

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Construcción genética de una tecnología bioluminiscente para su uso potencial en el monitoreo de la propagación de bacterias patógenas

**Trabajo de graduación presentado por
Katherine Alessandra Girón Carranza
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial**

Guatemala,

2025

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Construcción genética de una tecnología bioluminiscente para su uso potencial en el monitoreo de la propagación de bacterias patógenas

**Trabajo de graduación presentado por
Katherine Alessandra Girón Carranza
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial**

Guatemala,

2025

Vo. Bo.

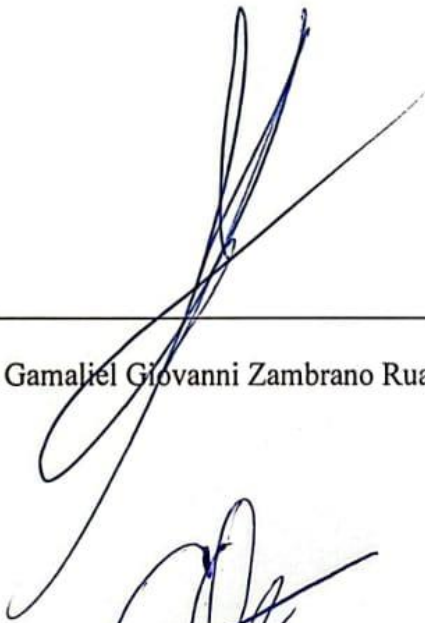
(f) 

Lic. Carlo Roberto Martínez Joachin

Terna examinadora

(f) 

Lic. Carlo Roberto Martínez Joachin

(f) 

Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano

(f) 

Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de febrero de 2025

PREFACIO

Primero que nada, quiero agradecer profundamente a Dios por orientarme poco a poco en el recorrido de convertirme en Ingeniera, que implicó salir de lo que conocía, mi hogar en Chiquimula y separarme de mis padres temporalmente. Para mí, Dios fue la esperanza y la ilusión para volver a empezar cada día, abriendo y cerrando puertas, demostrándome que el esfuerzo valía la pena. Reconozco los momentos difíciles en los que mis oraciones fueron escuchadas por Dios y la Virgen María, que me dieron su calor, y con ello fue posible seguir adelante para llegar hasta aquí.

También quiero agradecer a mis padres, que confiaron en mi desde el primer día, y se sacrificaron para verme crecer y prepararme profesionalmente. Los amo, gracias por darme la familia que me moldeó y en la que soy feliz. Mis logros son suyos. También incluyo un agradecimiento especial para mi hermano Eddie, que fue mi compañía y soporte durante estos cinco años, no lo habría logrado sin tu tiempo y amor demostrado en todo lo que hiciste por mí a diario, aunque te molestaras por levantarte a las 6 am para que me llevaras a hacer prácticas o trabajar en mi tesis. Por más vida y logros juntos hermano.

En mi trayectoria académica, quiero iniciar agradeciendo a mi Departamento, incluyendo al Ing. Zambrano e Ing. Núñez, quienes me enseñaron a pensar como Ingeniera. Gracias por todos sus conocimientos, instrucciones, consejos, por la confianza y fe que tuvieron en mí para prepararme como Ingeniera, además del apoyo atento en cada paso. Les expreso mi más sincera admiración y aprecio. En la asesoría de mi trabajo de graduación, le doy las gracias al Lic. Carlo Martínez, por su tiempo y orientación en base a sus conocimientos y experiencia, que me permitieron culminar satisfactoriamente mi trabajo. Gracias, además, por la confianza y amistad desde tercer año.

En el proceso de elaboración de mi trabajo de graduación y prácticas profesionales, agradezco infinitamente al Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala, por el espacio, recursos, tiempo y asesoría especiales, que fueron brindadas en todo momento. Especialmente a las licenciadas Patricia Herrera, María Fernanda Alarcón y Nina Figueroa, que estuvieron al tanto de mí y mi trabajo, para lograr el mejor resultado posible. No lo habría logrado sin su apoyo. Extiendo mi gratitud también hacia los licenciados Lizbeth Coax, Rodrigo Mejicanos y Adriana Gil, así como a las técnicas de laboratorio, Maritza De León y Leyda Hernández. Gracias por la paciencia, consejos y enseñanzas en laboratorio, que me ayudaron a ser mejor cada día. Además de eso, y no menos importante, agradezco mucho la amistad y momentos compartidos, que hacían de mis días de prácticas y tesis más divertidos y agradables; los voy a llevar conmigo siempre.

Agradezco profundamente también a la Dra. Patrizia Lupo, por su disponibilidad y apoyo para usar el microscopio de fluorescencia. Quien siempre se mostró a interesada y atenta, gracias por ayudarme a ver mi tesis brillar. Incluyo también, un agradecimiento especial a la Facultad de

Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, especialmente a Jacqueline Castillo, que amablemente me brindó una caja Petri con el cultivo que necesitaba para mi tesis.

No quiero dejar de agradecer a quienes me acompañaron día con día en esta aventura; con quienes compartí preocupaciones, inseguridades, logros, risas, chismes y memes. Celeste, Adriana y Eli, fueron las mejores compañeras de carrera y amigas que la vida me pudo dar, las quiero mucho y fue un gusto para mí crecer y aprender juntas. Qué sigan triunfando en la vida, tienen todo para lograrlo mis ingenieras.

Y para cerrar estos agradecimientos, quiero expresarme lo feliz que estoy por culminar esta etapa. Me debo lo que logré, a pesar de las dificultades y atrasos. Por mi resiliencia y perseverancia, en especial con el desafío que la tesis representó. Por forjarme, hacer cambios en mí y llegar hasta aquí. Estoy orgullosa de mí y de la profesional en la que me convertiré.

Y para recordármelo siempre,

¡Qué cueste lo que cueste!

ÍNDICE DE CONTENIDO

PREFACIO	V
LISTA DE CUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ECUACIONES	XII
RESUMEN	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
A. GENERAL	3
B. ESPECÍFICOS	3
III. JUSTIFICACIÓN	4
IV. MARCO TEÓRICO	5
A. Seguridad alimentaria	5
B. Hambre mundial.....	5
C. El papel de las plantas y sanidad vegetal	6
D. Cambio climático	7
E. Impacto de las plagas en la agricultura	8
F. Bacterias fitopatógenas	9
G. Situación nacional.....	14
H. Medidas químicas de control	15
I. Biosensores	15
J. Bioluminiscencia.....	16
K. Tecnología con bioluminiscencia.....	17
L. Ingeniería genética para organismos recombinantes	19
M. Vectores de expresión y clonación.....	20
N. Desarrollo de plásmidos para transformar bacterias	22
O. Clonación por enzimas de restricción.....	24
P. Transferencia horizontal de genes en bacterias.....	25
Q. Conjugación bacteriana.....	26
R. Recombinación homóloga	27
S. Riesgos relacionados con el uso de OMG (Organismos Genéticamente modificados)....	27

T.	Precauciones con el manejo de OMGs (Organismos Genéticamente modificados) en laboratorio	29
U.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	30
V.	Electroforesis	32
W.	PCR de colonia	33
X.	Sedimentación.....	33
Y.	Mecánica de sedimentación	35
Z.	Monitoreo de la sedimentación.....	37
	Balances de masa y energía teóricos.....	40
V.	ANTECEDENTES	41
VI.	METODOLOGÍA	43
A.	Diseño del experimento (fundamento estadístico).....	43
B.	Medios de cultivo y soluciones buffer	45
C.	Extracción y purificación de plásmido	51
D.	Transformación de <i>RS</i>	53
E.	Inoculación de <i>RS</i> en plantas de tomate.....	56
F.	Recuperación de células de <i>RS</i> de las plantas de tomate	59
VII.	RESULTADOS	64
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	67
IX.	CONCLUSIONES	73
X.	RECOMENDACIONES.....	74
XI.	ANEXOS	75
A.	Referencias.....	75
B.	Balances de masa y energía del proceso real	84
	84
C.	Incertidumbre.....	85
D.	Cálculos de muestra	85
E.	Datos originales del experimento.....	86
F.	Glosario.....	89
G.	Cuadros y figuras	92

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales cultivos de alto valor afectados por RS.....	10
Cuadro 2. Características de las razas y biovares de RS.	11
Cuadro 3. Antibióticos utilizados como marcadores de selección y concentración recomendada.	21
Cuadro 4. Formulación para medio CPG.	46
Cuadro 5. Formulación para medio LB.	48
Cuadro 6. Formulación para caldo SOC.....	49
Cuadro 7. Formulación para buffer de resuspensión.	50
Cuadro 8. Evaluación comparativa de opciones de plásmidos existentes para la expresión de bioluminiscencia	64
Cuadro 9. Conteo de colonias de bacterias recuperadas mediante centrifugación.	65
Cuadro 10. Mapa de electroforesis para productos de PCR de <i>RS</i>	86
Cuadro 11. Cuantificación y pureza de la extracción de plásmido.....	86
Cuadro 12. Cuantificación y pureza de extracciones de colonia.	87
Cuadro 13. Mapa de electroforesis para la integridad del plásmido.....	87
Cuadro 14. Mapa de electroforesis para productos del PCR ILUX.	87
Cuadro 15. Masa de las muestras de tallo de las plantas de tomate.	88
Cuadro 16. Datos de absorbancia para las células de <i>RS</i> recuperadas de las plantas de tomate. 88	
Cuadro 17. Parámetros de centrifugación para la recuperación de células de <i>RS</i> ILUX.....	88
Cuadro 18. Análisis de varianza de un factor y probabilidad realizado para datos de absorbancia obtenidos en la centrifugación.	89
Cuadro 19. Muestreo para verificar la presencia de RS en departamentos de Guatemala (Parte I).....	92
Cuadro 20. Muestreo para verificar la presencia de <i>RS</i> en departamentos de Guatemala (Parte II).....	93
Cuadro 21. Muestreo para verificar la presencia de RS en departamentos de Guatemala (Parte	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hambre mundial según el indicador de prevalencia de malnutrición para el período 2006-2022	6
Figura 2. Comparación de tipos de colonias de RS en medio sólido.....	12
Figura 3. Sintomatología de RS en plantas de papa y tomate.....	13
Figura 4. Prueba de exudado de RS proveniente de haces vasculares.....	13
Figura 5. ELISA tipo sándwich.....	14
Figura 6. Diagrama de las rutas metabólicas generadas por el operón <i>ilux</i>	17
Figura 7. Mapa de un plásmido.	22
Figura 8. Cronología sobre los avances en tecnología y diseño de vectores.	24
Figura 9. Clonación por enzimas de restricción	25
Figura 10. Proceso de la conjugación bacteriana.....	26
Figura 11. Tres fases de la reacción de PCR.....	31
Figura 12. Tres ciclos de amplificación de ADN en PCR	31
Figura 13. Verificación del producto de PCR en gel de electroforesis.	32
Figura 14. Curva de sedimentación ideal basada en la teoría de sedimentación de Kynch.....	36
Figura 15. Balance de masa y energía teórico.	40
Figura 16. Ubicación del hipocótilo en una planta.	58
Figura 17. Representación del sistema de filtración al vacío	61
Figura 18. Comprobación de la transformación genética de RS a partir de la expresión de bioluminiscencia.	64
Figura 19. Curva de sedimentación de células de <i>RS</i> extraídas del tallo de la planta de tomate. 65	
Figura 20. Tinción de Gram de la cepa <i>RS ILUX</i> recuperada mediante centrifugación.	66
Figura 21. Comprobación de la emisión de bioluminiscencia de las células de <i>RS ILUX</i> recuperadas de las plantas de tomate.	66
Figura 22. Balance de masa y energía real.	84
Figura 23. Cultivo de <i>RS</i> proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología de FAUSAC.	95
Figura 24. Gel de electroforesis de <i>RS</i> aislada.	95
Figura 25. Imagen con colores invertidos del gel de electroforesis de <i>RS</i> aislada.....	96
Figura 26. Vista frontal del invernadero destinado para la inoculación de <i>RS ILUX</i>	96
Figura 27. Vista lateral (1) del invernadero destinado para la inoculación de <i>RS ILUX</i>	97
Figura 28. Vista lateral (2) del invernadero destinado para la inoculación de <i>RS ILUX</i>	97
Figura 29. Vista trasera del invernadero destinado para la inoculación de <i>RS ILUX</i>	98
Figura 30. Desinfección de invernadero con equipo de aspersion.	98
Figura 31. Limpieza de invernadero con hidro lavadora.	99
Figura 32. Equipo de protección para desinfección de invernadero.....	99
Figura 33. Ingreso al área de invernadero.....	100
Figura 34. Tratamiento de residuos líquidos de bacteria transformada.	100
Figura 35. Tratamiento de residuos sólidos de bacteria transformada.....	101
Figura 36. Clasificación de residuos biopeligrosos.	101
Figura 37. Procedimiento de extracción de plásmido.....	102
Figura 38. Procedimiento de compatibilización de células de <i>RS</i>	102

Figura 39. Propagación de cultivos de RS y RS ILUX.	102
Figura 40. Propagación de cultivos de RS y RS ILUX	103
Figura 41. Rallado de raíces de la planta de tomate.	103
Figura 42. Plantas de tomate inoculadas con RS ILUX.	104
Figura 43. Tallo de planta de tomate diseccionado.....	104
Figura 44. Centrífuga Forma Scientific Inc.	105
Figura 45. Crecimiento de RS ILUX recuperada por centrifugación.	105
Figura 46. Centrífuga Fisher Scientific.....	106
Figura 47. Mapa del plásmido ilux pGEX(-).....	107
Figura 48. Mapa del plásmido pBBR1MCS-2.....	108
Figura 49. Mapa del plásmido pBEN276.	109
Figura 50. Descripción del plásmido ilux pGEX(-).....	110
Figura 51. Descripción del plásmido pBBR1MCS-2.	110
Figura 52. Descripción del plásmido <i>pBEN276</i>	111
Figura 53. Indicador de solicitudes del plásmido según proveedor.	111
Figura 54. Electroforesis para evaluar la integridad de la extracción de plásmido.	112
Figura 55. Electroforesis de los productos del PCR para comprobar la transformación de RS.	112
Figura 56. Electroforesis de los productos del PCR para comprobar la transformación de RS (colores invertidos)	113
Figura 57. Crecimiento de RS salvaje en medio CPG con ampicilina	113
Figura 58. Crecimiento observado de las células de RS recuperadas en un ensayo independiente.	114
Figura 59. Comprobación de la emisión de bioluminiscencia de las células de RS ILUX recuperadas de la planta de tomate (muestra 4)	114
Figura 60. Comprobación de la emisión de bioluminiscencia de las células de RS ILUX recuperadas de la planta de tomate (muestra 2).	115
Figura 61. Prototipo para el monitoreo en tiempo real del patógeno en planta.	115
Figura 62. Observación de bacterias luminiscentes con el prototipo desarrollado por INSA Lyon.	116

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Análisis del movimiento de una partícula que se sedimenta.....	33
Ecuación 2. Fuerza externa ejercida en una partícula.....	34
Ecuación 3. Fuerza debida a un campo centrífugo.	34
Ecuación 4. Fuerza de flotación.....	34
Ecuación 5. Fuerza de rozamiento.	35
Ecuación 6. Expresión simplificada que define el movimiento de una partícula	35
Ecuación 7. Ley de Beer-Lambert	38
Ecuación 8. Coeficiente de tiempo equivalente.	39
Ecuación 9. Extrapolación mediante tiempo equivalente.	39
Ecuación 10. Varianza.....	43
Ecuación 11. Factor F de análisis ANOVA,	44

RESUMEN

Las enfermedades de plantas generan pérdidas anuales de hasta 220 mil millones de dólares, según la FAO (2021). Entre los agentes fitopatógenos, *Ralstonia solanacearum* (*RS*) se identifica como la segunda bacteria más importante económicamente, afectando a más de 200 especies vegetales y causando pérdidas de hasta el 91% en cultivos de tomate. Esto subraya la necesidad de desarrollar estrategias innovadoras y sostenibles para su control.

En este contexto, el uso de genes bioluminiscentes, como el operón *luxCDABE*, emerge como una herramienta biotecnológica innovadora para monitorear en tiempo real la propagación de patógenos en plantas. El objetivo principal de este estudio fue desarrollar un constructo genético para inducir bioluminiscencia en *RS* y evaluar su utilidad como herramienta de monitoreo en cultivos de tomate. Se seleccionó el plásmido *ilux pGEX(-)* por su tamaño razonable (10,873 pb) y alta frecuencia de transformación mediante recombinación homóloga. La transformación genética de *RS* se realizó por choque térmico, verificándose mediante emisión de bioluminiscencia con microscopía de fluorescencia. Aunque no fue posible confirmar la transformación por PCR, posiblemente debido a la interferencia de ADN cromosomal.

Así mismo, se lograron recuperar células viables de *RS ILUX* de las plantas infectadas mediante centrifugación a 570 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se obtuvieron 8 UFC con una desviación estándar de 3.30 y un intervalo de confianza del 95% de ± 4.58 , sugiriendo consistencia en los resultados. La tinción de Gram confirmó la viabilidad celular, mientras que la emisión de bioluminiscencia en las células recuperadas se verificó al tercer día post inoculación.

Por último, se comprobó la emisión de bioluminiscencia de las células de *RS ILUX* recuperadas del tallo de plantas de tomate, utilizando un microscopio de fluorescencia, lo cual sugirió que es potencialmente aplicable el uso de la herramienta en el monitoreo de la propagación de *RS* en un cultivo de tomate. Más aún, la tecnología también podría ser aplicable en otros cultivos y en la industria alimentaria.

I. INTRODUCCIÓN

En 2022, entre 691 y 783 millones de personas enfrentaron hambre (FAO et al., 2024), un desafío global agravado por el cambio climático. Este fenómeno afecta los recursos naturales y fomenta la proliferación de plagas agrícolas, amenazando cultivos estratégicos como el tomate, cuya producción global alcanzó 186 millones de toneladas métricas en 2020. Entre las principales amenazas fitopatógenas se encuentra *Ralstonia solanacearum* (*RS*), una bacteria capaz de causar pérdidas de hasta el 91% en este cultivo (Makawa et al., 2024).

Ante esta problemática, es esencial desarrollar alternativas sostenibles para el manejo de fitopatógenos, evitando el uso intensivo de productos químicos. En este contexto, la bioluminiscencia bacteriana, basada en el operón *luxCDABE*, surge como una herramienta innovadora para monitorear en tiempo real la propagación de patógenos, sin necesidad de aditivos externos ni riesgos de fototoxicidad (Gregor et al., 2018).

La ingeniería genética proporciona el medio para modificar *RS* y lograr que exprese bioluminiscencia de manera natural (NIH, 2024). Esto se logra mediante la inserción del operón *luxCDABE*, transportado por un plásmido, que actúa como vector de expresión. Los plásmidos, moléculas circulares de ADN de doble hebra, son herramientas clave en biología molecular, ya que permiten la entrega y manipulación de ADN en células huésped (Tolmasky, 2013).

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un constructo genético para inducir bioluminiscencia en *RS* y evaluar su uso como herramienta para monitorear la propagación de la bacteria en cultivos de tomate. Para alcanzar este objetivo, se inició con la selección de un plásmido adecuado para la transformación genética de *RS*. Los plásmidos fueron evaluados con base en sus componentes genéticos, considerando el tamaño molecular, el origen de replicación, el gen de inserción y el método de transformación requerido. Una vez seleccionado el plásmido, se procedió a la transformación genética de *RS* mediante el método de choque térmico, para promover la inserción del operón *luxCDABE* en la bacteria.

La comprobación de la inserción del operón en *RS* se realizó mediante dos técnicas principales: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y observación de bioluminiscencia bajo un microscopio de fluorescencia. Posteriormente, para evaluar la funcionalidad de la bacteria transformada, se inocularon plántulas de tomate en un invernadero aislado. Se promovió el avance de la infección durante un periodo de tres días, tras el cual se recuperaron células de *RS* de los tallos infectados mediante centrifugación a 570 rpm, 4 °C, durante cinco minutos.

Las células recuperadas se evaluaron para determinar su viabilidad a través de conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y tinción de Gram. Finalmente, la emisión de bioluminiscencia fue confirmada nuevamente mediante microscopía de fluorescencia, utilizando un filtro azul (490 nm) para aislar el fondo lumínico ambiental. Este procedimiento permitió validar la funcionalidad del

constructo genético y su potencial aplicación en el monitoreo de la propagación de *RS* en cultivos de tomate.

Los resultados indicaron que la transformación de *RS* fue exitosa, comprobada por la emisión de bioluminiscencia observada bajo el microscopio de fluorescencia. Sin embargo, no se pudo confirmar la inserción del operón mediante PCR, posiblemente debido a la interferencia de ADN cromosomal copurificado en el proceso de extracción del plásmido. De igual forma, se confirmó que las células de *RS* recuperadas del tallo de plantas de tomate al tercer día después de la inoculación emitieron bioluminiscencia, lo que valida el uso potencial de esta herramienta en estudios futuros. Así también, el análisis del equipo necesario sugirió que esta tecnología es viable para aplicaciones en sanidad vegetal y en la industria agroalimentaria.

En conclusión, esta investigación demuestra que la tecnología basada en bioluminiscencia bacteriana tiene el potencial de contribuir al monitoreo de patógenos en cultivos, ofreciendo una alternativa para el manejo de enfermedades agrícolas y el reforzamiento de los sistemas agroalimentarios.

II. OBJETIVOS

A. GENERAL

- Desarrollar un constructo genético mediante la inducción de bioluminiscencia en *Ralstonia solanacearum*, para proponer una herramienta potencial en el monitoreo de su propagación en un cultivo de tomate.

B. ESPECÍFICOS

- Evaluar los componentes genéticos de plásmidos existentes para la expresión de bioluminiscencia, con la finalidad de seleccionar una opción adecuada para la transformación de *R. solanacearum*.
- Transformar la cepa de *R. solanacearum* mediante choque térmico y comprobar el procedimiento a partir de PCR, con la finalidad de inducir la expresión de bioluminiscencia en la cepa respectiva.
- Extraer células de *R. solanacearum* transformada de un cultivo de tomate mediante centrifugación, y evaluar su viabilidad realizando tinción de Gram y conteo de colonias en placa, para recuperar la mayor concentración de células viables.
- Comprobar la emisión de bioluminiscencia de las células de *R. solanacearum* recuperadas, utilizando un microscopio de fluorescencia, con la finalidad de analizar su uso potencial en el monitoreo de su propagación en un cultivo de tomate.

III. JUSTIFICACIÓN

La suficiencia y seguridad alimentaria son desafíos cruciales del siglo XXI, agravados por el crecimiento poblacional y la reducción de la tierra cultivable *per cápita*, que pasó de 0.45 ha en 1961 a 0.21 ha en 2016 (FAO, 2022). Las plantas, como base del sistema alimentario, desempeñan un papel esencial en este contexto. Sin embargo, el cambio climático está exacerbando la proliferación de agentes patógenos que afectan cultivos estratégicos, amenazando aún más la seguridad alimentaria. Según la FAO, cada año se pierde más del 40% de la producción agrícola mundial debido a plagas, lo que equivale a 220,000 millones de dólares en pérdidas económicas. Estas condiciones, como el calentamiento global, favorecen el establecimiento y expansión de patógenos destructivos.

Ralstonia solanacearum (*RS*), se identifica como la segunda bacteria fitopatógena más importante en términos económicos y científicos (Mansfield et al., 2012), infecta más de 200 especies vegetales, incluyendo cultivos de alto valor económico como papa, banano, tomate y jengibre. En el caso del tomate, cuya producción global alcanzó 186 millones de toneladas métricas en 2020, la marchitez bacteriana causada por *RS* puede generar pérdidas de hasta el 91% en casos severos (Makawa et al., 2024). Estas cifras subrayan la necesidad de estrategias innovadoras para mitigar su impacto.

