017, de <http://www.microbiol.org/resources/monographwhitepapers/measurement-of-cell-concentration-in-suspension-by-opticaldensity/>
- TAIR. (2017). *Arabidopsis Information Resource (TAIR)*. Recuperado 26 de marzo de 2017, de <http://www.arabidopsis.org/>
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. (2010). *PCR Cloning Considerations*. Recuperado de https://tools.thermofisher.com/content/sfs/appendix/Cloning_Trans/PCR%20Cloning%20Considerations.pdf
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. (2015). *TOPO TA Cloning Kit for Subcloning, with One Shot TOP10 chemically competent E. coli cells*. Recuperado 26 de abril de 2017, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K450040>
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. (2017a). *LB Broth and LB Agar*. Recuperado 8 de junio de 2017, a partir de

<https://www.thermofisher.com/ht/en/home/lifescience/cellculture/microbiological-culture/bacterial-growth-media/lb-broth-and-lbagar.html>

THERMO FISHER SCIENTIFIC. (2017b). *S.O.C. Medium*. Recuperado 8 de junio de 2017, a partir de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15544034>

Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., ... Gao, G. F. (2007). *Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark*. PLOS ONE, 2(6), e526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000526>

Universidad de Valencia. (2017). CALIBRACIÓN. Recuperado 11 de mayo de 2017, de <http://www.uv.es/gammm/Subsitio%20Operaciones/6%20Calibracion.htm>

Universo Porcino. (2005). Síndrome reproductivo y respiratorio porcino parte 3 Universo Porcino. Recuperado 10 de mayo de 2017, de http://www.aacporcinos.com.ar/porcinos_sistema_productivo/porcinos_s_sanidad/sindrome_reproductivo_y_respiratorio_porcino3.html

Valenzuela, M. (2016). Expresión y purificación parcial de la Metionina sulfóxido reductasa de *Arabidopsis thaliana*. Universidad de Jaén. Recuperado de <http://tauja.ujaen.es/handle/10953.1/3961>

VEGA, B., & VOLTOLINA, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. VEGA, BOA; VOLTOLINA, D.. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, 1, 17–25.

Yang, S. (2007). *New medical technique punches holes in cells, could treat tumors*. Recuperado 26 de abril de 2017, de http://www.berkeley.edu/news/media/releases/2007/02/12_IRE.shtml

Zhou, M.-Y., & Gomez, C. (2000). *Universal TA cloning*. Current issues in molecular biology, 2, 1–8.

Zimmerman, J., Benfield, D., Hennings, J., Dee, S., & Stevenson, G. (2015). *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) - eXtension*. Recuperado 10 de mayo de 2017, de <http://articles.extension.org/pages/27264/porcine-reproductive-andrespiratory-syndrome-prrs>

Anexos

ANEXO 1: SOLICITUD DE PERMISO PARA SALIDA DE MUESTRAS PARA SECUENCIACIÓN GENÓMICA EN EL EXTERIOR



Av. Eloy Alfaro N30-350 y Amazonas
Edif. MAGAP, Piso 9
Código Postal: 170510
Tel: (593) 2 2967 232
director@agrocalidad.gob.ec
www.agrocalidad.gob.ec

Oficio Nro. MAGAP-CDL/AGROCALIDAD-2017-000114-OF

Quito, D.M., 26 de junio de 2017

Asunto: SOLICITUD DE PERMISO PARA SALIDA DE MUESTRAS PARA SECUENCIACIÓN GENÓMICA EN EL EXTERIOR

Señor
Santiago Daniel Silva Lachard
Director Nacional de Biodiversidad
MINISTERIO DEL AMBIENTE
En su Despacho

De mi consideración:

Como es de su conocimiento la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD, entidad encargada de mantener y mejorar el estatus sanitario de los productos agropecuarios del país, con el objetivo de precautelar la inocuidad de la producción primaria y basándonos en nuestro compromiso nos encontramos realizando diagnóstico basado en la identificación del agente patógeno mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), técnica altamente sensible y específica. Con el desarrollo de estas técnicas de diagnóstico molecular se ha suministrado una valioso aporte para la detección temprana y precisa de plagas y patógenos de control obligatorio.

De la mano de estas técnicas, es de vital importancia corroborar el diagnóstico de enfermedades con la secuenciación de enfermedades en plantas y animales difíciles de diagnosticar, más aun cuando muchas de ellas son consideradas como exóticas para el país, ya que esto nos permitiría la identificación hasta especie y su caracterización filogenética. Dentro de una de las principales ventajas de la secuenciación es realizar la epidemiología molecular de los patógenos (virus, bacterias, parásitos y hongos) mediante la secuenciación de los nucleótidos permitiéndonos rastrear su origen, siendo esto especialmente importante en el caso de identificación de enfermedades epidémicas, en las que la posibilidad de localizar la fuente de infección puede contribuir de manera significativa a mejorar la lucha contra ellas. Por ejemplo en países hermanos se ha realizado el análisis molecular de los virus de la peste bovina ha sido fundamental para determinar los linajes que circulan por el mundo y ha sido de ayuda en el Programa mundial de erradicación de la peste bovina.

Siendo la técnica de secuenciación de gran apoyo en la eficacia de los programas de control de sanidad vegetal y animal, me permito solicitarle de la manera más comedida se nos extienda un permiso particular para realizar el envío frecuente de muestras de patógenos que afectan a la flora animal y vegetal para que se realice la secuenciación en laboratorios especializados del exterior. Con la oportuna identificación de estos patógenos no permitirá actuar de manera rápida y eficaz ante plagas cuarentenarias y exóticas para el país, esto le solicito en favor de resguardar el estatus zoo y fitosanitario del Ecuador.



Av. Eloy Alfaro N30-350 y Amazonas
Edif. MAGAP, Piso 9
Código Postal: 170519
Tel: (593) 2 2587 232
direccion@agrocalidad.gob.ec
www.agrocalidad.gob.ec

Oficio Nro. MAGAP-CDL/AGROCALIDAD-2017-000114-OF

Quito, D.M., 26 de junio de 2017

Cabe recalcar que el envío de este tipo de muestras (productos de PCR amplificados del ADN o ARNm de patógenos con cebadores específicos) no representa peligro para el ambiente y tampoco se está emitiendo información de la flora y fauna endémica del país.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Ing. Rusbel Antonio Jaramillo Chamba
COORDINADOR GENERAL DE LABORATORIOS ENCARGADO

Copia:

Señor
Alfonso Wilson Rojas
**Especialista en Recursos Genéticos - Dirección Nacional de Biodiversidad
MINISTERIO DEL AMBIENTE**

Señorita Ingeniera
María Daniela Reyes Barriga
**Especialista en Recursos Genéticos
MINISTERIO DEL AMBIENTE**

Señor Médico Veterinario Zootecnista
Julio Antonio Arana Onofre
Coordinador General de Sanidad Animal

Señor Doctor
Hugo Patricio Sandoval Valencia
Director de Diagnostico Animal Encargado

Señora Ingeniera
Ana Dolores Garrido Haro
Responsable de Laboratorio de Biología Molecular

mv/HS