Las soluciones actuales para combatir los agentes patógenos de plantas se basan en el uso de agentes químicos, que pueden influir fuertemente en la generación de resistencia a antibióticos. (Makawa, y otros, 2024). La resistencia a antibióticos se reconoce como uno de los desafíos más serios para la salud pública mundial de este siglo, lo que a su vez, plantea un riesgo alto para la seguridad alimentaria (Li, y otros, 2024). Para el 2050, se estima una pérdida de USD 100 trillones en productividad agrícola a nivel mundial debido al desarrollo de resistencia a antibióticos (Miller, Ferreira, & LeJeune, 2022).

En línea con la visión de la FAO de promover sistemas agroalimentarios más sostenibles (FAO, 2021), comprender el desarrollo biológico de los patógenos resulta crucial para prevenir infecciones y reducir la dependencia de productos químicos. Una alternativa prometedora es el uso de genes bioluminiscentes como herramienta biotecnológica para monitorear en tiempo real la propagación de patógenos en cultivos. Por ejemplo, en su estudio, Xu et al. (2022) desarrollaron una cepa bioluminiscente de *RS* que permitió monitorear espacialmente la infección en tomate y *Arabidopsis*, abriendo nuevas posibilidades para la investigación fitopatológica.

Este estudio buscó implementar una tecnología bioluminiscente basada en el operón *luxCDABE* para inducir bioluminiscencia en *RS*, evaluando su utilidad en el monitoreo de la bacteria en cultivos de tomate. Dado el impacto económico de este cultivo y la relevancia de *RS*, esta herramienta tiene el potencial de transformarse en una estrategia clave para mejorar los sistemas agroalimentarios, con aplicaciones futuras en el control de diversas bacterias fitopatógenas.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Seguridad alimentaria

La seguridad alimentaria se alcanza cuando todas las personas, todo el tiempo, poseen acceso a alimentos suficientes, seguros, asequibles y nutritivos para una dieta saludable. La ONU identifica cuatro pilares clave en la definición de salud alimentaria, que son la disponibilidad; acceso tanto económico como sociocultural, utilización; incluida la preparación e inocuidad de los alimentos, y por último, la estabilidad de estos tres pilares (Rizzo, Lichtveld, & Mazet, 2021). Desde las últimas décadas, la demanda de alimentos está aumentando debido a una serie de cambios demográficos y poblacionales: crecimiento y cambios en la estructura de la población, así como crecimiento del consumo y urbanización. La satisfacción de dicha demanda está potencialmente limitada por la capacidad de carga de la Tierra, el cambio climático y los recursos naturales disponibles, lo cual determina la necesidad de que la agricultura sea más sostenible (Benton, 2017).

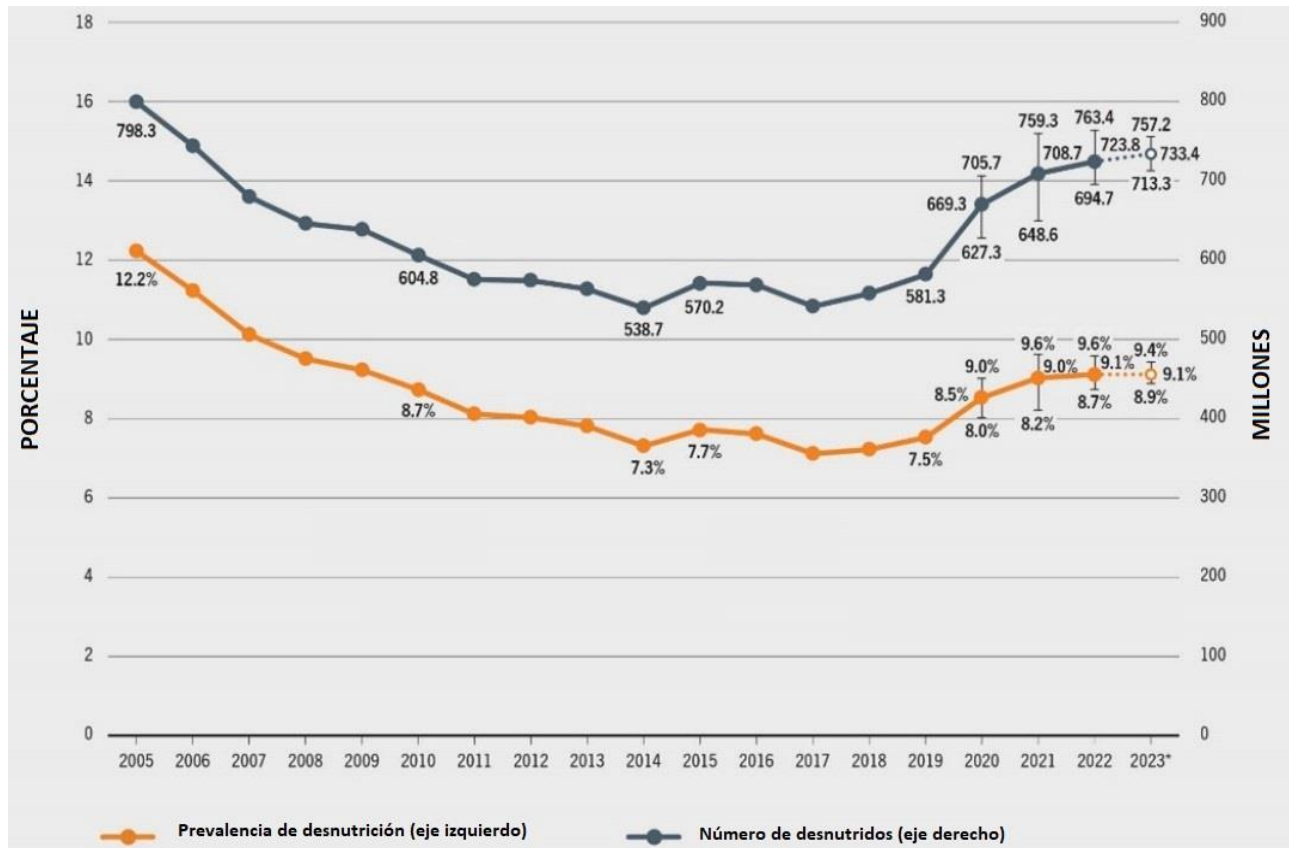
Los sistemas agrícolas actuales que simplemente se enfocan en la producción y el aumento del rendimiento, no permitirán asegurar automáticamente la seguridad alimentaria global, dado que existen muchos factores sociales, ecológicos, culturales y económicos que impiden el aumento de alimentos disponibles en alimentos accesibles, de alta calidad, nutritivos y estables. Desde la perspectiva de producción, es importante aumentar los rendimientos, sin embargo, de forma equivalente lo es asegurar que la producción sea resiliente y sostenible, y que provea de alimentos seguros y nutritivos (FAO, 2021).

B. Hambre mundial

El ODS 2 busca poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y mejorar la nutrición para todas las personas, especialmente las más vulnerables, mediante el acceso a una alimentación adecuada durante todo el año (Naciones Unidas, 2024). La evaluación del hambre mundial en el 2023, medido a partir del indicador 2.1.1 (FAO, 2022), reveló que, después de aumentar drásticamente entre 2019 y 2021, los niveles de hambre se han mantenido casi al mismo nivel durante tres años consecutivos. Como se muestra en la figura 1, la proporción de la población mundial que padecía de hambre en 2023 fue de 9.1%, comparado con 7.5% en el 2019 (FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO, 2024).

Se estimó que, en el 2023, a nivel mundial el hambre afectó entre 713 y 757 millones de personas, correspondientes al 8.9 y 9.4 por ciento de la población mundial, respectivamente. Considerando el promedio de estos valores (alrededor de 733 millones), aproximadamente 152 millones de personas más padecieron de hambre en el 2023, en comparación con el año 2019, antes de pandemia (FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO, 2024).

Figura 1. Hambre mundial según el indicador de prevalencia de malnutrición para el período 2006-2022



Fuente: (FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO, 2024).

Las tendencias a nivel regional son considerablemente variables; el hambre sigue aumentando en África, mientras que Asia no ha presentado cambios significativos, y se han observado cambios notables en América Latina. De 2022 a 2023, el hambre aumentó en el Occidente de Asia, el Caribe y en la mayoría de las subregiones de África (FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO, 2024).

C. El papel de las plantas y sanidad vegetal

El desafío de alcanzar la seguridad alimentaria en la actualidad, así como para generaciones futuras, depende de las plantas; puesto que son, y continuarán siendo para siempre, la base del sistema alimentario (Benton, 2017). Las plantas proporcionan más del 80% de los alimentos consumidos por los seres humanos, y son la principal fuente de nutrición para el ganado. Por otro lado, la seguridad alimentaria exige una compleja cadena de valor que incluye producción, elaboración y distribución y acceso a los alimentos, lo cual inicia por la sanidad vegetal en el campo. La sanidad vegetal es vital para mantener la salud humana y animal, y es un componente crítico de las complejas interacciones entre el medio ambiente, los seres humanos y los animales. Así mismo, el mantenimiento de la sanidad vegetal tiene consecuencias importantes para la salud

humana y animal como importante impulsor de la seguridad e inocuidad de los alimentos, fuente de medios de subsistencia en la agricultura basada en plantas, fuente de productos farmacéuticos y como parte de entornos saludables (Rizzo, Lichtveld, & Mazet, 2021).

1. Problemas y riesgos asociados a la sanidad vegetal

Las enfermedades y plagas de las plantas a menudo amenazan su disponibilidad y seguridad para el consumo humano y animal. Reducen el rendimiento de los cultivos básicos hasta un 30% a nivel mundial, con pérdidas económicas globales en el orden de cientos de miles de millones de dólares. Por otro lado, las enfermedades transmitidas por alimentos contribuyen a una carga global de 600 millones de personas al año, por lo que son potenciales portadores de patógenos de humanos y toxinas microbianas dañinas (Rizzo, Lichtveld, & Mazet, 2021).

Pese a la existencia de normas internacionales como el Codex Alimentarius, que establece la protección de la salud de los consumidores y el comercio justo, las enfermedades transmitidas por alimentos afectan hoy en día a países de ingresos altos, medios y bajos. Las plantas se convierten en orígenes importantes de brotes, al ser lavadas o expuestas a agua y suelos contaminados con patógenos. Más del 51% de los brotes alimentarios en EE. UU. en un período de 10 años se rastrearon a alimentos vegetales contaminados con patógenos de origen humano o animal (Rizzo, Lichtveld, & Mazet, 2021).

D. Cambio climático

Diversos hechos relacionados con el clima, océanos y los ecosistemas demuestran que el clima de la Tierra está cambiando; entre estos, el cambio en los patrones de temperatura y precipitación, aumento en el nivel y acidez del mar, el derretimiento de glaciares, cambios en la frecuencia, intensidad y duración de fenómenos meteorológicos; cambios en las características del ecosistema, como la época de floración y migración de las aves (United States Environmental Protection Agency, 2024).

El efecto invernadero se basa en el atrapamiento del calor proveniente del sol, que es un proceso natural y necesario para sostener la vida en la Tierra. Sin embargo, desde 1950 se ha producido la mayor cantidad de calentamiento, debido a la acumulación de gases de efecto invernadero en la atmósfera (United States Environmental Protection Agency, 2024), lo cual es consecuencia de las actividades humanas como la quema de combustibles fósiles, deforestación, producción industrial, agricultura intensiva, descomposición de residuos, ganadería, entre otras (Naciones Unidas, 2024). En estas actividades, se liberan a la atmósfera los principales gases de efecto invernadero, siendo el dióxido de carbono el más abundante, seguido por el metano, óxido nitroso y gases halogenados (Center for climate and energy solutions, 2024).

Guatemala es uno de los 10 países más vulnerables al cambio climático y desastres naturales relacionados, lo cual aumenta al menos diez veces el riesgo de inseguridad alimentaria del país. El cambio climático y los fenómenos meteorológicos extremos reducen la productividad de siembra y cosecha (Zhang & Janoch, 2023). Por otro lado, los sectores afectados también enfrentan una brecha salarial, que los lleva a limitar el consumo de alimentos. Según un informe de CARE Guatemala (2023), después que los huracanes ETA, IOTA y Julia azotaran el país durante los años 2020 a 2022, el 96% de las familias entrevistadas enfrentaron desafíos para alimentarse adecuadamente y el 18% consumió dos o menos comidas días. Además, de estos el 31% notó impactos en los cultivos, el 11% informó escasez de semillas y el 33% reportó pérdida de cultivos debido a las lluvias. Esto refleja los escenarios que causan inseguridad alimentaria en el país (Soto, López, Ramírez, González, & Quemé, 2023).

El Corredor Seco Centroamericano, por ejemplo, representa otra zona altamente vulnerable a eventos climáticos extremos. En esta franja de territorio viven más de 10 millones de personas, muchas de las cuales se dedican especialmente a la pequeña producción de granos básicos. La ocurrencia de largos períodos de sequía seguido de lluvias intensas afecta fuertemente la seguridad alimentaria de las poblaciones locales. El 80% de los pequeños productores viven en pobreza, por lo que muchas personas se ven obligadas a migrar (FAO, 2021).

El Acuerdo de París (Naciones Unidas, 2015) sugirió que la mitigación del cambio climático para limitar la temperatura de calentamiento a 1.5 °C o menos de 2 °C debe basarse en el despliegue de medidas relacionadas con el suelo; por ejemplo, forestaciones o producción de bioenergía. Sin embargo, según Fujimori *et al.* (2018) esto puede aumentar los precios de los alimentos, lo cual plantea problemáticas relacionadas con la seguridad alimentaria.

El apoyo a la seguridad alimentaria a través de asistencia internacional, impuestos bioenergéticos, o la reasignación nacional de ingresos puede proteger a las personas empobrecidas y vulnerables de los riesgos adicionales del hambre. En la ausencia de tal apoyo, para el 2050, 35% más de la población estará en riesgo de padecer hambre (aproximadamente 84 millones de persona), en un escenario consistente de 2 °C (Fujimori, y otros, 2018).

E. Impacto de las plagas en la agricultura

Al menos el 40% de los cultivos destinados a la alimentación se pierden cada año a causa de plagas y enfermedades de las plantas, lo cual asciende a una pérdida anual de \$220, 000 millones. Además, la FAO advierte que su propagación aumenta cada vez más a causa del cambio climático, lo que facilita que se expandan más allá de sus territorios habituales (FAO, 2021). Esto sucede debido a que el calentamiento global proporciona condiciones óptimas de temperatura para la proliferación del patógeno. Los factores ambientales afectan tanto a las plantas como a los patógenos. En el caso de las plantas, sus vías de resistencia, incluida la desencadenada por efectores, interferencia de ARN y redes de hormonas defensa. En el caso del patógeno, los

mecanismos de virulencia, así como la reproducción y supervivencia, están influenciados por la temperatura y humedad (Velásquez, Castroverde, & Yang, 2018).

F. Bacterias fitopatógenas

Actualmente, las bacterias causan una amplia variedad de enfermedades en las plantas en todo el mundo. En este contexto, estos microorganismos se denominan bacterias fitopatógenas, las cuales infectan a las plantas colonizando su superficie o tejidos, y causan síntomas como manchas, tizón, antracnosis, pudrición de tejidos, desequilibrios hormonales que conducen al crecimiento excesivo de las plantas, o bien, retraso en el crecimiento, ramificación de las raíces y epinastia de las hojas, entre otros (Martins, Merfa, & De Souza, 2018). La mayoría de las bacterias fitopatógenas se desarrollan principalmente como organismos parásitos en las plantas hospederas y parcialmente como saprófitos en el suelo (Cano, 2006).

Las estrategias de sobrevivencia de las bacterias fitopatógenas en la planta huésped y el medio ambiente, incluyen el desarrollo de resistencia frente a antimicrobiano, el uso de bombas de eflujo para desintoxicar la célula, la formación de esporas en el caso de las bacterias grampositivas, el uso de proteínas efectoras para alterar la fisiología de la planta y suprimir sus mecanismos de defensa, la formación de *biofilms* y de células persistentes. Para alcanzar la seguridad alimentaria global, es fundamental incluir la mitigación de estas estrategias de sobrevivencia en el desarrollo e implementación de técnicas para reprimir a las bacterias fitopatógenas (Martins, Merfa, & De Souza, 2018).

1. *Ralstonia solanacearum*

a. Importancia

Ralstonia solanacearum (RS) ocupa el segundo lugar entre las 10 bacterias fitopatógenas más importantes para las enfermedades de plantas, desde el punto de vista científico y económico, afectando a más de 200 especies de plantas en todo el mundo. En el cuadro 1 se enlistan algunos de los principales cultivos de alto valor susceptibles a RS (García, Kerns, & Thiessen, 2019).

Cuadro 1. Principales cultivos de alto valor afectados por RS

Nombre común	Nombre científico	Enfermedad común
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>	Marchitez de Granville
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Marchitez bacteriana
Papa	<i>Solanum tuberosum</i>	Marchitez bacteriana o pudrición marrón
Pimiento	<i>Capsicum spp.</i>	Marchitez bacteriana
Berenjena	<i>Solanum melongena</i>	Marchitez bacteriana
Banano	<i>Musa spp.</i>	Enfermedad de Moko
Olivo	<i>Olea europaea</i>	Marchitez bacteriana
Jengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Marchitez bacteriana
Geranio	<i>Pelargonium spp.</i>	Marchitez del sur
Mora	<i>Morus spp.</i>	Marchitez bacteriana
Maní	<i>Arachis hypogaea</i>	Marchitez bacteriana

Fuente: (García, Kerns, & Thiessen, 2019).

El tomate, *Solanum lycopersicum*, es uno de los cultivos de mayor valor económico, solo superado por la papa. Posee un valor nutricional alto, debido a su contenido vitamínico, en minerales y compuestos bioactivos. Además, los tomates están asociados con la prevención de enfermedades crónico-degenerativas. Por ello, el tomate es mundialmente reconocido como un alimento saludable, lo cual se refleja en un aumento global de su producción y consumo. A nivel mundial, la producción de tomate alcanzó los 186 millones de toneladas métricas en 2020 (Makawa, y otros, 2024).

Sin embargo, el cultivo de tomate enfrenta desafíos como la selección de cultivares, las prácticas de manejo, enfermedades, plagas y estrés abiótico (Makawa, y otros, 2024). La marchitez causada por *RS* representa una potencial amenaza para los cultivos de tomate; en casos severos, causando pérdidas de hasta del 91% (Li, y otros, 2024).

b. Taxonomía

RS es un miembro del grupo II con homología de ARNr a pseudomonas no fluorescentes. Pertenece al filo, Proteobacteria; clase, β - Proteobacteria; Orden, Burkholderiales; Familia, Burkholderiaceae (García, Kerns, & Thiessen, 2019). Se trata de una bacteria Gram negativa.

c. Rango de huéspedes y biovares

Las cepas bacterianas de *RS* se clasifican en niveles de subespecie o intraespecie, conocidos como biovares y razas, específicamente; esto en función de la especificidad del huésped al que infectan (García, Kerns, & Thiessen, 2019). Se describen brevemente en el cuadro 2 las razas reportadas, sus huéspedes principales, distribución geográfica y biovares (Champosieau & P, 2009).

Cuadro 2. Características de las razas y biovares de *RS*

Raza	Huéspedes Principales	Distribución Geográfica	Biovar
1	Largo (tabaco, tomate, malezas solanaceous y nonsolanaceous, diploid bananos, cacahuete, papa, pimentón, berenjena, olive, jengibre, fresa, geranio, Eucaliptos, otras plantas...)	Asia, Australia, Américas	3, 4, 1
2	Banano triploid, otra <i>Musa</i> spp.	Caribe, Brasil, Filipinas	1
3	Papas y Tomates	Mundial excepto en los Estados Unidos y Canadá	2 (or 2A)*
4	Jengibre	Australia, China, Hawai, India, Japón, Mauritius, Asia del Sur	4,
	Desconocido	India	3
5	Árbol de Moras	China	5

* Cepas típicas de la raza 3 algunas veces son referidas a biovar 2A. Nuevas cepas de raza 3 de la cuenca del Amazonas han sido colocadas en un nuevo biovar, diseñado como 2T o N2 (su relación a las razas no es muy clara).

Fuente: (Champosieau & P, 2009).

d. Descripción del microorganismo

RS es una bacteria aeróbica gramnegativa, con forma de bacilo y un tamaño de 0.5-0.7 µm x 1.5-2.0 µm. Es sensible a la desecación y su crecimiento se inhibe con concentraciones bajas (2%) de cloruro de sodio (NaCl). Su temperatura de crecimiento óptima está entre 28 °C y 32 °C. En cultivo de medio sólido de agar, se observa crecimiento de las colonias bacterianas después de 36 a 48 h, y son distinguidas dos tipos de colonias (Figura 2) a partir de su morfología: de tipo normal o virulento que son blancas o color crema, irregulares, fluidas y opacas; y las de tipo mutante o no virulentas que son uniformes y más pequeñas (Champosieau & P, 2009).

Figura 2. Comparación de tipos de colonias de *RS* en medio sólido



Foto 13. Colonias virulentas (abajo) y no virulentas (arriba) de *R. solanacearum* en un medio de crecimiento (CPG agar).
(Foto cortesía de P. Champosieau, Universidad de Florida)



Photo 14. Colonias virulentas de *R. solanacearum* en TZC medio de cultivo de agar.
(Foto cortesía de P. Champosieau, Universidad de Florida)

Fuente: (Champosieau & P, 2009).

e. Ciclo de enfermedad

RS infecta principalmente a través de las raíces, penetrando por heridas en las raíces laterales, o bien, por el posible daño de raíz causado por los nemátodos. También puede penetrar en plantas a través de heridas en los tallos, ocasionadas por insectos o humanos. En el caso de la raíz, una vez que la infección ocurre, las bacterias se propagan mediante el sistema vascular de la planta; un proceso que se acelera a partir de temperatura más altas. La bacteria se distribuye en los tejidos de forma vertical u horizontal (Champosieau & P, 2009).

RS se dispersa principalmente a través del suelo, en donde es capaz de sobrevivir por largos períodos de tiempo, incluso años (Champosieau & P, 2009); además es posible su transmisión por agua. Los tubérculos infectados de semilla de papa y cortes de geranio son capaces de diseminar efectivamente la bacteria, especialmente durante infecciones latentes. No se ha registrado la diseminación por semillas de tomate (Champosieau & P, 2009).

f. Sintomatología

Es importante identificar la causa de marchitez, ya que otros patógenos como *fusarium*, *Sclerotim*, *Phytophthora* y *Meloidogyne* pueden provocar marchitez en solanáceas. La marchitez es el primer síntoma externo visible en el follaje y tallos jóvenes, en un lapso de 2-3 días después de la infección. Las hojas cuelgan flácidamente, se enrollan hacia la cara superior y carecen de brillo y

turgencia, como se observa en la figura 3. A diferencia de la marchitez causada por *fusarium*, mantienen la planta mantiene el color verde característico (Mendoza, Ortega, Aragón, & Villeda, 2018).

Figura 3. Sintomatología de *RS* en plantas de papa y tomate



Foto 1a. Sintoma de podredumbre parda de la papa causado por *R. solanacearum* mostrando marchitamiento de las hojas mas jóvenes de la planta.
(Foto cortesía de D.P. Weingartner – Universidad de Florida, Hastings)



Foto 1b. Sintoma de marchitez bacteriana del tomate causada por *R. solanacearum* mostrando marchitamiento de las hojas en los extremos de la rama de la planta.
(Foto cortesía de Clemson University - USDA Cooperative Extension Slide Series, Bugwood.org)

Fuente: (Champosieau & P, 2009).

La formación de colonias bacterianas en los haces vasculares provoca una coloración café en la parte interna de los tejidos, y en las raíces próximas al suelo. El síntoma es más evidente en la base del tallo (Mendoza, Ortega, Aragón, & Villeda, 2018). Un diagnóstico simple comúnmente realizado consiste en cortar el tallo en secciones y sumergirlo dentro de agua clara, como se muestra en la figura 4. El indicio de la infección por *RS* se demuestra al observar una baba viscosa blanca que sale del extremo cortado del tallo, que representa el exudado bacteriano que sale de los haces vasculares (Champosieau & P, 2009).

Figura 4. Prueba de exudado de *RS* proveniente de haces vasculares

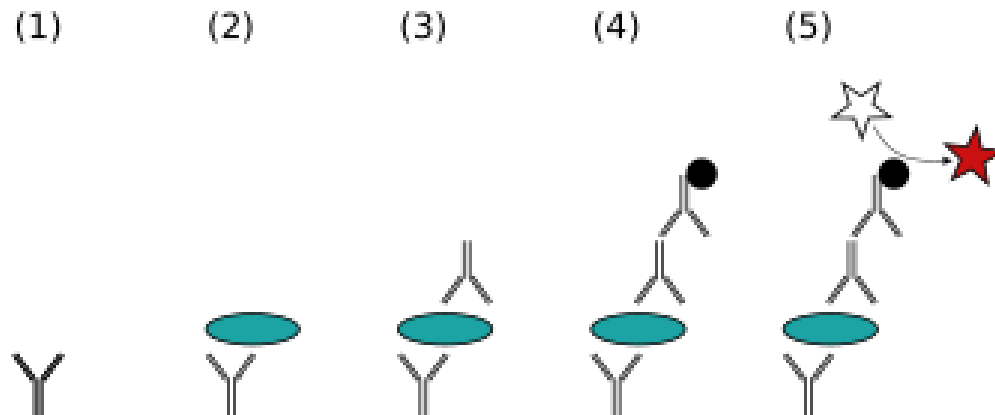


Fuente: (Champosieau & P, 2009).

g. Detección

Se usa la técnica ELISA, cuyo acrónimo en inglés significa inmunoanálisis enzimático, para detectar las bacterias patógenas de forma rápida y confiable, ya que permite estimar su concentración en el tejido enfermo y tolera materia extranjera en la muestra. El ensayo denominado sándwich de doble anticuerpo es el más utilizado comúnmente; la figura 5 ilustra su procedimiento. Primero se recubre una placa con un anticuerpo específico (1), luego se añade la muestra con bacterias fitopatógenas, y estas reaccionan con los anticuerpos adheridos (2). Después se agrega un segundo anticuerpo marcado con una enzima (4), que también reconoce a la bacteria (3). Finalmente, se introduce un sustrato que reacciona con la enzima para producir un cambio detectable (5), en la coloración del medio, por ejemplo, cuya intensidad es proporcional a la concentración de bacteria presente en la muestra (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2008).

Figura 5. ELISA tipo sándwich



Fuente: (Wikipedia, 2024).

G. Situación nacional

Dos bacterias de importancia fitosanitaria y económica en Guatemala, *Ralstonia solanaceum*(RS) y *Clavibacter Michiganensis* (CM) infectan el cultivo de tomate propagándose a través de los haces vasculares. Además, también infectan plantaciones de chile. En los últimos años, en los diferentes valles productores de tomate en Guatemala, la marchitez bacteriana causada por RS se ha incrementado a tal punto que en algunos valles ya no es posible hacer siembras de tomate. Los muestreos ejecutados por FASAGUA para la identificación y determinación de la presencia de la RS, indicaron la presencia del patógeno en los departamentos de Baja Verapaz, Jutiapa, Jalapa, Santa Rosa, Guatemala y Chiquimula; obteniendo resultados positivos para 79 de 434 muestras (Cuadro 20-22, Sección Anexos) (Mendoza, Ortega, Aragón, & Villeda, 2018). A continuación, se detalla más acerca de las características de ese patógeno y la enfermedad que causa.

En el caso de *CM*, la enfermedad que causa en la planta se conoce como cáncer o cancro bacteriano, y se trata de un bacilo grampositivo. La bacteria también afecta la importación de semillas de tomate, al encontrarse tanto en la testa como en el embrión, en donde se estima que puede vivir hasta 10 años (Álvarez, 2014).

H. Medidas químicas de control

Las soluciones actuales para combatir los agentes patógenos de plantas se basan en el uso de pesticidas químicos; sin embargo, aunque el uso de pesticidas químicos resulte temporalmente efectivo, plantea amenazas para la salud humana y microorganismos beneficiosos del suelo (Makawa, y otros, 2024). Otra práctica común que implica la introducción de químicos en el suelo, como los antibióticos, es la suplementación para estimular el crecimiento de las plantas (Li, y otros, 2024).

A su vez, debido a esta creciente aplicación de antibióticos; así como a su disposición subsecuente como efluentes, estiércol o fuentes de agua en tierra para actividades agrícolas, los ecosistemas de agricultura actuales se han identificado como escenarios ideales para la adquisición y diseminación de genes de resistencia a antibióticos en poblaciones microbianas. Además, estudios actuales han demostrado que otras prácticas agrícolas, incluyendo la aplicación de fungicidas y fumigantes puede contribuir a la generación de resistencia a antibióticos en poblaciones microbianas (Li, y otros, 2024).

I. Biosensores

Desde un enfoque distinto, la solución para combatir los agentes patógenos de plantas debe iniciar con un entendimiento biológico del desarrollo del patógeno en su ecosistema, con el objetivo de prevenir infecciones; y de la mano con esto, desarrollar nuevas técnicas de control efectivas y respetuosas con el medio ambiente, en lugar de simplemente seguir fortaleciendo la lucha a base de productos químicos (INSA Lyon, 2022).

Las herramientas convencionales para el monitoreo de la enfermedad de la planta en tiempo real presentan limitantes, por ejemplo, la disección impide un estudio a largo plazo de la propagación bacteriana. Por otro lado, el diagnóstico visual no permite correlacionar adecuadamente los síntomas visibles con el progreso del patógeno, ya que las bacterias pueden estar presentes antes de cualquier signo o síntoma aparente (INSA Lyon, 2022).

Un biosensor es un dispositivo que mide reacciones biológicas o químicas mediante la generación de señales proporcionales a la concentración del analito de la reacción. Actualmente los biosensores se utilizan para el monitoreo y detección de microorganismos causantes de enfermedades, en áreas como investigación biomédica, control de alimentos, o aplicaciones medio

ambientales; también se emplean para el descubrimiento de drogas y detección de contaminantes (Bhalla, Jolly, Formisano, & Estrela, 2016).

Mutka et al. (2016) establecieron que el monitoreo de los patógenos en tiempo real mediante enfoques de fenotipado basado en imágenes, permite una caracterización multidimensional de las interacciones huésped-microbio, y son capaces de capturar información espacial y temporal clave para entender el progreso de la infección de los patógenos. Se explica en apartados posteriores, la implementación de una tecnología como tal, a partir de la emisión de bioluminiscencia y su comparación con el uso de métodos de fluorescencia.

J. Bioluminiscencia

1. Principios y ocurrencia en la naturaleza

La reacción de bioluminiscencia es catalizada por una enzima denominada luciferasa, que requiere luciferina como sustrato. Las moléculas de luciferina se convierten en un producto que se encuentra en un nivel electrónicamente excitado, que después de emitir un fotón de luz visible, regresa al estado original (Gregor, Gwosch, Sahl, & Hell, 2018).

Una gran variedad de animales y microorganismos son capaces de generar bioluminiscencia; cualidad que ha evolucionado por lo menos 40 veces de forma independiente, y que se demuestra a partir de las diferentes moléculas de luciferasa y luciferina que existen (Gregor, Gwosch, Sahl, & Hell, 2018). Se pueden encontrar ejemplares de bacterias, como *Vibrio fischeri* y *Photobardus luminiscens*, hongos; *Omphalotus nidiformis* y *Panellus stipticus*, cnidarios; *Renilla reniformis*, crustáceos; *Gaussia princeps*, entre otros organismos (Wei & Wang, 2019). Este fenómeno ocurre en los organismos con propósitos de comunicación, depredación, defensa y emparejamiento (Tsarkova, 2021).

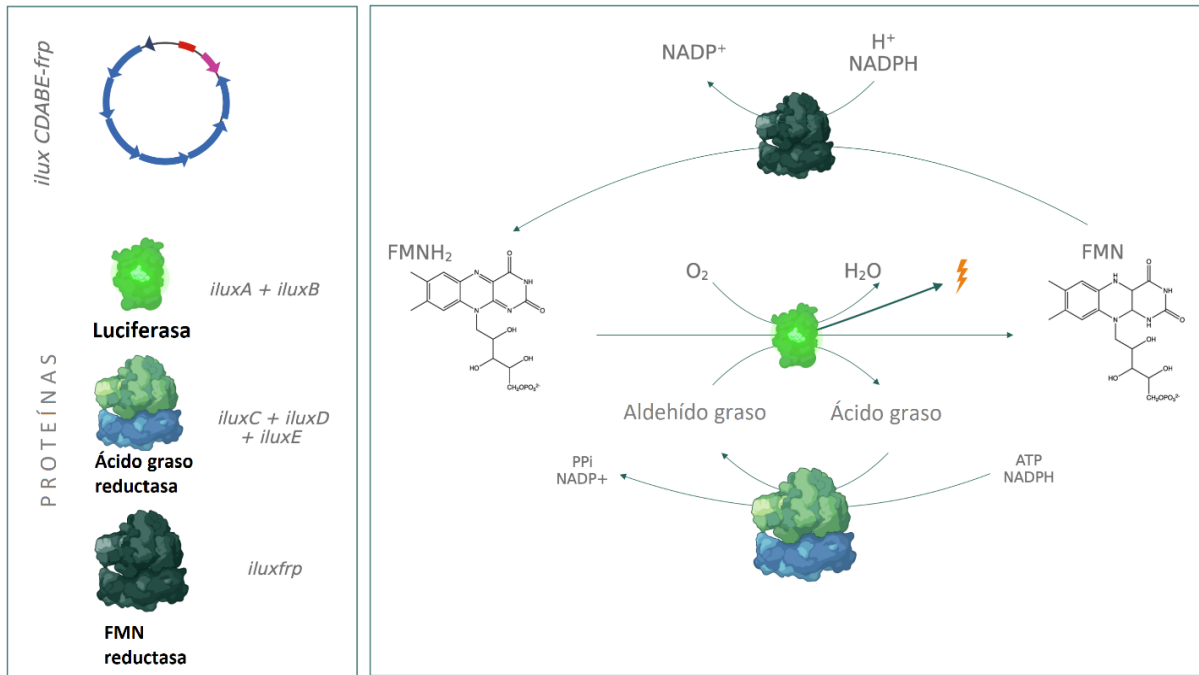
2. Genética de la bioluminiscencia bacteriana y ruta metabólica

El operón *luxCDABE*, conocido como *ilux*, es el encargado de producir la luz en las bacterias. Está compuesto por los genes, *lux A* y *B*, que codifican el complejo enzimático de la luciferasa, que cataliza la oxidación de FMNH₂ a FMN (flavin mononucleótido), y aldehído graso a ácido graso, respectivamente; reacción que da lugar a la luminiscencia (Gregor, Gwosch, Sahl, & Hell, 2018). En la figura 6 se puede observar un diagrama de la ruta metabólica generada por el operón *ilux*.

Así también, para mantener la reacción en progreso, el aldehído graso debe regenerarse continuamente. De esto se encarga el complejo ácido graso reductasa, que consiste en una reductasa, transferasa y sintetasa; codificadas por los genes *lux C*, *D* y *E*, respectivamente. Por lo tanto, el operón *lux* es totalmente autónomo en la producción de luz, siempre que se tengan condiciones aeróbicas y presencia de FMN. La FMN reductasa que genera FMNH₂ está presente

en bacterias como *E. coli*, por lo que la introducción del operón luxCDABE es suficiente para producir una señal de bioluminiscencia en las células (Gregor, Gwosch, Sahl, & Hell, 2018).

Figura 6. Diagrama de las rutas metabólicas generadas por el operón *ilux*



Fuente: (INSA Lyon, 2022).

K. Tecnología con bioluminiscencia

El conocimiento desarrollado sobre el operón luxCDABE estimuló el creciente uso de los genes para el desarrollo de biosensores de amplia aplicación en el medio ambiente. Estas incluyen la detección de contaminantes, medición de toxicidad en contaminantes y el monitoreo de bacterias genéticamente modificadas (Makawa, y otros, 2024). La bioluminiscencia bacteriana evita la necesidad de la adición de luciferina a diferencia otros sistemas de bioluminiscencia en la naturaleza, ya que el FMN está presente en todas las células (Gregor, Gwosch, Sahl, & Hell, 2018).

La fluorescencia, a diferencia de la bioluminiscencia, se mide excitando una muestra a una longitud de onda de absorción, y la emisión generada posee una vida corta (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015). Comparando la tecnología de bioluminiscencia con la de fluorescencia, esta presenta algunas ventajas. Primero, por lo sugerido, no necesita de una fuente de excitación, lo cual hace que la instrumentación requerida sea relativamente más simple. Segundo, la generación de ruidos de fondo mucho más bajos, lo cual la hace 50 veces más sensible que la fluorescencia. Tercero, no ocurren fenómenos de fototoxicidad o blanqueamiento, lo que permite la obtención de imágenes con tiempos de exposición arbitrarios. Por último, dado que la bioluminiscencia depende

únicamente del metabolismo, solamente las células activas son visibles, lo cual permite diferenciar entre células vivas y dañadas o muertas, así como eliminar contaminantes. Por otro lado, la principal limitación de bioluminiscencia se debe a su baja intensidad de luz (Gregor, Gwosch, Sahl, & Hell, 2018).

1. Métodos de detección de bioluminiscencia

a. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una herramienta importante para monitorear la fisiología celular (Sanderson, Smith, Parker, & Bootman, 2014). En un microscopio de fluorescencia, el espécimen es excitado mediante una fuente de luz a una longitud de onda específica, a la cual absorben los fluoróforos, moléculas pequeñas fluorescentes (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015). Posteriormente, los fluoróforos emiten luz a una longitud de onda mayor que la de la luz absorbida, la cual se detecta utilizando filtros que permiten aislar la luz generada por la fluorescencia (Karki, 2024; Leica, 2019).

Este equipo puede utilizarse para observar señales de bioluminiscencia, ya que ambos fenómenos implican la emisión de luz a una longitud de onda específica. El uso de filtros permite detectar emisiones de luz específicas en rangos de longitud definidos, lo cual es útil para capturar la luz de bioluminiscencia en un rango espectral determinado, al promover el aislamiento del fondo lumínico ambiental (Karki, 2024; Leica, 2019).

b. Métodos de cuantificación

1) Cámaras CCD

Las cámaras CCD, dispositivos de carga acoplada por sus siglas en inglés, fueron introducidos a mediados de los 80 y están compuestos por un sensor con retícula integrada capaz de mantener una carga eléctrica, que hicieron posible la captación de imágenes sin utilizar película (Canon, 2024). Para los experimentos de luminiscencia las cámaras CCD de refrigeración profunda, permiten obtener una mayor sensibilidad para cantidades de fotones bajas, disminuir el ruido térmico para no perjudicar la señal de luz, un detector preciso para cuantificación y un rango dinámico amplio (Oxford, 2024).

2) Luminómetro

Un luminómetro es un instrumento que mide emisiones débiles de luz visible procedentes de una muestra, normalmente por medio de un tubo fotomultiplicador. Los luminómetros son dispositivos muy sensibles que se utilizan para medir cantidades muy pequeñas de luz, a veces sólo unos pocos fotones. Por lo general, se usan con muestras pequeñas, a veces con solo unos pocos microlitros, como soluciones de proteínas o células en suspensión contenidas en un tubo de microcentrífuga o pocillos de una microplaca (Berthold, 2024).

Un luminómetro se diferencia de un fluorómetro principalmente en el hecho de que las muestras medidas por un luminómetro emiten luz por sí mismas (gracias a una reacción química), sin necesidad de luz de excitación, y por lo tanto no suelen necesitar una lámpara ni óptica de excitación (Berthold, 2024).

L. Ingeniería genética para organismos recombinantes

La ingeniería genética, también conocida como modificación genética, es un proceso que utiliza tecnologías de laboratorio para alterar la composición del ADN de un organismo. Esto puede implicar el cambio de un solo par de bases (A-T o C-G), la eliminación o adición de un segmento de ADN. Por ejemplo, se puede utilizar la ingeniería genética para añadir el gen de una especie a un organismo de una especie diferente para producir un rasgo deseado. Utilizada en la investigación e industria, la ingeniería genética se ha aplicado a la producción de terapias contra el cáncer, levaduras cerveceras, plantas y ganado genéticamente modificados, entre otras aplicaciones (NIH, 2024). Se conocen como organismos modificados genéticamente (OMG), aquellos cuyo material genético ha sido modificado artificialmente para cambiar sus características.

1. Fenotipo y genotipo

El genotipo describe el código genético que posee un organismo, el cual contiene las instrucciones necesarias para el desarrollo y funcionamiento de la célula. Por ejemplo, un gen o conjunto de genes se transcribe y traduce para producir un producto funcional, como una proteína (Nature Education, 2014). Por otro lado, el fenotipo es la manifestación observable del organismo, incluyendo sus características, función y comportamiento. El fenotipo de un organismo determina sus moléculas, macromoléculas, metabolismo, comportamiento, entre otros. Se da como resultado de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente. Por ejemplo, las proteínas codificadas por el operón luxCDABE (genotipo) se encargan de producir la luz en las bacterias (fenotipo) (Nature Education, 2014).

M. Vectores de expresión y clonación

Los vectores de clonación son útiles para almacenar una secuencia genética, ya que proporcionan una columna vertebral para almacenar el inserto de ADN, el cual se reproducirá y propagará en las bacterias. Sin embargo, por sí solos estos vectores son incapaces de permitir la transcripción y traducción del gen en un producto proteico funcional. Para obtener un producto proteico se utiliza un vector de expresión, que debe contener el origen de replicación (Ori), el sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés) y un marcador de selección. Estos componentes se muestran en el diagrama de la figura 7 (Carter, Essner, Goldstein, & Iyer, 2022).

1. Componentes de los vectores de expresión

a. Origen de replicación

El origen de replicación (Ori) es el componente que será reconocido por la maquinaria de replicación y definirá el número específico de copias del plásmido en la célula. Los orígenes de replicación son reconocidos por un organismo específico a partir de los vectores que se denominan vectores de rango estrecho para huéspedes (*narrow-host-range*), también existe una categoría de vectores de rango amplio para huéspedes (*broad-host-range*), que contiene orígenes capaces de replicarse en más de una especie o género, ya que codifican la proteína que reconoce su propio origen de replicación dentro del plásmido (Czamanski, y otros, 2019).

b. Sitio de clonación múltiple (MCS)

Corresponde a un segmento corto de ADN que contiene múltiples sitios para enzimas de restricción, lo cual permite insertar un gen fácilmente a partir de la digestión y ligación. En los plásmidos de expresión, el MCS generalmente se ubica después de un promotor; por lo que cuando un gen se inserta en este sitio, la expresión será inducida por el mismo (Addgene, 2024).

c. Marcador de selección

El marcador de selección es utilizado para seleccionar las células que han integrado el plásmido satisfactoriamente con el propósito de expresar el inserto. Esto permite diferenciar las poblaciones de células que pueden utilizarse para estudiar el gen de inserción. El marcador de selección generalmente consiste en un gen que confiere resistencia a antibióticos, que al ser expresado permite a las bacterias crecer en un medio que contiene un antibiótico específico. Además, el medio con antibiótico les provee a las bacterias una presión para que estas mantengan y repliquen el plásmido durante múltiples generaciones (Addgene, 2024). En el cuadro 3 se indican algunos antibióticos comúnmente utilizados en el laboratorio y las concentraciones recomendadas.

Cuadro 3. Antibióticos utilizados como marcadores de selección y concentración recomendada

Antibiótico	Concentración de solución estándar	Concentración de trabajo recomendada
Ampicilina	100 mg/ml	100 g/ml
Carbenicilina	100 mg/ml	100 g/ml
Cloranfenicol	25 mg/ml (disuelve en EtOH)	25 g/mL
Higromicina B	200 mg/ml	200 g/ml
Kanamicina	50 mg/ml	50 g/mL
Espectinomicina	50 mg/ml	50 g/mL
Tetraciclina	10 mg/ml	10 g/mL

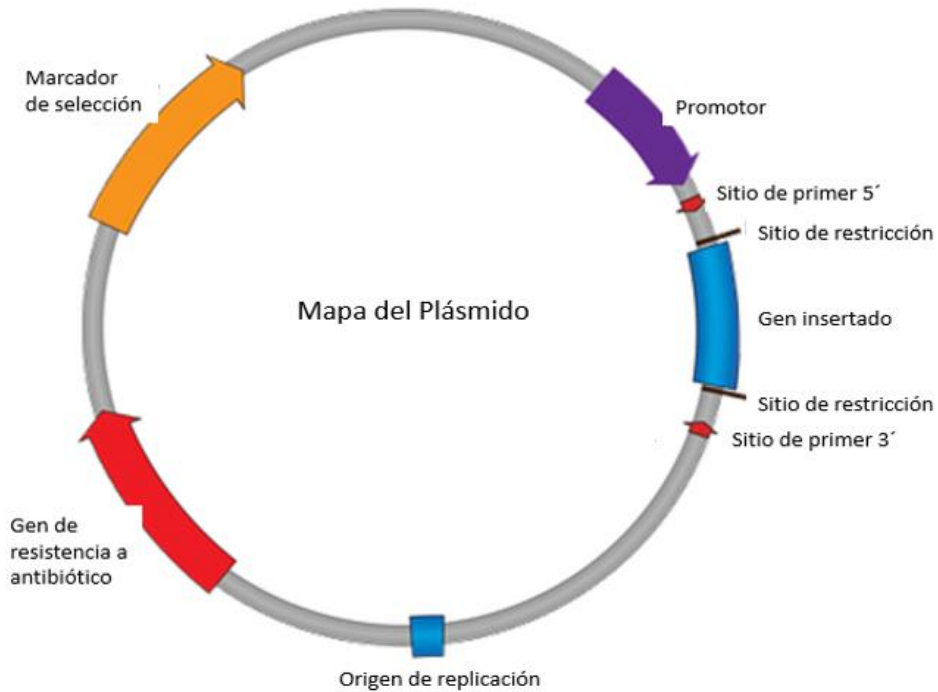
Fuente: (Addgene, 2024).

2. Plásmidos

Un plásmido puede ser utilizado como vector de expresión o clonación, y consiste en una molécula circular que, en la mayoría de los casos, contiene ADN de doble hebra y se cierra covalentemente. Estos existen naturalmente en las células de bacterias y en algunos organismos eucariontes. Se comportan como unidades genéticas accesorias, se replican y heredan de forma independiente al ADN cromosomal. A pesar de que los plásmidos no codifican para funciones celulares esenciales, estos pueden incluir genes específicos para funciones especializadas o ventajosas frente a ciertas circunstancias en la naturaleza; por ejemplo, factores de virulencia, resistencia a antibióticos, rutas metabólicas, fijación de nitrógeno, entre otras (Tolmasky, 2013).

En las últimas décadas, los plásmidos como vectores se convirtieron en el medio de transporte para entregar y manipular ADN extraño dentro de una célula huésped, iniciando la nueva era de la biología molecular. Los plásmidos han impulsado avances biotecnológicos importantes, como la producción de insulina mediante una cepa recombinante de *E. coli* para tratar diabetes. Joshua Lederberg acuñó el término "plásmido" en su trabajo sobre la herencia citoplasmática publicado en 1952 (Lederberg, 1952). Este término ha sido ampliamente aceptado y utilizado con el entendimiento de que estos elementos genéticos no son orgánulos, genes individuales, parásitos (virus) o simbioses (Czamanski, y otros, 2019).

Figura 7. Mapa de un plásmido



Fuente: (Morgan, 2014).

N. Desarrollo de plásmidos para transformar bacterias

1. Plásmido ColE1

En 1970, el desarrollo de técnicas de ADN recombinante ofreció múltiples posibilidades para manipular plásmidos naturales. Los primeros sistemas se basaron en derivados del plásmido ColE1 (Czamanski, y otros, 2019), el cual se caracterizó por primera vez para la codificación de colicina E1 en *E. coli* (DeWitt & Helinski, 1965). Los plásmidos relacionados con ColE1 comparten las mismas características; alto número de copias, peso molecular relativamente bajo y requieren únicamente las proteínas de su hospedero bacteriano, es decir, no necesitan la codificación de proteínas mediada por plásmidos (Wang, Yuan, & Hengge, 2004).

El origen ColE1 presenta un rango para huéspedes estrecho, restringido principalmente para el orden de los *Enterobacterales* de γ -Proteobacteria; en el que han sido ampliamente analizados y descritos en términos de biología molecular. Sin embargo, su rol ha sido escasamente estudiado en poblaciones bacterianas salvajes (Ares, Rocha, & Gonzalez, 2021).

2. Plásmido pSC101

El plásmido pSC101, fue identificado como un plásmido natural de *Salmonella panama*, anteriormente denominado SP-219 (Manen & Caro, 1991). Su origen de replicación es de bajo número de copias y posee un rango estrecho para huéspedes. El origen de pSC101 regula su número de copias a partir de un mecanismo mediado por la proteína RepA que inicia el proceso de replicación. Estas características confieren ventajas como una menor barrera metabólica para el huésped, mayor control de la expresión genética, y estabilidad del plásmido (Thompson, Sedaghatian, & Keasling, 2018); además de compatibilidad con plásmidos de ColE1 (Manen & Caro, 1991). En 1973, este fue el primer plásmido en ser editado, con el objetivo cambiar el gen de resistencia de tetraciclina a uno de kanamicina, obteniendo el plásmido pSC102 (Czamanski, y otros, 2019).

3. Plásmido pBR322

Uno de los primeros vectores artificiales más importantes, el plásmido pBR322, fue desarrollado por Bolívar y Rodríguez (1977). Este se construyó a partir de diferentes segmentos de ADN de otros plásmidos, con el origen de replicación aislado en laboratorio, pMB1, que está relacionado estrechamente con Col E1. El plásmido pBR322 contiene la resistencia a tetraciclina originalmente del plásmido pSC101, y la región de resistencia a ampicilina del transposón Tn3. Debido a que la región que causaba transposición fue eliminada, los genes de resistencia a ampicilina en pBR322 no son capaces de transponerse (Karcher, 1995). De pBR322, se derivaron muchas herramientas para cumplir con diferentes funciones; como es el caso del plásmido pUC, que marcó un nuevo horizonte para los vectores de expresión. Los vectores de la serie pUC están compuestos principalmente por el promotor lacZ, lo cual facilita un marcador de selección mediante la formación de un precipitado azul, al actuar la β -galactosidasa sobre el sustrato X-gal, lo que se conoce como *blue/white screening* (Czamanski, y otros, 2019).

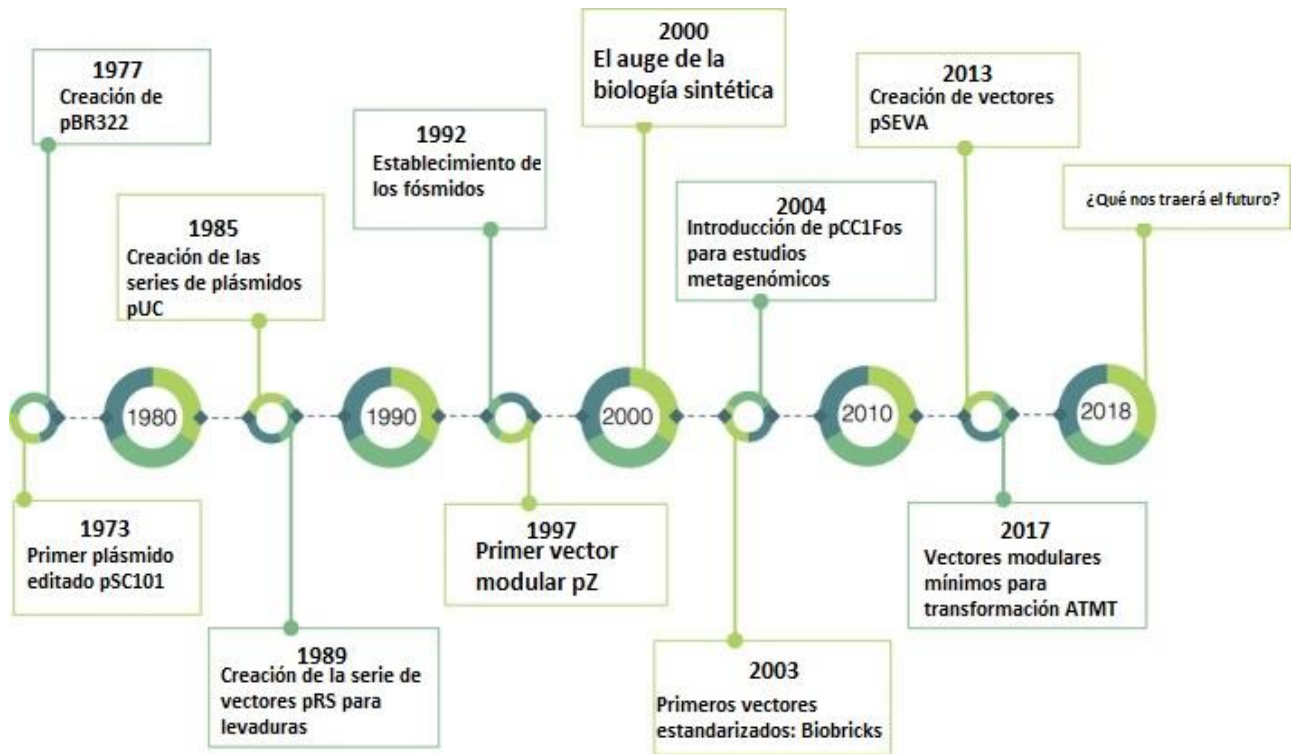
4. Plásmido pBBR1

Por otro lado, el plásmido pBBR1 es un plásmido pequeño con amplio rango de huéspedes, aislado de *Bordetella pertussis*. La proteína Rep está involucrada en el mecanismo de replicación del plásmido, y se codifica dentro de la secuencia del mismo. Se han construido muchos derivados de pBBR1 con la adición de múltiples sitios de clonación, marcadores de resistencia a antibióticos, genes reporteros y promotores regulados. Algunas de sus aplicaciones incluyen, la síntesis de polihidroxicanoatos, biocatalizadores y la sobreexpresión de antígeno protector para mejorar la eficacia de vacunas (Tao, Jackson, & Cheng, 2005).

La primera edición de “Molecular cloning: the laboratory manual” (1982); el cual es libro de referencia para la mayoría de los laboratorios de biología molecular, señala el uso de vectores como probablemente las herramientas más importantes para la manipulación genética. Por lo tanto,

actualmente la comunidad científica es capaz de comprender el comportamiento, fisiología, mecanismos moleculares y patrones de expresión génica de las células y organismos, todo gracias al creciente desarrollo en nuevas estrategias de clonación molecular. En la figura 8 se presenta la cronología que muestra los avances más importantes y decisivos en cuanto a tecnología y diseño de vectores desde 1970 hasta 2018 (Czamanski, y otros, 2019).

Figura 8. Cronología sobre los avances en tecnología y diseño de vectores



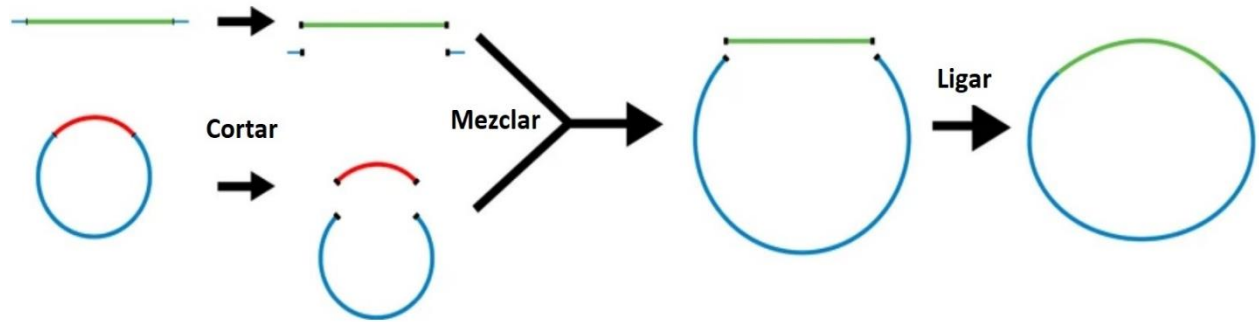
Fuente: (Czamanski, y otros, 2019).

O. Clonación por enzimas de restricción

Se utilizan enzimas de restricción para realizar cortes de la base del plásmido, con la finalidad de insertar un fragmento lineal de ADN (inserto), que es compatible con los sitios de restricción de las enzimas. Después, la enzima ADN ligasa une covalentemente el inserto al plásmido para generar un nuevo plásmido (Ford, 2016).

En la figura 9 se presenta un esquema del procedimiento general para la clonación mediante enzimas de restricción. La base del vector se muestra en azul y la secuencia de interés se muestra en verde (Ford, 2016).

Figura 9. Clonación por enzimas de restricción



Fuente: (Ford, 2016).

P. Transferencia horizontal de genes en bacterias

La transferencia horizontal de genes (THG) se reconoce como uno de los principales motivos de la adaptación y evolución de las bacterias. El intercambio de cualquier material genético entre bacterias ha permitido la adquisición de nuevas funciones como nuevas vías metabólicas, patogenicidad o resistencia a antibióticos. Los tres mecanismos de la THG son la transformación natural, transducción y conjugación (Coupat, y otros, 2008).

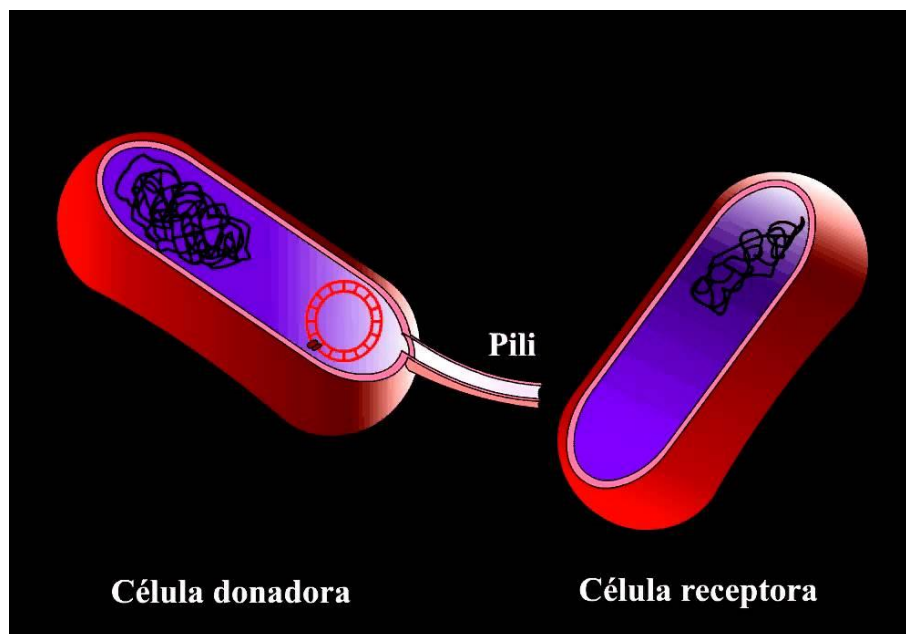
El mecanismo para la transformación natural está distribuido en al menos 40 especies bacterianas, entre estas, la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum*. *RS* infecta a más de 50 familias de plantas, por lo que el potencial adaptativo de la bacteria podría estar relacionado con su capacidad de THG, según resultados que demuestran el desarrollo de competencia y transferencia de genes mediada por transformación natural durante la colonización de plantas (Coupat, y otros, 2008). Los elementos genéticos móviles (EGM) como secuencias de inserción, transposones, casetes de genes, integrones, plásmidos y elementos conjugativos desempeñan un papel importante para facilitar la THG (Li, y otros, 2024).

Se ha reportado que las comunidades bacterianas reciben genes de resistencia a antibióticos (GRAs) principalmente a partir TGH, que a su vez puede estar mediado por los EGM (Coupat, y otros, 2008). En su estudio Li et al. (2024) demostraron que la abundancia y diversidad de GRAs y EGMs exhibieron una correlación positiva con *RS*. El enfoque de agrupamiento indicó que las fluoroquinolonas (*qepA*), la tetraciclina (*tetA*) y los genes de resistencia a múltiples fármacos (MDR, *mdtA*, *acrB*, *mexB*, *mexE*) y las β -lactamasas (*ampC*, *blaGOB*) transportadas por el mismo patógeno eran responsables del aumento de los GRAs en el suelo.

Q. Conjugación bacteriana

La conjugación es el proceso a partir del cual una bacteria (donante) transfiere material genético a otra (receptora), mediante contacto directo (Nature Education, 2014). Los plásmidos conjugativos, codifican todos los genes necesarios para la transferencia horizontal durante la conjugación de la célula donante a la receptora. El proceso de conjugación fue descubierto por primera vez en 1946 por Edward Tatum y Joshua Lederberg, quienes demostraron que las bacterias podían intercambiar información genética a través de transferencia horizontal, mediada por un factor de fertilidad conocido como factor F. Posteriormente, se descubrió que el factor F correspondía a un elemento genético cuya replicación era independiente del cromosoma, es decir, un plásmido (Virolle, Goldlust, Djermoun, Bigot, & Lesterlin, 2020). El factor F le permite al donante desarrollar una estructura delgada parecida a un tubo, conocida como pilus, con la que se adhiere a la superficie de la célula receptora. El pilus permite mantener unidas a las dos bacterias, al mismo tiempo que la donante transfiere el material genético a la receptora (Nature Education, 2014). El material genético transferido durante la conjugación, generalmente le confiere algún tipo de ventaja selectiva a la bacteria receptora, como propiedades metabólicas, estilo de vida simbiótico, virulencia, formación de biopelículas, resistencia a metales pesados, y la más importante, resistencia a antibióticos (Virolle, Goldlust, Djermoun, Bigot, & Lesterlin, 2020). En la figura 10 se muestra el esquema del proceso de conjugación bacteriana.

Figura 10. Proceso de la conjugación bacteriana



Fuente: (ScientificProtocols, 2013).

R. Recombinación homóloga

La recombinación homóloga es un mecanismo clave en la evolución de las bacterias, que conduce a la integración de una nueva secuencia de ADN que no estaba presente en el genoma del huésped. Ocurre con la interacción entre las secuencias de ADN del receptor y donante, la cual no requiere necesariamente una extensa similitud o relación entre ambas secuencias de nucleótidos. Tal como suceden los eventos de conversión de genes alélicos en eucariotas, la recombinación homóloga se caracteriza por el intercambio genético unidireccional de secuencias cortas de ADN (Torrance, Burton, Diop, & Bobay, 2024).

Se ha comprobado que cualquier fuente de ADN de doble hebra como *E. coli*, fagos y plásmidos, pueden ser adsorbidos por la superficie de la célula y por lo tanto integrados, indicando que no existe especificidad para el proceso de recombinación homóloga. La integración se define como un estado en el que ocurre la transición de ADN enlazado a un estado resistente a ADNasa. Esta transición inicia por el rompimiento de las cadenas de doble hebra; que aún en esta forma se encuentran en un estado sensible a la ADNasa. Después de la integración, el ADN es recuperado en el interior de la célula como cadena de una sola hebra. Durante la translocación en el citoplasma, la cadena de una única hebra forma un complejo con una proteína, que la protege de nucleasas, o bien, otra función podría ser facilitar la recombinación (Lorenz & Wackernagel, 1994).

En *Bacillus subtilis*, el tamaño de la cadena integrada del ADN donante varía, pero en promedio equivale a 8.5 kb. Si el ADN donante es un plásmido, este se procesa y transporta como ADN cromosomal, provocando la fragmentación de la molécula. Generalmente las eficiencias de transformación obtenidas a partir de ADN plasmídico son menores en comparación con ADN cromosomal. Sin embargo, los plásmidos presentan la ventaja de contener uno o varios marcadores de selección (Lorenz & Wackernagel, 1994)

S. Riesgos relacionados con el uso de OMG (Organismos Genéticamente modificados)

Aunque la función de la secuencia de un gen en general está claramente caracterizada en un organismo donador, esto no quiere decir que las consecuencias de su transferencia en un organismo aceptor son conocidas o se podrán pronosticar. Algunas copias del gen se integrarán, otros fragmentos serán insertados, reorganizados o eliminados. Esto puede generar inestabilidad de los genes, y por lo tanto, falta de funcionalidad; así mismo, las funciones de otros genes podrían provocar riesgos potenciales en el medio ambiente. El centro de leyes de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (2004), enlista riesgos comunes relacionados con el uso de OMGs en el campo, que se describen a continuación (Prakash, Verma, Bhatia, & Tiwary, 2011).

1. Contaminación genética o mestizaje

Los OMG introducidos pueden cruzarse con los organismos nativos del ecosistema o con aquellos que sean sexualmente compatibles. Las nuevas características adquiridas no se mantendrán a menos que representen una ventaja selectiva para el organismo aceptor. Sin embargo, los organismos nativos también desarrollarán tolerancia debido al aumento de la presión selectiva, lo cual afectará las relaciones ecológicas de las especies y su comportamiento (Prakash, Verma, Bhatia, & Tiwary, 2011).

2. Competencia con especies naturales

Un crecimiento más rápido de los OMG puede permitirles desarrollar una ventaja competitiva sobre los organismos nativos. Esto puede provocar que se conviertan en invasores de nuevos hábitats, causando daños ecológicos (Prakash, Verma, Bhatia, & Tiwary, 2011).

3. Aumento de la presión selectiva

La presión selectiva probablemente aumente, tanto para las especies modificadas como no modificadas, con el objetivo de adaptarlas a los cambios geológicos y naturales, provocando distintas poblaciones resistentes (Prakash, Verma, Bhatia, & Tiwary, 2011).

4. Impacto en los ecosistemas

Es probable que los efectos de los cambios en una única especie se extiendan en todo el ecosistema. Estos impactos siempre pueden estar acompañados del riesgo de daño o destrucción del ecosistema (Prakash, Verma, Bhatia, & Tiwary, 2011).

5. Imposibilidad de control

Una vez que los OMGs se han introducido en el medio ambiente y surgen problemas, es imposible eliminarlos. Sin embargo, esto no sugiere que deban ser menos examinados (Prakash, Verma, Bhatia, & Tiwary, 2011).

6. Transferencia horizontal de genes recombinantes a otros microorganismos

La THG de un gen introducido en un OMG puede conferir una característica nueva en otro organismo, que a su vez puede representar una fuente de peligro para la salud de las personas o el

medio ambiente. Por ejemplo, la transferencia de genes para la resistencia a antibióticos tiene el potencial de comprometer la terapia humana y animal. Algunos de los potenciales impactos de la THG proveniente de OMGs son los siguientes (Prakash, Verma, Bhatia, & Tiwary, 2011).

7. Efectos adversos en la salud de las personas y el medio ambiente

Efectos como una mayor patogenicidad, el surgimiento de nuevas enfermedades, aumento de la carga de la enfermedad si el organismo aceptor es un microorganismo patógeno o virus; así como efectos adversos en las especies, comunidades y ecosistema en general (Prakash, Verma, Bhatia, & Tiwary, 2011).

8. Efectos impredecibles y efectos a largo plazo

El gen transferido puede insertarse en diferentes sitios del genoma del organismo aceptor, lo cual implica no solo la introducción de un gen nuevo, si no que también la alteración de un gen endógeno, provocando posibles efectos impredecibles e involuntarios. Por otro lado, algunas veces el impacto de la THG puede ser más severo a largo plazo; factores como la disponibilidad de condiciones bióticas o abióticas favorables y cambios adicionales en el organismo aceptor pueden retrasar los efectos adversos (Prakash, Verma, Bhatia, & Tiwary, 2011).

9. Consideraciones éticas

Se han planteado varias cuestiones éticas asociadas a la THG de los OMGs, incluidas las amenazas percibidas a la integridad y el valor intrínseco de los organismos involucrados, al concepto de orden natural e integridad de las especies, y a la integridad de los ecosistemas en los que se encuentra el organismo modificado genéticamente (Prakash, Verma, Bhatia, & Tiwary, 2011).

T. Precauciones con el manejo de OMGs (Organismos Genéticamente modificados) en laboratorio

Algunas consideraciones importantes para el manejo de OMG dentro del laboratorio son:

- Se debe realizar un análisis de riesgos para identificar los riesgos potenciales y la implementación de medidas para reducirlos.
- Designar áreas específicas para limitar la exposición y mantener el control.
- Utilizar equipo adecuado de protección personal como guantes, bata, lentes y mascarilla.
- Solo el personal entrenado adecuadamente puede manejar los OMGs en las áreas designadas.
- Se debe implementar una ventilación local exhaustiva para minimizar la exposición.

- Contar con protocolos de disposición adecuados para el descarte seguro de los OMGs. (Coleman, 2023)

U. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que permite la amplificación rápida de un fragmento de ADN en millones o miles de millones de copias, haciendo que la secuencia sea mucho más fácil de detectar y analizar. El procedimiento de PCR implica múltiples rondas de replicación del ADN, para lo cual se necesitan los siguientes elementos (AMGEN, 2019).

- Muestra de ADN
- Cebadores o *primers*, que son fragmentos cortos de ADN sintético diseñados para coincidir con el principio y final de la sección de ADN que se desea copiar.
- Bases de nucleótidos de ADN (dNTPs) para construir las nuevas copias de ADN.
- Enzima taq polimerasa, proveniente de *Thermus aquaticus*, una bacteria que se desarrolla a altas temperaturas. Esto hace que la enzima sea muy estable a altas temperaturas, a diferencia de otras polimerasas, y pueda soportar el calor utilizado para desnaturalizar el ADN. Esta enzima cataliza la reacción que construirá las nuevas cadenas de ADN.

(AMGEN, 2019)

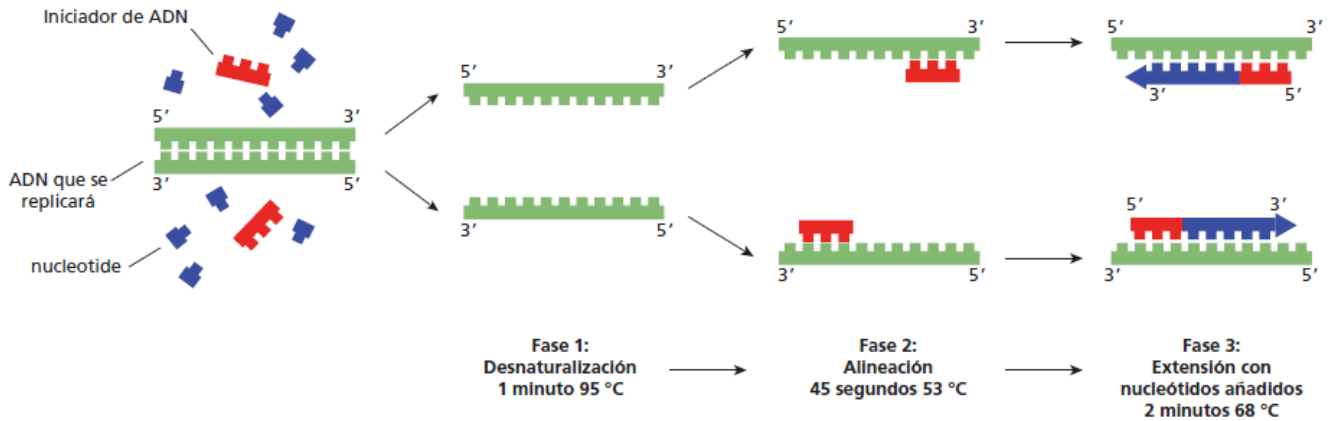
Tres fases tienen lugar durante el procedimiento de PCR:

1. Desnaturalización. El ADN se separa en hebras de una sola cadena (monocatenario) debido a las altas temperaturas, ya que los enlaces de hidrógeno entre las bases se rompen. La temperatura de fusión del ADN generalmente alcanza los 70°C. En PCR, la mezcla se calienta a 94-95°C el tiempo suficiente para asegurar que las cadenas se separen por completo.
2. Alineación. En esta etapa se promueve el enfriamiento, permitiendo que los cebadores se alineen al ADN monocatenario desnaturalizado. La temperatura de alineación se calcula en función de la temperatura de fusión de los cebadores específicos a utilizar.
3. Extensión. En esta fase la temperatura se eleva, la polimerasa taq replica la región de interés agregando los dNTPs en el extremo 3' de los cebadores.

(AMGEN, 2019)

Se muestra en la figura 11 un solo ciclo de una reacción de PCR.

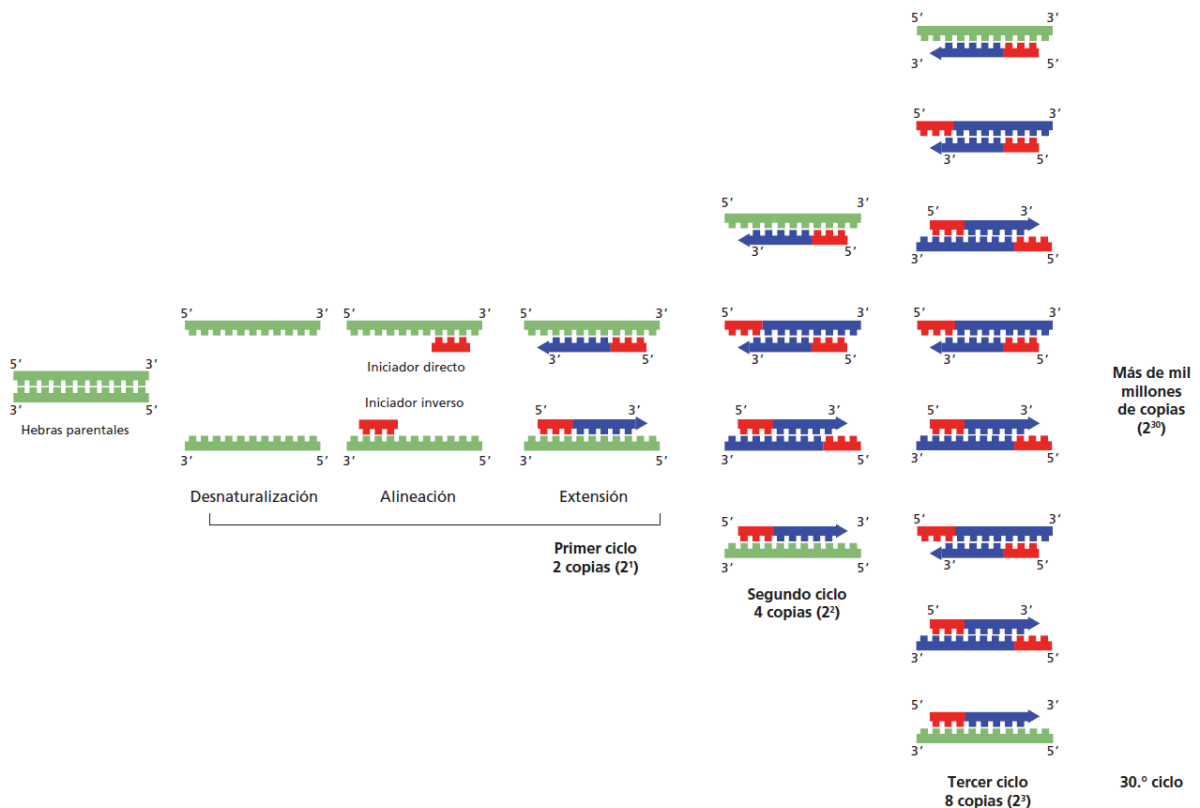
Figura 11. Tres fases de la reacción de PCR



Fuente: (AMGEN, 2019).

El procedimiento de PCR se lleva a cabo en un termociclador, el cual es un equipo que controla la temperatura y tiempo de duración de cada fase de la reacción. Un ciclo puede tomar aproximadamente cuatro minutos, y este se repite para hacer más copias. Una reacción que dura 30 ciclos puede resultar en más de mil millones de copias. La figura 12 muestra los resultados de copias después de 3 ciclos (AMGEN, 2019).

Figura 12. Tres ciclos de amplificación de ADN en PCR

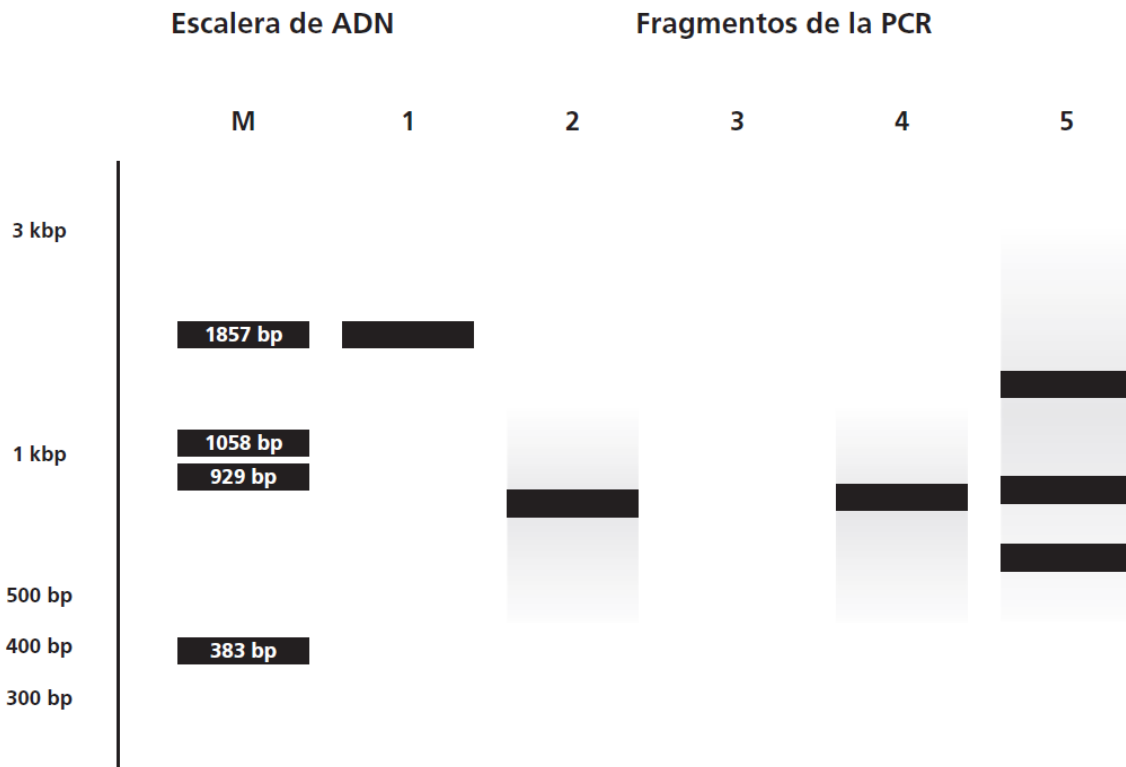


Fuente: (AMGEN, 2019).

V. Electroforesis

El éxito de la PCR se determina mediante el uso de la electroforesis en gel para analizar los productos. La electroforesis en gel de agarosa se utiliza para separar moléculas en función de su carga, tamaño y forma. El equipo se conecta a una fuente de corriente continua directa y se somete a tensión. Las moléculas de carga neta negativa migran hacia el electrodo positivo (ánodo), mientras que las de carga neta positiva migran hacia el electrodo negativo (cátodo). El tampón o buffer utilizado sirve a la vez para conducir la electricidad y controlar el pH, que también tiene una influencia sobre la carga y estabilidad y carga de las moléculas biológicas (EDVOTEK, 2016). La agarosa es un polisacárido derivado del agar, y sus propiedades determinan la velocidad de migración de las moléculas: las moléculas pequeñas migran más rápidamente que las grandes (EDVOTEK, 2016). Al comparar los productos de PCR con escaleras molecular que contiene pesos de ADN de tamaño estándar, será posible determinar si la reacción ha sido exitosa. El gel mostrará si se ha elaborado el producto esperado, si posee la longitud esperada y si se obtuvo más de un tipo de producto. El esquema de la figura 13, muestra en el carril 1 un producto de PCR de aproximadamente 1850 pb, en los carriles 2 y 4 se observan de 800 pb aproximadamente, y los carriles 3 y 5 muestran fallos en el PCR. En el carril 3 no se formó ningún producto, y en el carril 5, se obtuvieron varias bandas que sugieren presencia de más de un perfil de ADN (AMGEN, 2019).

Figura 13. Verificación del producto de PCR en gel de electroforesis



Fuente: (AMGEN, 2019).

W.PCR de colonia

El PCR de colonia es un método conveniente para determinar la presencia o ausencia de ADN insertado en plásmidos para la modificación de bacterias. Los transformantes individuales se lisan en el paso de calentamiento o desnaturalización del ADN, lo cual provoca la liberación del ADN plasmídico de la célula, permitiendo que sirva como plantilla para la reacción de amplificación (New England Biolabs, 2024). Este método elimina la necesidad de extraer y purificar el ADN de plásmido con un protocolo separado. Sin embargo, la presencia de restos celulares y medio de cultivo puede afectar en la reacción de PCR, inhibiendo la actividad de la polimerasa. Por ello, en ocasiones es sugerido el uso de una polimerasa más robusta para desarrollar el procedimiento de PCR de colonia con máxima precisión (Xu, 2018).

X. Sedimentación

1. Principios de sedimentación

La sedimentación es el fenómeno en el que las partículas o macromoléculas se mueven bajo la influencia de un campo inercial. Los campos inerciales más comunes son la aceleración gravitacional o centrífuga (Harrison, Todd, Rudge & Petrides, 2003). La tasa o velocidad a la que las partículas sedimentan es proporcional a la fuerza que se les aplica. Por lo tanto, el propósito de las técnicas de separación por centrifugación se basa en ejercer una fuerza mayor a la fuerza gravitacional de la tierra, para que las partículas sedimenten más rápido (Wilson & Walker, 2000). Las aceleraciones varían de 1 gravedad en tanques de floculación hasta 100,000 gravedades en ultracentrífugas, para medir las tasas de sedimentación de macromoléculas (Harrison, Todd, Rudge & Petrides, 2003).

Las partículas que difieren en densidad, tamaño o forma se pueden separar mediante centrifugación, debido a que cada partícula posee una tasa de sedimentación diferente. En el área de bioprocesamiento, se aplica este principio para llevar a cabo operaciones como la clarificación de medios o lisados, la recolección de células o cuerpos de inclusión y la separación de fluidos que poseen diferentes densidades (Harrison, Todd, Rudge & Petrides, 2003).

Al considerar una partícula de masa m que se mueve a través de un fluido bajo la acción de una fuerza externa F_e . Sea u la velocidad de la partícula con relación al fluido, F_b la fuerza de flotación sobre la partícula y F_D el rozamiento (McCabe, Smith, & Harriott, 2007), la ecuación (1) de movimiento de la partícula se define como se muestra.

Ecuación 1. Análisis del movimiento de una partícula que se sedimenta

$$m \frac{du}{dt} = F_e - F_b - F_D$$

(McCabe, Smith, & Harriott, 2007)

a. Fuerza externa

La fuerza externa se expresa como el producto de la masa por la aceleración debida a esa fuerza externa (McCabe, Smith, & Harriott, 2007).

Ecuación 2. Fuerza externa ejercida en una partícula

$$F_e = ma_e$$

(McCabe, Smith, & Harriott, 2007)

Si la fuerza externa es la de la gravedad, entonces.

$$a_e = g$$

g = Gravedad de la Tierra [9.8067 m²/s]

En el caso de que el movimiento este sometido a un campo centrífugo.

Ecuación 3. Fuerza debida a un campo centrífugo

$$a_e = R\omega^2$$

(McCabe, Smith, & Harriott, 2007)

R = radio de la trayectoria de la partícula

ω = velocidad angular

b. Fuerza de flotación

La fuerza de flotación o fuerza boyante es paralela a la fuerza externa, pero en sentido contrario. Según el principio de Arquímedes, la fuerza de flotación es igual al producto de la masa del fluido desplazada por la partícula y la aceleración debida a la fuerza externa (McCabe, Smith, & Harriott, 2007). Dado que la partícula desplaza el volumen de fluido equivalente a su propio volumen, entonces:

Ecuación 4. Fuerza de flotación

$$F_b = \frac{m\rho a_e}{\rho_p}$$

(McCabe, Smith, & Harriott, 2007)

ρ = densidad del fluido
 ρ_p = densidad de la partícula

c. Fuerza de rozamiento

Por último, la fuerza de rozamiento se define como se muestra.

Ecuación 5. Fuerza de rozamiento

$$F_D = \frac{C_D u^2 \rho A_p}{2} \quad (\text{McCabe, Smith, \& Harriott, 2007})$$

C_D = Coeficiente adimensional de rozamiento de la partícula.
 A_p = área proyectada de la partícula, medida en un plano perpendicular a la dirección de movimiento de la partícula

Al sustituir las ecuaciones de las fuerzas (2), (3), (4) y (5) en la ecuación (1), se obtiene.

Ecuación 6. Expresión simplificada que define el movimiento de una partícula

$$\frac{du}{dt} = R\omega^2 \frac{\rho_p - \rho}{\rho_p} - \frac{C_D u^2 \rho A_p}{2m} \quad (\text{McCabe, Smith, \& Harriott, 2007})$$

Y. Mecánica de sedimentación

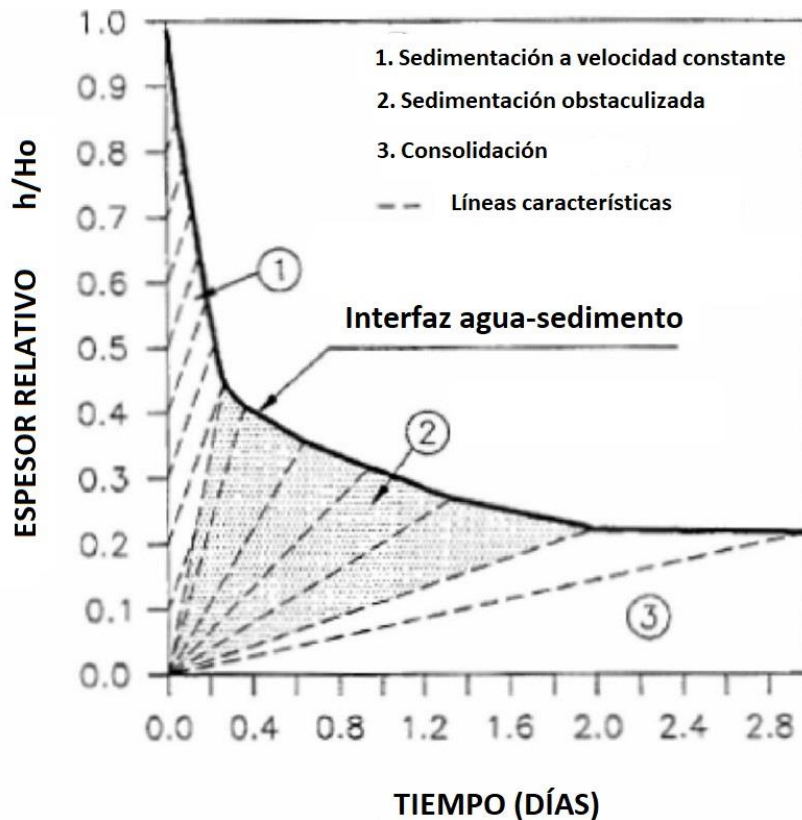
El comportamiento de la sedimentación de partículas pequeñas en una operación batch o por lotes, se explica a partir de las tres fases descritas por la teoría de Kinch (Brouwers, Meire, Toorman, Beeck, & Lataire, 2023) (Figura 14). Es importante que previo a iniciar el proceso, la suspensión se homogenice mediante agitación, para obtener una concentración de sólidos constante en el volumen total (Concha & Bustos, 1991).

Como se observa en la figura 14, la primera fase corresponde a la fase de sedimentación a velocidad constante, en la cual la interfaz líquido-sólido decae linealmente en función del tiempo, es decir, que todas las partículas descienden a la misma velocidad. La segunda fase, denominada como sedimentación obstaculizada, se distingue como la primera etapa de disminución de la velocidad de sedimentación. Esto se debe, en primera instancia, al volumen de solución desplazado a causa de la sedimentación de partículas, lo cual genera un efecto de resistencia al movimiento,

como lo describe la fuerza boyante en las ecuaciones 1 y 4. En segunda instancia, la tasa de sedimentación disminuye debido a que la densidad de los sólidos totales aumenta, y, por lo tanto, aumenta la ocurrencia de las interacciones o colisiones entre las células (Brouwers, Meire, Toorman, Beeck, & Lataire, 2023).

Por último, se alcanza la fase de consolidación (Figura 14), en la que la caída de la tasa de sedimentación es provocada por un cambio en la densidad de los sólidos totales (Brouwers, Meire, Toorman, Beeck, & Lataire, 2023). En este punto, las partículas se depositan en el fondo de la columna y se acumulan, aumentando rápidamente la concentración, hasta alcanzar la concentración máxima de la capa empacada de sólidos (Concha & Bustos, 1991). La tasa de asentamiento es una función de la densidad, lo cual se indica a partir de las líneas características o líneas de iso-densidad representadas en la figura 14. Las líneas paralelas durante la fase de sedimentación a velocidad constante indican una densidad constante; mientras que el cambio en la pendiente de estas líneas a lo largo del resto de la curva indica una densidad cambiante (Brouwers, Meire, Toorman, Beeck, & Lataire, 2023).

Figura 14. Curva de sedimentación ideal basada en la teoría de sedimentación de Kynch



Fuente: (Brouwers, Meire, Toorman, Beeck, & Lataire, 2023).

Z. Monitoreo de la sedimentación

a. Métodos espectroscópicos analíticos

Los métodos espectroscópicos analíticos se basan en medir la cantidad de radiación producida o absorbida por especies moleculares o partículas de interés. Se clasifican de acuerdo con la región del espectro electromagnético utilizada o producida durante la medición (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015).

En estudios de sedimentación, una práctica común que ha reemplazado los métodos instrumentales consiste en la visualización única del límite de sedimentación de las partículas. Sin embargo, este método se vuelve muy subjetivo, al depender de la persona y de su disposición temporal; así mismo, propiedades ópticas de la suspensión como la reflectancia pueden contribuir a la incertidumbre de los resultados. Por lo tanto, idealmente también se debe determinar un perfil completo de la concentración, por ejemplo, a partir de una propiedad física cambiante en función de la concentración, como la absorbancia (Sosbich, Lerche, & Koch, 2019). Diversos autores han reportado el uso de rayos X, ultravioleta (UV) y visible (VIS), como Been y Sills (1981) y Konnw y Adiukwa (2016), respectivamente.

b. Absorción de la radiación

La espectroscopia se basa en las interacciones de la radiación con la materia, para obtener información sobre la muestra. Cada especie molecular absorbe frecuencias específicas de radiación electromagnética. Este proceso transfiere energía a la molécula y da como resultado una disminución de la radiación electromagnética incidente (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015).

c. Ley de Beer-Lambert

La ley de la absorción, también conocida simplemente como ley de Beer, describe cómo la absorción de la radiación por una especie molecular atenúa el haz de luz que la incide. Esta ley establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de especies absorbentes, y a la longitud de la trayectoria del medio absorbente (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015), como se expresa en la ecuación 7.

Ecuación 7. Ley de Beer-Lambert

$$A = \epsilon bc$$

A = Absorbancia

ϵ = constante de proporcionalidad denominada absorptividad molar [L/mol-cm]

b = longitud de la trayectoria [cm]

c = concentración de la especie absorbente [L/mol]

(Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015)

Por lo tanto, para una longitud de la trayectoria de la luz dada, como el distanciamiento dentro de una celda de espectrofotómetro, cuanto mayor sea la concentración de los absorbentes, mayor será la atenuación y por lo tanto, la medida de absorbancia. Debido a las interacciones entre protones y partículas adyacentes, la potencia radiante del haz disminuye (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015).

d. Espectroscopia UV-VIS

En el campo de la espectroscopia se utilizan dos tipos de instrumentos, los espectrómetros y espectrofotómetros. Los espectrómetros, utilizan un monocromador o policromador en conjunto con un transductor para convertir las intensidades radiantes en señales eléctricas, y los espectrofotómetros son espectrómetros que permiten la medición de la relación entre la energía radiante de dos rayos, lo cual es un requerimiento para medir la absorbancia (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015).

En una suspensión de bacterias sometida a una fuerza de centrifugación, el espectrofotómetro UV-VIS mide la absorbancia o densidad óptica, generalmente a una longitud aproximada de 600 nm; lo cual permite obtener una relación de la concentración de células en una posición determinada, y, por lo tanto, hace posible monitorear el proceso de sedimentación.

e. Tiempo equivalente

Para estimar las propiedades de una partícula que se desea separar, en algunos casos es conveniente calcular el coeficiente denominado “tiempo equivalente”. Con este fin, se define G , una aceleración adimensional específica para cada centrifuga, que equivale al radio de la aceleración centrífuga y aceleración gravitacional (Harrison, Todd, Rudge & Petrides, 2003).

El coeficiente del tiempo equivalente es útil como una aproximación gruesa para describir la dificultad de una separación por centrifugación. Se calcula como el producto de la aceleración adimensional y el tiempo requerido para la separación, como se muestra en la Ecuación 8 (Harrison, Todd, Rudge & Petrides, 2003).

Ecuación 8. Coeficiente de tiempo equivalente

$$Gt = \frac{\omega^2 R}{g} t$$

t = tiempo requerido para sedimentar

R = radio del recipiente de la centrífuga

(Harrison, Todd, Rudge & Petrides, 2003)

Es posible extrapolar la operación de centrifugación asumiendo un tiempo equivalente constante, como se muestra en la siguiente ecuación.

Ecuación 9. Extrapolación mediante tiempo equivalente

$$(Gt)_1 = (Gt)_2$$
$$\omega_2 = \sqrt{\frac{(Gt)_1 g}{R_2 t_2}}$$

Se obtiene de la Ecuación 8

$(Gt)_1$ = Tiempo equivalente original [s]

ω_2 = velocidad angular de centrífuga de escalamiento [rad/s]

g = Gravedad de la Tierra [9.8067 m/s²]

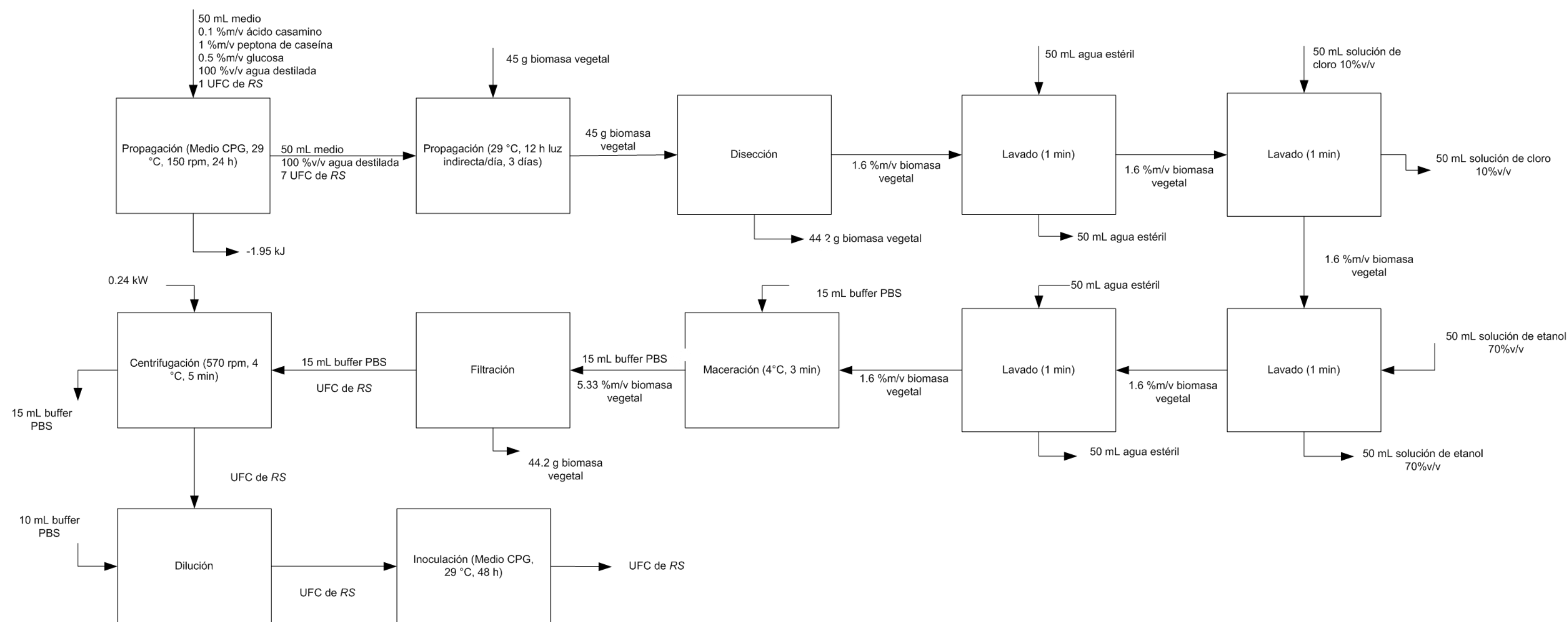
R_2 = Radio del recipiente de la centrífuga de escalamiento [m]

t_2 = Tiempo deseado en la nueva centrífuga

(Harrison, Todd, Rudge & Petrides, 2003)

Balances de masa y energía teóricos

Figura 15. Balance de masa y energía teórico.



En la figura 15 se muestra el balance de masa y energía real para el proceso de infección de una planta de tomate con un cultivo de *RS* y para operaciones necesarias para la recuperación de las células viables. En algunas operaciones, la cantidad de células se indicó simplemente como “UFC de *RS*” ya que se esperaba realizar su cuantificación en la etapa final del proceso.

V. ANTECEDENTES

Coupat *et al.* (2008), evaluaron si la transformación natural era una característica compartida entre las cuatro especies pertenecientes al filotipo de *R. solanacearum*, así como el número y tipo de fragmentos de ADN que podían ser transferidos durante la transformación natural. Esto con el fin de comprender mejor el papel de la transformación natural en la plasticidad del genoma del complejo de especies de *R. solanacearum* y su contribución en la evolución adaptativa de la patogenicidad en plantas. Utilizaron dos plásmidos; pBBR1MCS-5, que es capaz de replicarse de forma autónoma en *R. solanacearum*, y *precA::GM*, el cual se deriva del plásmido pCR2.1-TOPO y posee el origen de replicación de ColE1/pMB1/pBR322/pUC. Este último solo produce transformantes detectables a partir de la integración del genoma basada en recombinación homóloga. También utilizaron ADN cromosómico del mutante RS3 como donador, en el que la resistencia a gentamicina se insertó en el gen *recA*.

La comparación de las frecuencias de transferencia obtenidas a partir de las tres fuentes de ADN sugirió que la integración mediada por recombinación homóloga fue más eficiente que la replicación plasmídica, confirmando los resultados observados por otros modelos (Lorenz & Wackernagel, 1994). La transformación se detectó en 33 de las 55 cepas experimentales al utilizar el plásmido *precA::GM* o el ADN genómico; en comparación con el plásmido pBBR1MCS-5, a partir del cual solo 24 cepas desarrollaron colonias detectables (Coupat, y otros, 2008).

A pesar de estos resultados, Coupat *et al.* (2008) determinaron a partir de las pruebas de transformación que, sin importar la fuente donante de ADN, las especies de cada filotipo de *R.S.* son capaces de transformarse; proporcionando fuerte evidencia de que la competencia es un rasgo fisiológico omnipresente en el complejo de especies de *R. solanacearum*. La capacidad de transformarse naturalmente es un factor importante que influye en la variabilidad genética, pero también podría contribuir a la preservación y restauración de la integridad genética si fuera necesario (Fall, y otros, 2007). Sin embargo, es necesaria más investigación para poder relacionar la transformabilidad de los biovares reconocida experimentalmente con su variabilidad o estabilidad genética real.

Por otro lado, en el estudio de Xu *et al.* (2022), generaron una cepa de *R.S.* bioluminiscente (FJ91-LUX), utilizando el plásmido pBBR1MCS-5 que contenía el operón *luxCDABE*, esto con la finalidad de realizar un monitoreo en tiempo real del progreso de la infección por *RS* en plantas de tomate y *Arabidopsis*. Determinaron que la transformación no tuvo un impacto significativo en el crecimiento *R.S.*, ya que no observaron diferencias significativas entre las cepas FJ91 y FJ91-LUX para las curvas de crecimiento, morfología de las colonias, formación de biofilms y motilidad. Como parte de la metodología correspondiente, cabe mencionar que el crecimiento de las bacterias se obtuvo a partir de la medición de la densidad óptica media a 600 nm, la cantidad de biofilm con un ensayo de adherencia utilizando cristal violeta, y la motilidad de las bacterias se evaluó a partir de la medición del diámetro de las colonias y su expansión después de 48 h de haber sido inoculadas en el centro de las placas.

Por otro lado, para evaluar como la expresión del operón *luxCDABE* afectó la patogenicidad de *RS*, se comparó el índice de enfermedad en las plantas de tomate después de inocularlas con las cepas FJ91-LUX y FJ91. Se utilizó una escala empírica de 0-4 grados, donde 0 indica que no se observó marchitez en las hojas y 4 indica que el 100% de las hojas se observaron marchitas, o bien la planta se marchitó totalmente. El índice de enfermedad después de la inoculación con FJ91-LUX no difirió significativamente en comparación con el obtenido de FJ91. Para monitorear el avance de la infección, se midió la emisión de luz usando una cámara de fotones; se observó que las señales de bioluminiscencia se transmitieron desde las raíces al tallo posterior a los 3 días de inoculación (Xu, y otros, 2022).

Además, para estudiar cómo se relaciona la emisión de bioluminiscencia de FJ91-LUX con la concentración de bacterias, se midieron las señales de luz a 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y $10^8 \frac{CFU}{mL}$. La intensidad de la señal de bioluminiscencia demostró una relación lineal logarítmica con la concentración de bacterias en el rango establecido, presentando un coeficiente de correlación (R^2) equivalente a 0.9925. Esto sugirió que las señales de luz emitidas por FJ91-LUX son un reflejo de la concentración de bacterias (Xu, y otros, 2022).

Como resultado del su estudio Xu et al. (2022) concluyeron que la generación de la cepa de *RS* marcada con el operón *luxCDABE* o bioluminiscencia, permitió, de forma rápida, medir espacial y cuantitativamente el crecimiento bacteriano en los cultivos de tomate y *Arabidopsis*.

VI. METODOLOGÍA

A. Diseño del experimento (fundamento estadístico)

1. Varianza y desviación estándar

La varianza y desviación estándar son estadísticas que representan la dispersión de los valores de un conjunto de datos respecto a su media. Esta métrica es esencial para evaluar la variabilidad de los datos en un estudio experimental. La desviación estándar equivale a la raíz cuadrada de la varianza y se puede establecer en términos de la población entera (σ), o de la muestra experimental (s). En este estudio, se utilizó la función `desvest.m` en Excel para calcular la desviación estándar de la muestra (Paulson, 2008).

Ecuación 10. Varianza

$$s^2 = \frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

(Paulson, 2008)

2. Distribución normal

La distribución normal de datos es simétrica alrededor de la media, y tiene la forma de una campana. Está definida por dos valores, la media y desviación estándar. La media es el valor aritmético de los datos muestreados para una población, mientras que la desviación estándar es el valor que refleja la dispersión del rango (Paulson, 2008).

Cuando se hace referencia a una población entera los valores de la media y desviación estándar se definen como parámetros. Cuando se hace referencia a una muestra, los valores se definen como estadísticos (Paulson, 2008).

En este estudio, se determinó un intervalo con el 95% de confianza, con la finalidad de interpretar la dispersión de los datos con respecto a la media, tomando en cuenta que las poblaciones bacterianas se distribuyen de forma normal. Se utilizó el software Excel para calcular el intervalo de confianza normal, ya que se tenían muestras pequeñas que no se asociaban a una población experimental.

3. Análisis de varianza ANOVA de una vía

El análisis de varianza (ANOVA) de una vía es una herramienta estadística que permite comparar más de dos medias muestrales para determinar si existen diferencias significativas entre ellas. Este análisis evalúa dos fuentes principales de variación en los datos. La variación entre las muestras, que puede estar influenciada por un factor experimental conocido y controlado, y la variación dentro de las muestras, atribuible a la variabilidad inherente de los datos (Serrano, 2003).

La metodología ANOVA utiliza la prueba F, calculada como el cociente entre la varianza entre muestras y la varianza dentro de las muestras:

Ecuación 11. Factor F de análisis ANOVA

$$F = \frac{\sigma^2_{entre}}{\sigma^2_{dentro}}$$

(Serrano, 2003)

La F obtenida a partir de los datos experimentales se debe comparar con la F tabulada, para determinar si ambas varianzas son iguales o diferentes, como en cualquier prueba de significación (Serrano, 2003).

Para realizar el análisis ANOVA de un factor o vía, con los datos de absorbancia obtenidos en el proceso de centrifugación de las muestras de células de *RS* recuperadas, se establecieron las hipótesis del experimento.

Hipótesis nula

H_0 : La media de los datos de absorbancia para cada réplica es parecida.

Hipótesis alternativa

H_A : La media de los datos de absorbancia para cada réplica difiere.

Por lo tanto, si,

$$F_{exp} < F_{tab}$$

(Serrano, 2003)

F_{exp} = Factor experimental

F_{tab} = Factor tabulado o teórico

Se acepta H_0 (hipótesis nula), concluyendo que no hay diferencias significativas entre las medias.

Se utilizó la función análisis de datos en el software de Excel para calcular el “análisis de varianza de un factor”. Se comparó el resultado obtenido para esta prueba con la prueba de significación que se explica a continuación.

4. Pruebas de significación

El objetivo de las pruebas de significación es discernir si dos o más muestras estadísticas pueden considerarse provenientes de una misma población o no, o bien, si las diferencias entre dos o más variables aleatorias se deben a la propia naturaleza de estas o si, por el contrario, existe algún factor que las hace diferentes (Serrano, 2003).

El nivel de significación seleccionado fijará la probabilidad de acertar con la decisión tomada, que se refleja en las hipótesis. En la mayoría de los estudios experimentales el nivel de significación es del 95%, es decir, se aceptan 95 de cada 100 decisiones (Serrano, 2003).

Entonces si,

$p < \alpha$ se rechaza H_0 (hipótesis nula), concluyendo que las diferencias entre las medias son significativas.

$p \geq \alpha$ se acepta H_0 (hipótesis nula), concluyendo que las medias son similares por lo que no presentan diferencias significativas.

(Serrano, 2003)

p = probabilidad experimental

α = nivel de significación seleccionado

(Serrano, 2003)

Se seleccionó $\alpha = 0.05$ y se utilizó la función análisis de datos en el software de Excel para calcular la probabilidad con la opción “análisis de varianza de un factor”.

B. Medios de cultivo y soluciones buffer

Materiales y reactivos

- Agua destilada
- Solución de NaOH
- Solución de HCl
- Espátula
- Espátula analítica
- Bandejas para pesar
- Piseta de agua destilada
- Filtro de membrana
- Jeringa de 5 mL
- Píldoras magnéticas
- Cajas Petri

Equipo

- Estufa con agitación
- pH metro
- Autoclave
- Campana de flujo laminar
- Refrigeradora o congelador

Cristalería

- Probeta estéril
- Frasco estéril para medio

1. Medio ácido casamino-peptona glucosa (CPG) con TTC

Materiales y reactivos

- Ácido casamino (hidrolizado de caseína)
- Peptona
- Glucosa
- Agar-agar
- Tetrazolio (TTC)

Procedimiento

- 1) Se pesaron los siguientes reactivos, según lo indica el cuadro de composición.

Cuadro 4. Formulación para medio CPG

Reactivos	Para 1 L
Ácido casamino (hidrolizado de caseína)	1 g
Peptona de caseína	10 g
Glucosa	5 g
*Para medio sólido (placas) añadir:	17 g
Agar-agar	

Fuente: (Kelman, 1954).

- 2) Se diluyeron los reactivos pesados, a excepción del agar-agar, para evitar dañar el electrodo del pH-metro, en agua destilada.
 - 3) Se mezcló el medio en una estufa con agitación, utilizando una pildora magnética.
 - 4) Se midió el pH y se ajustó a 6.5-7.0 utilizando soluciones de NaOH y HCl según fue necesario, manteniendo agitación constante.
 - 5) Se añadió la masa pesada de agar-agar.
 - 6) Se aforó hasta la marca utilizando agua destilada.
 - 7) Se calentó el medio en la estufa hasta que comenzó a ebullición. Si se preparó caldo, no fue necesario llevarlo a ebullición.
 - 8) Se llevó a la autoclave a 121°C durante 15 minutos.
 - 9) Se dejó reposar el medio para enfriarlo a temperatura ambiente.
 - 10) Si no se utilizó inmediatamente, se congeló el medio sólido.
 - 11) Se esterilizó una solución estándar al 1% de cloruro de tetrazolio (TTC) llevándola a la autoclave a 121°C durante 5 minutos o utilizando un filtro de membrana. Si no se utilizó inmediatamente, se almacenó la solución a 4°C.
 - 12) Se añadieron al medio 5 mL de la solución stock de TTC.
 - 13) Dentro de una campana de flujo laminar, se vertió rápidamente el medio en cajas Petri para evitar que se solidificara.
- Nota:** Si no se utilizó el medio inmediatamente, se realizaron los siguientes pasos:
- 14) Se sacó del congelador y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
 - 15) Se abrió levemente la tapa del frasco y se derritió el medio en una estufa con temperatura moderada.
 - 16) Se mantuvo el frasco con calentamiento hasta observar ebullición.
 - 17) Se dejó reposar hasta que llegó a temperatura ambiente y se realizó el paso 13.
- Nota:** Para agregarle ampicilina al medio se siguieron las indicaciones descritas para el medio LB en el siguiente apartado.

(Kelman, 1954)

2. Luria Bertani (LB) con Ampicilina

Materiales y reactivos

- Peptona de caseína
- Cloruro de sodio
- Extracto de levadura
- Agar-agar

Procedimiento

- 1) Se pesaron los siguientes reactivos, según lo indica el cuadro de composición.

Cuadro 5. Formulación para medio LB

Reactivos	Para 1 L
Peptona de caseína	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Extracto de levadura	5 g
Para medio sólido (placas) añadir: Agar-agar	15

Fuente: (Addgene, 2024).

- 2) Se repitió el procedimiento indicado en los pasos 2-9 para el medio CPG con TTC.
- 3) Mientras se enfriaba el medio, se preparó una solución estándar de ampicilina con una concentración de 100 mg/mL en agua destilada. Se pesaron 0.1 g de ampicilina para 1 mL de agua.
- 4) Se esterilizó la solución mediante un filtro de membrana.
- 5) Se añadieron 1000 μ L de la solución de ampicilina a 1 L de medio para obtener una concentración de 100 μ g/mL.
- 6) Dentro de una campana de flujo laminar, se vertió rápidamente el medio en cajas Petri para evitar que se solidificara, utilizando un volumen aproximado de 20 mL para cada caja.
(Addgene, 2024)

3. Caldo SOC (Caldo Súper Óptimo con Represión por Catabolitos)

Materiales y reactivos

- Triptona
- Cloruro de sodio
- Extracto de levadura

Procedimiento

- 1) Se pesaron los siguientes reactivos, según lo indica el cuadro de composición.

Cuadro 6. Formulación para caldo SOC

Reactivos	Para 1 L
Triptona	20 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Extracto de levadura	5 g

Fuente: (CSH , 2024).

- 2) Se disolvieron los reactivos pesados en agua destilada.
- 3) Se disolvieron 1.86 g de cloruro de potasio (KCl) en 100 mL de agua destilada para preparar una solución de KCl 250 mM.
- 4) Se añadieron 10 mL de la solución de KCl 250 mM al medio.
- 5) Se midió el pH y se ajustó a 6.5-7.0 utilizando soluciones de NaOH y HCl según fue necesario.
- 6) Se aforó hasta la marca utilizando agua destilada.
- 7) Se llevó el medio a la autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- 8) Se dejó reposar el medio para enfriarlo a una temperatura aproximada de 25°C.
- 9) Se disolvieron 19 g de cloruro de magnesio (MgCl₂) en 100 mL de agua destilada para preparar una solución 2M.

Nota: Previo a utilizar el medio, se añadieron 5 mL de solución de MgCl₂ 2M.

- 10) Se llevó el medio a la autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- 11) Se dejó reposar el medio para enfriarlo a una temperatura de 60°C o menor.
- 12) Se preparó una solución de glucosa 1 M disolviendo 18 g de glucosa en 100 mL de agua destilada y se esterilizó pasándola a través de un filtro de 0.22 µm.
- 13) Se añadieron 20 mL de una solución estéril de glucosa 1 M.

(CSH , 2024)

4. Buffer de re-suspensión para extracción de plásmido

Materiales y reactivos

- Tris-HCl
- EDTA
- Solución de ARNasa 100 mg/mL

Cristalería

- Balón aforado de 10 mL
- Frasco estéril de 25 mL

Procedimiento

1) Se pesaron los reactivos según lo indica el siguiente cuadro de composición.

Cuadro 7. Formulación para buffer de resuspensión

Reactivos	Para 10 mL
Tris-HCl	0.0788 g
EDTA	0.03362 g

Fuente: (Li, Li, & Sheen, 2010).

- 2) Se disolvieron los reactivos pesados en un volumen de agua destilada.
- 3) Se ajustó el pH a 7.5 utilizando soluciones de NaOH y HCl según fue necesario.
- 4) Se aforó hasta la marca utilizando agua destilada.
- 5) Se agregó al buffer una solución estándar de 100 mg/mL de ARNasa previo o posterior a realizar el procedimiento de extracción de plásmido.

Fuente: (Elaboración propia).

5. Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

Materiales y reactivos

- NaCl
- Fosfato de sodio dibásico
- Fosfato de sodio monobásico

Procedimiento

1) Se pesaron los reactivos según lo indica el siguiente cuadro de composición

Cuadro 8. Formulación para buffer PBS

Reactivos	Para 1 L
NaCl	8 g
Fosfato de sodio dibásico	1.15 g
Fosfato de potasio monobásico	0.5 g

Fuente: (Laboratorio de Protección Vegetal).

- 2) Se disolvieron los reactivos pesados en un volumen de agua destilada.
- 3) Se ajustó el pH a 7.2 – 7.4 utilizando soluciones de NaOH y HCl según fue necesario.

- 4) Se aforó hasta la marca utilizando agua destilada.
- 5) Se llevó el medio a la autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Fuente: (Elaboración propia).

C. Extracción y purificación de plásmido

Materiales y reactivos

- Cultivo de *E. coli DH5α ILUX* en placas de LB con ampicilina
- Caldo LB con ampicilina
- Asa bacteriológica
- Kit Miniprep para extracción de plásmido
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Gradilla para tubos eppendorf
- Puntas de 1000 uL

Equipo

- Campana de flujo laminar o mechero
- Incinerador
- Incubadora
- Centrifuga eppendorf
- Vortex
- Cronómetro
- Micropipeta de 1000 U1

Procedimiento

- 1) Se inoculó una colonia de *E. coli DH5α ILUX* en 8-10 mL de caldo LB con ampicilina.
- 2) Se incubó a 37°C durante 24 horas.
- 3) Se siguió el procedimiento del proveedor del Kit MiniPrep comercial, como se detalla a continuación.
- 4) Se añadió 46 ml de etanol al 95-100% al recipiente con buffer concentrado *Wash 2* (12 mL).
- 5) Se incubaron a 30-37 °C durante 10-20 min los buffers ZymoPURE™ P2 y ZymoPURE™ *Binding Buffer* y se mezclaron por inversión, para disolver el precipitado formado.
Nota: El procedimiento de purificación del ADN se realizó a una temperatura aproximada de 23 °C.
- 6) Se centrifugaron a máxima velocidad un volumen de 0.5 a 5 ml de cultivo bacteriano en un tubo eppendorf de 1.5 ml durante 15-20 s. Se descartó el sobrenadante. **Nota:** Fue necesario repetir el procedimiento varias veces.

- 7) Se agregaron 250 µl del buffer de resuspensión preparado (Sección anterior) frío al sedimento y se resuspendió completamente utilizando vortex.
- 8) Se agregaron 250 µl de ZymoPURE™ P2 (Azul) e inmediatamente se mezcló invirtiendo suavemente el tubo de 8 a 10 veces. **Nota:** No se utilizó vortex.
- 9) Se dejó reposar la muestra a temperatura ambiente durante 3 minutos. Las células estuvieron completamente lisadas cuando la solución se vió clara y viscosa. **Nota:** No se permitió que la reacción de lisis continuara por más de 3 minutos.
- 10) Se agregaron 250 µl de ZymoPURE™ P3 (Amarillo) y se mezcló completamente invirtiendo. **Nota:** No se utilizó vortex. Se invirtió el tubo 5 veces adicionales después de que la muestra se volvió completamente amarilla. La muestra se tornó levemente amarilla cuando la neutralización estuvo completa y se formó un precipitado blancuzco.
- 11) Se centrifugó el lisado neutralizado durante 5 minutos a 16,000 x g.
- 12) Se transfirieron 600 µl del sobrenadante del paso anterior a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.
- 13) Se agregaron 260 µl de ZymoPURE™ *Binding Buffer* al lisado clarificado y se mezcló completamente con vortex durante 15 segundos.
- 14) Para continuar el proceso de lisis se llevó a cabo el protocolo de centrifugación especificado por el proveedor, como se describe a continuación.
- 15) Se colocó una columna Zymo-Spin™ II-PX en un tubo de recolección y se transfirió toda la mezcla del paso 14 a la columna.
- 16) Se incubó el conjunto columna/tubo de recolección a temperatura ambiente (23 °C) durante 1 minuto, y luego se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto. Se descartó el efluente.
- 17) Se agregaron 800 µl de ZymoPURE™ Wash 1 a la columna y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto. Se descartó el efluente.
- 18) Se agregaron 800 µl de ZymoPURE™ *Wash 2* a la columna y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto. Se descartó el efluente.
- 19) Se agregaron 200 µl de ZymoPURE™ *Wash 2* a la columna y se centrifugó a $\geq 10,000$ x g durante 1 minuto. Se descartó el efluente.
- 20) Se centrifugó la columna a 10,000 x g durante 1 minuto para eliminar cualquier buffer residual.
- 21) Se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.5 ml y se agregaron 25 µl de ZymoPURE™ *Elution Buffer* directamente a la matriz de la columna. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos y luego se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto. Se almacenó el ADN plasmídico eluido a -20 °C.
- 22) Se midió la concentración y pureza del plásmido aislado utilizando un espectrofotómetro, empleando el buffer de elución como blanco.
- 23) Se verificó el grado de pureza mediante la relación de absorbancias A260/A280 (para detectar contaminación por proteínas) y A260/A230 (para detectar contaminación por químicos).
- 24) Se realizó un gel de agarosa al 0.7% y se cargó la muestra de plásmido según lo establecido en el protocolo de LPV, con la finalidad de evaluar la integridad de la muestra extraída.

(Zymo Research, 2023)

D. Transformación de *RS*

1. Propagación de *RS*

Materiales y reactivos

- Cultivo en placa de *RS* (Proporcionado por FAUSAC)
- Cajas Petri con medio CPG con TTC
- Asa bacteriológica

Equipo

- Campana de flujo laminar o mechero
- Incinerador
- Incubadora

Procedimiento

- 1) Se aislaron colonias potenciales de *RS* virulenta de la placa de cultivo proporcionada por la Universidad de San Carlos de Guatemala (Figura 23, Anexos). Se utilizó medio CPG+TTC y se incubó a 28°C durante 48 horas.
- 2) Se verificó mediante el protocolo de PCR sugerido por el Laboratorio de Protección Vegetal (LPV) que el cultivo aislado correspondía a *RS* (Figuras 24 y 25, Anexos).
- 3) Se estrió una colonia aislada en una caja Petri con medio CPG+TTC y se incubó a 28°C durante 48 horas.

(Kelman, 1954)

2. Tratamiento para obtener células competentes

Materiales y reactivos

- Cultivo de *RS* en placas de CPG
- Solución de CaCl₂
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Hielo
- Puntas para micropipeta de 200 µL
- Recipiente para hielo

Equipo

- Centrífuga eppendorf
- Congelador a -80°C (-20°C si no se tiene disponibilidad)
- Micropipeta de $200\ \mu\text{L}$

Procedimiento

- 1) Se inoculó una colonia recién cultivada en $5\ \text{mL}$ de medio CPG a 28°C durante 16 horas con agitación constante a 150 rpm, obteniendo una OD600 de aproximadamente 0.5-0.9.
- 2) Se transfirió el cultivo a tubos Eppendorf y se dejó reposar durante 10 minutos en un baño de hielo a 4°C .
- 3) Se centrifugaron alícuotas de $1\ \text{mL}$ a 3500 gravedades durante 5 minutos a 4°C , y se descartó el sobrenadante.
- 4) Se resuspendió el pellet en $1\ \text{mL}$ de solución de CaCl_2 50 mM fría ($0-4^{\circ}\text{C}$).
- 5) Se incubaron las células resuspendidas en hielo durante 20-25 minutos.
- 6) Se centrifugaron las células utilizando los parámetros indicados anteriormente.
- 7) Se resuspendieron en $500\ \mu\text{L}$ de solución de CaCl_2 50 mM y se incubaron durante 24 horas a 0°C antes de su uso.
- 8) Se separaron en alícuotas de $50\ \mu\text{L}$ y se almacenaron a -20°C aquellas que no se utilizaron inmediatamente.

(Dagert & Ehrlich, 1979)

3. Transformación por choque térmico

Materiales y reactivos

- Células competentes de *RS*
- Solución de plásmido extraída
- Caldo SOC
- Hielo
- Puntas para micropipeta de $10\ \mu\text{L}$

Equipo

- Baño de hielo
- Bloque térmico VWR
- Micropipeta de $10\ \mu\text{L}$

Procedimiento

- 1) Se descongelaron las células competentes en un baño de hielo.
- 2) Se agregó $1\ \mu\text{L}$ de plásmido con una concentración de $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ a las células competentes y se mezcló por pipeteo.

- 3) Se incubaron en hielo durante 20-30 minutos.
- 4) Se incubaron a 42°C durante 45-60 segundos.
- 5) Se incubaron nuevamente en hielo durante 2 minutos.
- 6) Se añadieron 500 µL de caldo SOC a las células transformadas y se incubaron a 28°C durante 24 horas.

(Das & Dash, 2014)

4. Comprobación mediante PCR

Materiales y reactivos

- Kit de PCR (LPV)
- Control positivo de *E. coli DH5α ILUX*
- Control negativo de *RS salvaje*
- Muestra de *RS ILUX*
- Muestra de blanco
- Primer forward (5'-3') atgaaattggaaactttt
- Primer reverse (5'-3') ttgttttcttaagaaatg

Equipo

- Congelador a -20°C
- Campana de flujo laminar
- Gabinete de bioseguridad
- Termociclador
- Fuente de poder
- Sistema de electroforesis
- Transiluminador

Procedimiento

- 1) Se seleccionó una colonia de tamaño mediano y se re-suspendió en 400 µL agua destilada.
- 2) Se refrigeró la muestra de colonia de bacteria a -20°C.
- 3) Se realizó un PCR de colonia de acuerdo con el protocolo descrito por el Laboratorio de Protección Vegetal. Se emplearon el primer forward (5'-3') atgaaattggaaactttt y el primer reverse (5'-3') ttgttttcttaagaaatg para amplificar el fragmento luxCDABE.
- 4) Se corrió el producto de PCR en un gel de agarosa al 1.33% de acuerdo con el protocolo descrito por el Laboratorio de Protección Vegetal.
- 5) Se verificó la presencia de una banda de 1200 pb en el gel de agarosa.

Fuente: (Elaboración propia).

5. Comprobación mediante expresión de bioluminiscencia

Material y reactivos

- Cultivo de *RS ILUX*
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Agua destilada
- Asa bacteriológica

Equipo

- Mechero
- Microscopio de fluorescencia Leica DM2500 led

Procedimiento

- 1) Se realizó un montaje de *RS ILUX* en un portaobjetos, utilizando agua destilada y fijando el cultivo cuidadosamente con calor.
- 2) Se ajustó la platina y los objetivos macro y micrométrico del microscopio Leica DM2500 led para enfocar la muestra en los aumentos de objetivos de 10x y 40x.
- 3) Se colocó el filtro azul (490 nm) y se aisló el espacio de cualquier fuente de luz para asegurar una observación correcta.
- 4) Se identificaron destellos de luz con los aumentos de objetivos de 10x y 40x.

Fuente: (Elaboración propia).

E. Inoculación de *RS* en plantas de tomate

1. Preparación de planta de tomate

Materiales y reactivos

- Semillas de tomate
- 2 bandejas de semilleros de 2.54 cm x 2.54 cm
- 8 macetas de 11 cm x 10 cm
- Agua del chorro
- Tierra estéril
- Solución de triple 20 al 0.026% m/v
- Solución de viroflex al 1% v/v
- Solución de fav al 1% v/v

Procedimiento

- 1) Se desinfectaron profundamente las superficies y recipientes a utilizar con solución de fav al 1% v/v y viroflex al 1% v/v. En el caso de las macetas se mantuvieron en remojo en las soluciones de desinfección durante una hora, y luego se dejaron secar durante 15 min.
- 2) En la Universidad del Valle de Guatemala, dentro del invernadero destinado para cultivo, se sembraron con tierra estéril las semillas de tomate en bandejas de semilleros de 2.54 cm x 2.54 cm. Se tenían condiciones aproximadas de temperatura de 25 °C y humedad relativa del 73.1%.
- 3) Se regaron las plantas con agua del chorro 3 días a la semana.
- 4) Se administró a las plantas 250 mL de solución de triple 20 al 0.026% m/v una vez a la semana.
- 5) Después de 3 semanas de germinación, se transfirieron las plántulas a macetas de 11x10 cm. Se mantuvieron constantes los riegos indicados.

Fuente: (Elaboración propia).

2. Preparación de suspensión de *RS ILUX*

Materiales y reactivos

- Cultivo de *RS salvaje*
- Cultivo de *RS ILUX*
- 8 plantas de tomate con 4 semanas de germinación
- 8 macetas de 11 cm x 10 cm
- Solución de viroflex al 1% (v/v)
- Caldo CPG con TTC
- Agua destilada
- Celda de espectrofotómetro
- Puntas de micropipeta de 1000 µL
- Gilletes
- Regla de 10 cm

Equipo

- Incubadora con agitación
- Micropipeta de 1000 µL
- Espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240

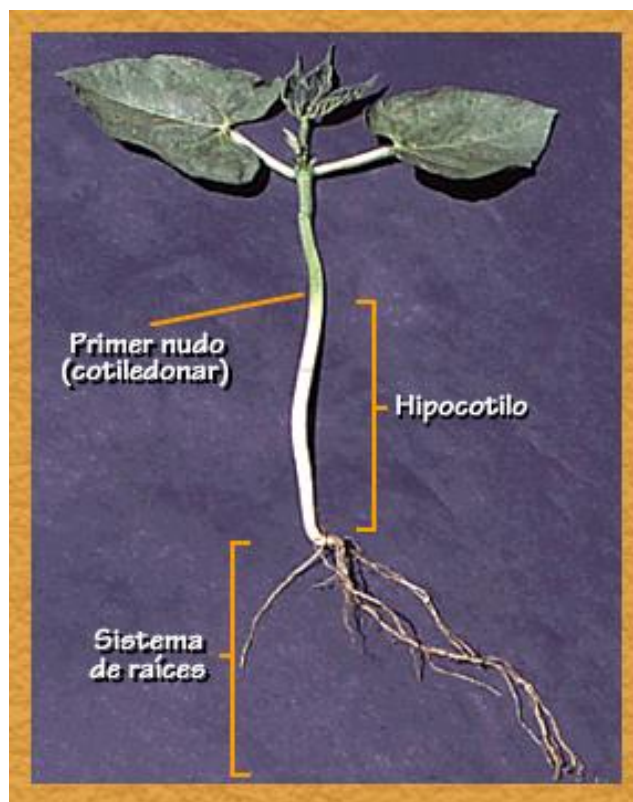
Cristalería

- 2 Erlenmeyer de 250 mL
- 3 Frascos con tapa de 250 mL
- 3 Probetas de 100 mL

Procedimiento

- 1) Se inoculó una colonia aislada en 200 mL de medio CPG líquido, utilizando un Erlenmeyer estéril de 500 mL.
- 2) Se incubó a 28°C en una incubadora con agitación constante de 150 rpm durante más de 16 horas.
- 3) Se tomó 1 mL del cultivo para medir su densidad óptica a 600 nm (OD600nm) en el espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240.
- 4) Se ajustó la OD600nm a 0.1 diluyendo con agua.
- 5) Se retiró por completo la tierra de las raíces de la planta, con un flujo de agua constante.
- 6) Sobre una superficie, se rasparon sutilmente las raíces de la planta utilizando un gillete, aproximadamente 1 cm por debajo del hipocótilo. Se tomó como referencia el esquema indicado en la figura 16.
- 7) Para los controles negativos; se inocularon 2 plantas con una suspensión de *RS salvaje* preparada como se describió en los pasos anteriores, y otras 2 plantas fueron inoculadas con un volumen de agua equivalente.

Figura 16. Ubicación del hipocótilo en una planta



Fuente: (UCCL, S.f.).

- 8) Se transfirió la planta a una nueva maceta con tierra estéril.

9) En un invernadero independiente (Figuras 26-29, Anexos) se empapó la zona de la raíz con 50 mL de la suspensión de *RS ILUX*.

Nota: Se desinfectaron profundamente las superficies y recipientes a utilizar con solución de fav al 1% v/v y viroflex al 1% v/v. En el caso de las macetas se mantuvieron en remojo en las soluciones de desinfección durante una hora, y luego se dejaron secar durante 15 min.

(Xu, y otros, 2022; Morel, y otros, 2018)

F. Recuperación de células de *RS* de las plantas de tomate

1. Desinfección y tratamiento

Materiales y reactivos

- Plantas inoculadas (3-4 días post inoculación).
- Agua del grifo.
- Bolsa para autoclave de residuos biopeligrosos
- Gillette estériles.
- Cloro al 10%v/v.
- Etanol al 70%v/v.
- Agua estéril.
- Buffer PBS.
- Hielo.
- Filtros de café.

Equipo

- Superficie esterilizada (tabla desinfectada con cloro y etanol).
- Campana de flujo laminar.
- Beakers de 100 mL.
- Balanza analítica.
- Bomba de vacío.
- Matraz Kitasato.
- Tapón de goma.
- Embudo Buchner.
- Manguera.
- Centrífuga Fischer Scientific Modelo 228.
- Centrífuga Forma Scientific Inc.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240.

Procedimiento

- 1) En los días 3-4 post inoculación, se recolectaron plantas y se limpiaron con agua del grifo mediante una corriente lenta, para eliminar las partículas de suelo. Se recolectaron los residuos en una bolsa para autoclave de residuos biopeligrosos (Figura 35, Sección Anexos).
- 2) En una superficie esterilizada, como se describió a continuación, se cortó una muestra de la parte inicial del hipocótilo con una Gillette estéril y se pesaron 0.8 g.
- 3) Se utilizó una Gillette estéril por cada muestra, y entre cada una se dejó reposando la tabla con cloro al 10% durante 3 minutos, y se desinfectó con etanol al 70%.
- 4) Dentro de una campana de flujo laminar, se trabajó en grupos de 4 muestras como máximo en el siguiente procedimiento de desinfección.
- 5) Se transfirió cada muestra a un beaker de 100 mL y se dejó reposando el material con las siguientes soluciones en el orden indicado:
 - 50 mL de agua estéril durante 1 minuto.
 - 50 mL de etanol al 70% durante 1 minuto.
 - 50 mL de cloro al 10% durante 1 minuto.
 - 50 mL de agua estéril durante 1 minuto.
- 6) Se maceró cuidadosamente el material vegetal en 15 mL de buffer PBS, aplicando una fuerza moderada durante 3 minutos. **Nota:** El procedimiento se realizó dentro de un baño de hielo a 4°C.
- 7) Se dejaron reposando las muestras en hielo durante 1 minuto.
- 8) Se montó el sistema de filtración al vacío, como se muestra en la figura 17 (bomba, Kitasato, tapón de goma, embudo Buchner y manguera).
- 9) Se filtraron las muestras homogenizadas a través de filtros de café y se recuperó el líquido.
- 10) Se centrifugaron las muestras recuperadas de la filtración a máxima velocidad.
- 11) Se tomaron alícuotas de 1 mL del sobrenadante en intervalos de tiempo de 1-3 minutos y se registró su absorbancia a 600 nm.
- 12) Se estableció como tiempo de sedimentación de biomasa aquel en el que la absorbancia se mantuvo constante.
- 13) Se calculó el coeficiente de tiempo equivalente a partir de los tiempos obtenidos para la sedimentación de biomasa, con la finalidad de reducir el tiempo de operación para ensayos posteriores, como se muestra en el cálculo 3 en Anexos.
- 14) Las muestras de células de *RS* sedimentadas se diluyeron en 10 mL de buffer PBS.

(Harrison, Todd, Rudge & Petrides, 2003)

Figura 17. Representación del sistema de filtración al vacío



Fuente: (Wiggins, 2024).

2. Evaluación de la viabilidad de las células de *RS* recuperadas

Materiales y reactivos

- Suspensión de células de *RS* recuperada
- Cajas Petri con medio CPG con ampicilina
- Puntas para micropipeta de 100 μL
- Asa bacteriológica
- Marcador permanente
- Piseta con agua destilada
- Cristal violeta
- Lugol
- Safranina
- Aceite de inmersión
- Decolorante (acetona, etanol, entre otros)
- Goteros
- Recipiente para lavados

Equipo

- Incubadora
- Campana de flujo laminar
- Micropipeta de 100 μL
- Incinerador
- Mechero

- Microscopio óptico Leitz LaborLux 5
- Cristalería
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Esparcidores

Procedimiento

3. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de *RS ILUX* recuperada

- 1) Se sembraron 100 μ L de la suspensión de células de *RS ILUX* recuperadas, por vertido en placas de medio CPG con ampicilina, esparciendo uniformemente con ayuda de un esparcidor.
- 2) Se incubó a 28 °C durante 48horas y se realizó el conteo UFC en placa de forma visual.

4. Tinción de Gram de *RS ILUX* recuperada

- 1) Se esterilizó un asa bacteriológica utilizando un incinerador o mechero
- 2) Se identificó un portaobjetos y se dibujó un círculo en el centro de este.
- 3) En el lado reverso del portaobjetos, se colocó una gota de agua dentro del círculo usando el asa.
- 4) Se esterilizó el asa.
- 5) Se seleccionó una colonia de bacterias aislada y se transfirió dentro del círculo utilizando el asa, y se dejó reposar el portaobjetos unos minutos y se esterilizó el asa.
- 6) Se flameó rápidamente el portaobjetos con un mechero y se repitió esta acción un total de 3 veces para fijar las bacterias.
- 7) Sobre un recipiente o lavabo, se agregaron 2-3 gotas de tinte cristal violeta dentro del círculo y se dejó reposar durante aproximadamente 1 minuto.
- 8) Se lavó el portaobjetos utilizando una piseta hasta limpiar claramente la mancha.
- 9) Se agregaron 2-3 gotas de Lugol dentro del círculo y se dejó reposar durante aproximadamente 1 minuto.
- 10) Se lavó el portaobjetos hasta limpiar claramente la mancha.
- 11) Se hizo correr el decolorante a través del portaobjetos, en un ángulo de 45°, hasta que el flujo se apreció transparente.
- 12) Se agregaron 2-3 gotas de safranina dentro del círculo y se dejó reposar durante aproximadamente 1 minuto y se lavó el portaobjetos hasta limpiar claramente la mancha.
- 13) Se dejó secar la muestra durante unos minutos.
- 14) Se enfocó la muestra en el microscopio desde el objetivo 10x.
- 15) Se agregó aceite de inmersión a la muestra y se enfocó utilizando el objetivo 40x.
- 16) Se identificó que las colonias bacterianas eran Gram negativas (color rosado).
- 17) Se verificó la viabilidad de la pared de las células bacterianas y su morfología (forma de bastoncillo, cortas y rectas).

5. Ensayo de bioluminiscencia de *RS ILUX* recuperada

Se repitió el procedimiento indicado en el apartado para la comprobación a partir de la expresión de bioluminiscencia utilizando el microscopio de fluorescencia Leica DM2500 led, con la finalidad de visualizar la emisión de bioluminiscencia por las muestras de *RS ILUX* recuperada de las plantas de tomate.

6. Medidas de seguridad para el manejo de Organismos Modificados Genéticamente (OMGs)

- El invernadero destinado para la inoculación se muestra en las Figuras 26-29; está construido adecuadamente para evitar la transmisión de microorganismos desde o fuera del mismo.
- Se desinfectó el invernadero destinado previo y posterior al proceso de inoculación, con soluciones de viroflex y fav al 1% (v/v), utilizando equipo de aspersion (Figura 30). También se aseguró de retirar cualquier residuo del suelo, paredes y otras superficies dentro del invernadero, utilizando una hidro lavadora (Figura 31). Para el procedimiento de desinfección se utilizó como equipo de protección, bata, mascarilla y botas de hule (Figuras 32).
- Dentro de las áreas de invernadero se aplicó solución de viroflex al 1% v/v en las manos, brazos y calzado antes de ingresar (Figura 33). Se utilizó como equipo de protección, bata, guantes y mascarilla, al inocular el cultivo y manipular muestras infectadas o potencialmente infectadas, dentro de las áreas de invernadero y laboratorio. Utilizando equipo independiente para cada área y sustituyéndolo por nuevo cuando fuera necesario. El equipo se descartó en Ecotermo al finalizar su uso.
- Dentro de laboratorio, se desinfectaron abundantemente las superficies y equipo de protección con soluciones de cloro al 10% v/v y etanol al 70% v/v, en dicho orden.
- Los cultivos con bacteria se dejaron reposando en cloro al 10% v/v durante 24 h, y se recuperaron en un galón para llevarlo a tratamiento en Ecotermo (Figuras 34). Toda la cristalería se lavó profundamente con jabón Noion al 1% v/v para ser autoclaveada a 121 °C durante 15 min posteriormente.
- Los restos de las plantas infectadas, tierra utilizada, bolsas para transportar las muestras y papel infectado se autoclavearon a 121 °C durante 15 min y se registró como residuo bioinfeccioso para tratamiento en Ecotermo (Figuras 35 y 36).

Fuente: (Elaboración propia).

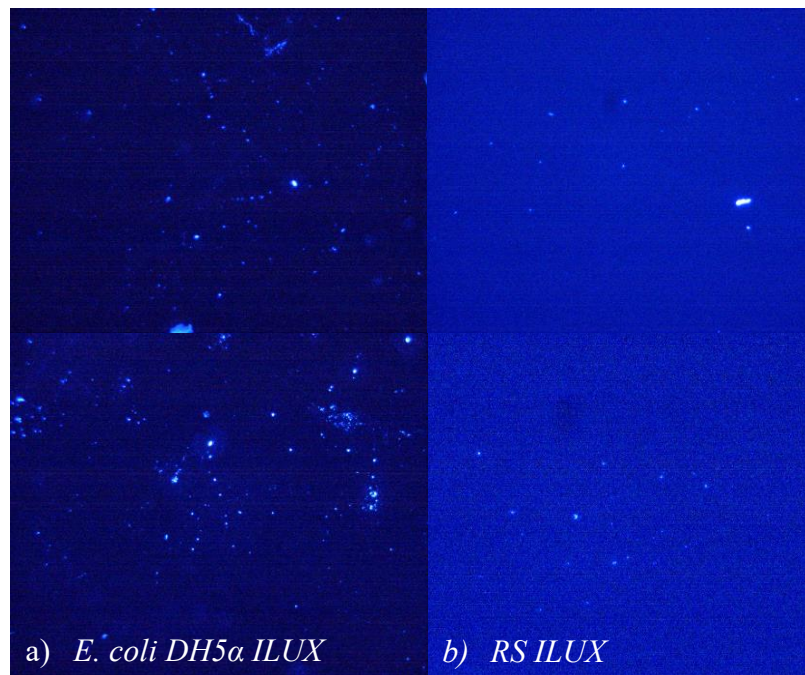
VII. RESULTADOS

Cuadro 9. Evaluación comparativa de opciones de plásmidos existentes para la expresión de bioluminiscencia

Plásmido	ilux pGEX(-)	pBBRMCS-2	pBEN276
Gen de inserción	luxCDABE	NA	luxCDABE
Tamaño molecular (pb)	10,873	5,184	19,671
Ori	ColE1/pMB1/pBR322/pUC	pBBR1	pSC101
Método de transformación	Recombinación homóloga	Replicación	Recombinación homóloga
Solicitudes	>100	>100	>50
Publicación	(Ceroni, y otros, 2018)	(Gregor, Gwosch, Sahl, & Hell, 2018)	(Howe, y otros, 2010)

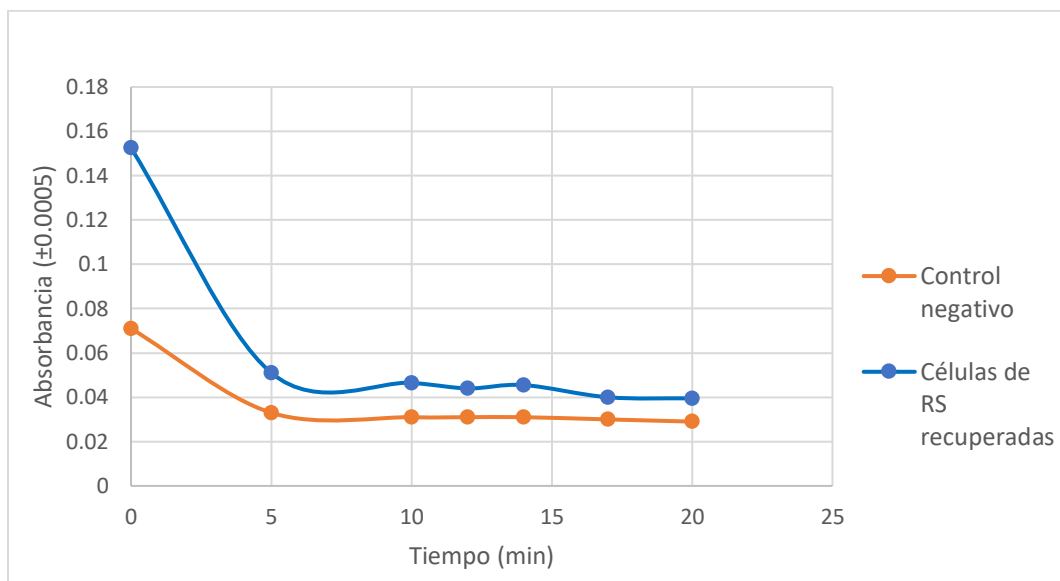
El cuadro anterior se presenta la evaluación comparativa de plásmidos existentes para la expresión de bioluminiscencia. Se consideran componentes genéticos como el tamaño molecular, origen de replicación y método de transformación; así también, la cantidad de solicitudes del vector sugerida por Addgene, y la fuente de publicación correspondiente. NA: No aplica. Los mapas y descripciones de los plásmidos se presentan en la sección de Anexos, en las figuras 46-49 y 50-52, respectivamente.

Figura 18. Comprobación de la transformación genética de *RS* a partir de la expresión de bioluminiscencia



En la figura anterior se muestran los montajes para confirmar la transformación de *RS* a partir de la expresión de bioluminiscencia. Se utilizó el microscopio de fluorescencia Leica DM2500 led con filtro azul (490 nm) y una magnificación total de 100x. a) Control positivo b) *RS* transformada.

Figura 19. Curva de sedimentación de células de *RS* extraídas del tallo de la planta de tomate



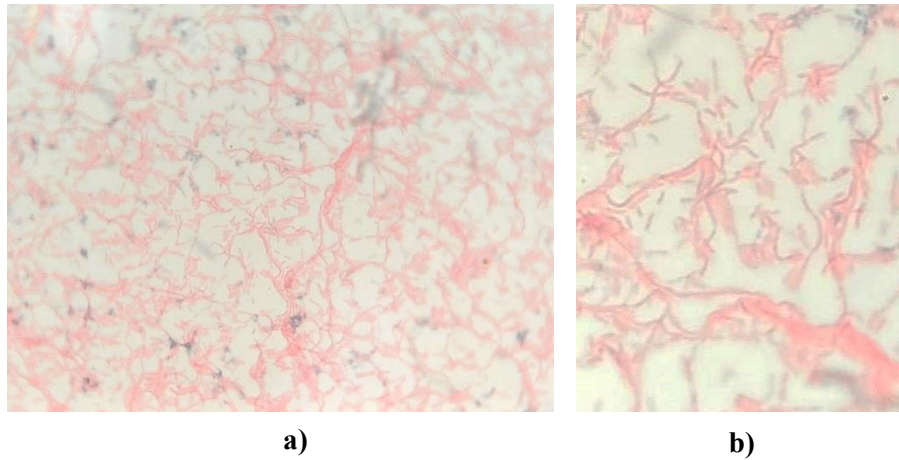
En la figura anterior se muestran las curvas de sedimentación obtenida para las células de *RS* recuperadas de las plantas de tomate al tercer día post inoculación (curva azul) y la muestra control (curva naranja). Se utilizó la centrífuga Fischer Scientific a 3400 rpm y 25 °C. Para medir la absorbancia se utilizó el espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240 a 600 nm, y se graficó el promedio de los datos obtenidos para dos muestras.

Cuadro 10. Conteo de colonias de bacterias recuperadas mediante centrifugación

Muestra	Control 1 (-) (UFC)	Control 2 (-) (UFC)	<i>RS ILUX</i> (UFC)
1	8	0	10
2	19	0	11
3	-	-	4
4	-	-	6
Promedio	14	0	8
Desviación estándar	7.78	0.00	3.30
Intervalo de confianza	± 10.78	0	± 4.58

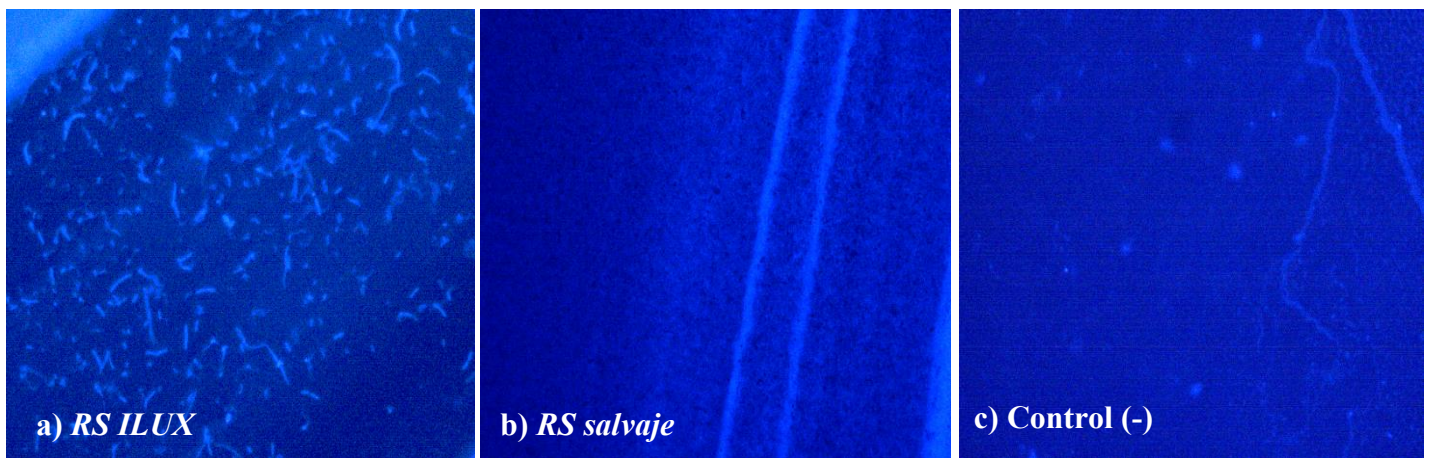
En el cuadro anterior se muestran el conteo de colonias de bacterias realizado para evaluar la viabilidad de las células de *RS ILUX* recuperadas de la extracción utilizando la centrífuga Forma Scientific Inc a 570 rpm durante 5 min y 4 °C. Se sembraron todas las muestras en medio CPG con ampicilina. Los controles negativos “(-)” corresponden a 1) muestra sin inoculación de bacteria, 2) muestra inoculada con *RS* salvaje. Los controles negativos se trabajaron en duplicado y la muestra experimental en cuadruplicado; por lo que se indican los valores promedio y de desviación estándar correspondientes.

Figura 20. Tinción de Gram de la cepa *RS ILUX* recuperada mediante centrifugación



En la figura anterior se muestra el montaje de la tinción de Gram de la cepa *RS ILUX* recuperada mediante centrifugación, a 570 rpm durante 5 min y 4 °C. Se utilizó el microscopio Leitz Laborlux a) Observación en microscopio con una magnificación total de 400x, b) acercamiento para visualizar la morfología de las células de *RS ILUX*.

Figura 21. Comprobación de la emisión de bioluminiscencia de las células de *RS ILUX* recuperadas de las plantas de tomate



En la figura anterior se muestran los montajes realizados de las muestras recuperadas del tallo de plantas de tomate, para comprobar la emisión de bioluminiscencia de las células de *RS ILUX*. Se utilizó el microscopio de fluorescencia Leica DM2500 led con filtro azul (490 nm) y una magnificación total de 400x. Los controles negativos corresponden a b) *RS salvaje* y c) muestra sin inoculación de bacteria. La muestra de *RS salvaje* se obtuvo de otra corrida experimental (Figura 57, Anexos) y se presentan montajes complementarios de *RS ILUX* en Anexos, figuras 59 y 60.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El uso de genes bioluminiscentes, como el operón *luxCDABE* proveniente de bacteria, se presenta como una herramienta biotecnológica atractiva para su uso en el monitoreo en tiempo real de patógenos en plantas, ya que no necesita de la suplementación exógena de luciferina, puesto que es capaz de producirla por sí misma. Es por ello que, en la presente investigación, se planteó desarrollar un constructo genético mediante la inducción de bioluminiscencia en *Ralstonia solanacearum* (*RS*), para proponer una herramienta potencial en el monitoreo de su propagación en un cultivo de tomate. Para el desarrollo de la tecnología bioluminiscente, se seleccionó un plásmido adecuado para la transformación de *RS*, mediante la evaluación de los componentes genéticos de opciones existentes, y se implementó la técnica de choque térmico para introducir el plásmido correspondiente. Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación para recuperar la mayor concentración de células viables de *RS* de plantas de tomate, y se evaluó su viabilidad realizando tinción de Gram y conteo de colonias en placa. Por último, se analizó el uso potencial de la herramienta desarrollada, a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de bioluminiscencia de las células de *RS* recuperadas de las plantas de tomate. La emisión de bioluminiscencia, y, por lo tanto, la comprobación de la transformación genética se realizó mediante microscopía de fluorescencia. Estos resultados permitieron valorar la aplicabilidad de la tecnología en un contexto agrícola, considerando la instrumentación necesaria, así como sus beneficios y limitaciones.

En el cuadro 9, se presenta la evaluación comparativa de opciones de plásmidos existentes para inducir la expresión de bioluminiscencia en *RS*. El plásmido *ilux pGEX(-)* desarrollado por Ceroni *et al* (2018), consiste en un vector con el origen de replicación *ColE1/pMB1/pBR322/pUC*, que posee un rango estrecho para huéspedes transformantes, por lo que requiere de las proteínas de la bacteria para ser expresado; normalmente está restringido para las γ -proteobacterias (Ares, Rocha, & Gonzalez, 2021), por lo que no es compatible con *RS*, al ser una β -proteobacteria (García, Kerns, & Thiessen, 2019). Por lo tanto, la transformación ocurre por recombinación homóloga, es decir, que el ADN se integra en el cromosoma del huésped (Lorenz & Wackernagel, 1994). En contraste, el plásmido *pBBRMCS-2* que posee el origen de replicación *pBBR1*, es compatible con *RS*, al ser de rango amplio para huéspedes y codificar por sí mismo la proteína *pBBR1 Rep* (Figura 48, entre 4000 y 5000 pb) que reconoce su propio origen de replicación dentro del plásmido; por lo tanto, se replica y mantiene de forma independiente al cromosoma (Tao, Jackson, & Cheng, 2005).

Coupat *et al.* (2008) demostraron con diferentes variantes de *RS* que los modelos de transformación mediados por recombinación homóloga, utilizando el plásmido *precA::GM*, fueron más eficientes que la replicación plasmídica, utilizando el plásmido *pBBR1MCS-5*; los cuales poseen los orígenes de replicación de *ColE1/pMB1/pBR322/pUC* y *pBBR1*, respectivamente. Se detectaron 33 transformantes de 55 cepas experimentales al utilizar el plásmido *precA::GM*, en comparación con 24 cepas utilizando el plásmido *pBBR1MCS-5*. En base a este estudio, se determinó la conveniencia de utilizar el plásmido *ilux pGEX(-)* frente a *pBBRMCS-2* para la transformación genética de *RS*.

Además, en el caso del plásmido ilux pGEX(-), este contiene como gen de inserción el operón luxCDABE, mientras que el plásmido pBBRMCS-2 no contiene ningún inserto, si no que se trata de la base del vector, a la que se debe incorporar el gen de interés realizando cortes del plásmido con enzimas de restricción (Ford, 2016); lo cual implica una inversión adicional de tiempo y recursos. Por último, el plásmido pBEN276 posee el origen de replicación pSC101, el cual no es compatible con *RS* por lo que la transformación ocurre, de igual forma, por recombinación homóloga (Manen & Caro, 1991). Para la selección también se tomó en cuenta el tamaño o peso molecular del vector, siendo de 19,671 pb y de 10,873 para pBEN27 y pGEX(-), respectivamente. Se prefirió el plásmido pGEX(-) al ser el de menor peso molecular, esto ya que en otros modelos como *B. subtilis*, se ha reportado que se integra alrededor del 70% del ADN donante, o bien, un tamaño de aproximadamente 8.5 kb (Dubnau, 1991; Smith, Dannner, & Deich, 1981).

La última característica considerada para seleccionar el plásmido adecuado fue la cantidad de solicitudes según la página del proveedor (Figura 53, Anexos). Esto se tomó en cuenta como un indicador de la confiabilidad del plásmido; los plásmidos evaluados muestran más de 100 solicitudes en el caso de ilux pGEX(-) y pBBR1MCS-5, y más de 50 en el caso de pBEN27. Por lo tanto, en base a los aspectos discutidos, se seleccionó el plásmido ilux pGEX(-) para la transformación de *RS* con la finalidad de inducir la expresión de bioluminiscencia, debido a la frecuencia de transformación reportada por Coupat *et al.* (2008) mediante recombinación homóloga, simplicidad de aplicación ya que posee el gen de interés integrado, un tamaño molecular razonable y un nivel de confiabilidad alto sugerido por el proveedor.

En la figura 18, se muestra la comprobación de la transformación genética *RS* a partir de la expresión de bioluminiscencia. Se utilizó como control positivo, la cepa de *E. coli DH5α* modificada con el plásmido ilux pGEX(-), la cual fue proporcionada por el proveedor correspondiente. En el campo de montaje para la muestra de *RS ILUX* (Figura 18b), se observó a 490 nm algunos destellos pequeños de luz, los cuales se infirió que se trataban de células de *RS* debido a su tamaño pequeño y forma regular; se despreciaron aquellos elementos que no coincidían con estas características. Al comparar este campo con el observado en el caso del control (Figura 18a), se comprobó que las células se habían transformado exitosamente; puesto que lograron expresar los genes del operón luxCDABE, lo que resultó en el fenotipo de emisión de bioluminiscencia. (Wei & Wang, 2019).

La proporción baja de luz en la muestra de *RS ILUX* (Figura 18b), en comparación con el control (Figura 18a) sugirió que la frecuencia de transformación de las células fue baja. Esto pudo estar relacionado con la metodología para extraer el plásmido ilux pGEX(-) de *E. coli DH5α*. Se utilizó un kit miniprep comercial, el cual tiene rendimientos de ADN de hasta 100 µg (Zymo Research, 2023); sin embargo, el gel de integridad realizado (Figura 54, Anexos) demostró que la extracción fue impura, al identificarse la presencia de una segunda banda con peso molecular menor al de ilux pGEX(-). Esto pudo deberse a un exceso en la agitación mecánica de las muestras, lo que puede provocar que queden fragmentos retenidos de ADN cromosomal en el sobrenadante, y, por lo tanto, co-purificar con el ADN de plásmido (Zymo Research, 2023). Así también, cabe mencionar que el uso de un buffer de resuspensión preparado en laboratorio, pudo influir negativamente en la calidad de los resultados obtenidos. Por lo tanto, para la extracción de plásmido se recomienda

emplear un kit maxiprep, ya que es posible tratar volúmenes de cultivo más grandes, lo cual facilita el manejo y control de las muestras, y a su vez, puede contribuir a la mejora los rendimientos (100 ug – 1 mg) y pureza de ADN (Thermo Fisher Scientific, 2024).

Cabe mencionar que no fue posible comprobar la transformación genética de *RS* mediante PCR, como se observa en el gel de electroforesis (Figuras 55 y 56; Anexos), al comparar con el control positivo de *E. coli DH5α ILUX* (carril 3). Esto se relacionó con la fuente de error mencionada anteriormente, ya que la transformación de *RS* a partir de un extracto del plásmido con presencia de ADN cromosomal pudo influir en la especificidad de amplificación de la Taq polimerasa (ThermoFisher Scientific, 2024). Por otro lado, como método de selección o cribado en placa, es importante mencionar que *RS* es capaz de generar resistencia a antibióticos betalactámicos como la ampicilina (Li, y otros, 2024); lo cual se observó en las muestras experimentales (Figura 57, Anexos). En su estudio, Markos y Feyissa (2020) demostraron que el tratamiento con gentamicina fue el más efectivo contra el crecimiento de *RS*, seguido del tratamiento con tetraciclina. Por lo tanto, se sugiere evaluar dichos antibióticos como marcadores de selección para la transformación de *RS*.

En la figura 18 se muestra la curva de sedimentación de las células de *RS* (curva azul) extraídas del tallo de las plantas de tomate, al tercer día post inoculación. Según lo establece la ley de Lambert Beer (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2015), los valores de absorbancia se pueden relacionar con la concentración de células en el sobrenadante en una posición determinada, lo que hace posible monitorear el progreso de la sedimentación.

En concordancia con lo expuesto por la teoría de Kynch (Brouwers, Meire, Toorman, Beeck, & Lataire, 2023), se identificaron tres fases en el proceso de sedimentación de las células de *RS*. La primera fase ocurrió hasta los 5 minutos (Figura 19), caracterizada por un decaimiento lineal, debido a que la tasa de velocidad de sedimentación es constante. La segunda fase tuvo lugar entre los 5 y 10 minutos, y en esta, la velocidad de sedimentación disminuyó debido a la obstaculización, lo cual pudo deberse a dos factores; la resistencia causada por la fuerza boyante generada al sedimentarse las células (Ecuación 4 y 6), y el aumento en la densidad de los sólidos totales, que incrementó las colisiones entre las células.

Por último, se observó entre los 10 y 20 minutos (Figura 19) la estabilización del valor de absorbancia. Esta fase se identificó como la fase de consolidación, que se debe nuevamente a un cambio en la densidad. En este punto, se alcanzó la concentración máxima de la capa empacada de células de *RS*, en el fondo de los recipientes de centrifugación; por lo que se establece que fue posible la separación de las células de *RS* de la solución extraída de las plantas de tomate.

Se muestra también, en la figura 19, la curva de sedimentación del control negativo (curva naranja), que consistió en una muestra extraída de una planta de tomate no inoculada con *RS*. Esta demostró el mismo comportamiento de sedimentación descrito, sin embargo, la fase inicial de sedimentación constante presentó un decaimiento menor; que así mismo, se puede explicar por la ausencia del inóculo inicial y por lo tanto menor concentración de sólidos en la solución extraída.

Según el análisis ANOVA de las muestras experimentales sometidas a centrifugación (Cuadro 19, Sección Anexos), se obtiene que $F > 4.6$ (Valor crítico) y $p < 0.05$, lo cual sugiere que las

mediciones de absorbancia no fueron completamente consistentes entre réplicas (Serrano, 2003). Sin embargo, esto puede atribuirse a factores biológicos como la variabilidad en la respuesta de la planta frente a la infección bacteriana, lo cual puede generar variaciones en la población de bacterias extraída (Kumara, Cooray, Ambanpola, & Thiruchelvan, 2022); factores experimentales, como la pérdida de bacterias en el proceso de filtrado y transferencia de solución, y la presencia de contaminantes en el sobrenadante, lo cual puede afectar las mediciones de absorbancia. Para disminuir el efecto relacionado con los factores de error, se recomienda estudiar el proceso de filtración al vacío para determinar la presión y el medio filtrante adecuado, en base al tamaño del poro, con la finalidad de minimizar la pérdida de células, y lograr una mejor separación del material vegetal, lo cual a su vez contribuya a reducir el error en las medidas de absorbancia.

En el cuadro 10, se muestran los conteos de colonias de bacterias recuperadas mediante un proceso de centrifugación a 570 rpm durante 5 min y 4 °C; que se realizó para evaluar la viabilidad de las células de *RS ILUX*. Se obtuvo un promedio de 8 UFC para las muestras de *RS ILUX* recuperadas, mientras que, para los controles negativos, se obtuvo 14 y 0 UFC, en el caso de la muestra sin inoculación de bacteria (control 1) e inoculada con la cepa de RS salvaje (control 2), respectivamente.

La ausencia de crecimiento en el control 2, pudo deberse a diferentes factores: la eficiencia de la propagación de la bacteria en la planta, un exceso de aplicación de fuerza durante el proceso de maceración, y un volumen alto de dilución de la solución de células recuperada. El primer factor se relaciona con la posible variación en la disponibilidad de nutrientes en la planta, lo cual influye en el crecimiento y concentración final de las células bacterianas (Kumara, Cooray, Ambanpola, & Thiruchelvan, 2022). Por otro lado, un exceso de fuerza en el proceso de maceración pudo provocar la lisis de las células (Harrison, Todd, Rudge & Petrides, 2003). Se considera que el volumen de dilución fue determinante en los resultados obtenidos para todas las muestras, por lo que se sugiere realizar pruebas utilizando diferentes factores de dilución de la suspensión de bacterias extraída, para identificar el valor más adecuado para realizar un conteo de colonias. También se considera conveniente, comparar la tasa de viabilidad de las células a partir de diferentes velocidades de centrifugación, para establecer los parámetros que permitan maximizar la recuperación de bacterias viables.

Por otro lado, con respecto al análisis estadístico de los datos, la desviación estándar obtenida para las muestras que presentaron crecimiento fue de 7.78 y 3.30, en el caso del control 1 y *RS ILUX*, respectivamente. Estos valores reflejan un nivel de dispersión considerable en los datos, especialmente en el caso del control 1, lo cual se puede asociar con factores experimentales y biológicos explicados anteriormente. Para contrastar el análisis de la dispersión, debido a que el comportamiento del crecimiento bacteriano sigue una distribución normal (Paulson, 2008); se determinó un intervalo de confianza del 95% de ± 10.78 y ± 4.58 , para el control 1 y *RS ILUX*, respectivamente. La amplitud relativamente estrecha de estos rangos sugirió un nivel de dispersión aceptable con respecto a la media, y, por lo tanto, los resultados se consideran congruentes. Se recomienda realizar cuatro réplicas como mínimo para todas las muestras experimentales,

incluyendo los controles, para mejorar la aproximación de los análisis estadísticos y, por lo tanto, la confiabilidad de los resultados.

De forma conjunta, con el fin de evaluar la viabilidad de las células de *RS ILUX* recuperadas, se realizó una tinción de Gram, que se muestra en la figura 20. En el montaje se apreció una coloración rosada característica de las bacterias gramnegativas, debido a la retención de la safranina como colorante de contraste a través de la capa de lipopolisacáridos; lo cual sugirió que la pared celular se mantuvo viable (Tortora, Funke, & Case, 2007). Estos resultados demuestran que fue posible la extracción de células viables y reproducibles de *RS* a partir del proceso de centrifugación a 570 rpm durante 5 min y 4 °C. Comparativamente, Basumatary, et al. (2021) en su estudio para el aislamiento y caracterización de bacterias endofíticas del follaje del tomate, no incluyeron el uso de una operación de separación en la metodología para recuperar las células de bacterias de las muestras vegetales. Lo anterior no permite un conteo reproducible, además de que puede conducir a una reducción en el crecimiento de bacterias debido a contaminantes. Por lo que, en base al estudio experimental realizado, se resalta que el proceso de centrifugación permitió mejorar la pureza del cultivo y concentrar las células viables de *RS ILUX*, así como la reproducibilidad de los resultados del conteo de colonias.

Por último, en la figura 21, se muestra la comprobación de la emisión de bioluminiscencia de las células de *RS ILUX* recuperadas del tallo de plantas de tomate, al tercer día post inoculación. En el campo observado a 490 nm, para las muestras de *RS ILUX* (Figuras 21a), se identificó la abundancia de diversos destellos de luz provenientes de células con forma de bacilo. En comparación con los campos observados para los controles negativos (21b y 21c), en estos no se identificaron los destellos de luz característicos de las células de *RS ILUX*. En la muestra de *RS salvaje* (Figura 21b) se distinguió la morfología de bacilo de las células de *RS* en un plano oscuro; por lo que se confirmó que estas no expresaron emisión de luz alguna. En el caso de la muestra sin inoculación de bacteria, los elementos que se distinguieron se consideraron partículas contaminantes.

Por lo tanto, las observaciones de la figura 21 sugieren que fue posible comprobar la emisión de bioluminiscencia de las células de *RS ILUX* recuperadas de tallo de plantas de tomate, al tercer día post inoculación, utilizando un microscopio de fluorescencia. Estos resultados sugirieron que es potencialmente aplicable el uso de la herramienta en el monitoreo de la propagación de *RS* en un cultivo de tomate. Más aún, la tecnología también podría ser aplicable en otros cultivos y en la industria alimentaria.

Las principales limitaciones que presenta la tecnología de bioluminiscencia para su uso, identificadas en la presente investigación, fueron la baja intensidad de luz y las complicaciones relacionadas con la entrega y expresión de los genes de bioluminiscencia para el desarrollo en tiempo real; dados los recursos y tiempo invertido para el procedimiento de transformación genética, además de los riesgos implicados en el manejo seguro de OMGs (Prakash, Verma, Bhatia, & Tiwary, 2011). Para futuras pruebas experimentales, se recomienda realizar pruebas cuantitativas utilizando un luminómetro o un dispositivo CCD, con la finalidad de determinar si la luz emitida se encuentra dentro de los límites detectables. Así también, se recomienda comparar el proceso de transformación por choque térmico y mediante conjugación bacteriana, con la

finalidad de evaluar la inversión necesaria de tiempo y recursos para llevar a cabo el procedimiento, así como la capacidad de transformación alcanzada.

IX. CONCLUSIONES

- Se seleccionó el plásmido existente *ilux pGEX(-)* para la transformación de *RS* con la finalidad de inducir la expresión de bioluminiscencia, mediante la comparación de componentes genéticos, como una mayor frecuencia de transformación a partir de recombinación homóloga, simplicidad de aplicación al poseer integrado el operón *luxCDABE*, reduciendo la inversión en costos y tiempo, y un tamaño molecular razonable de 10,873 pb, además de un nivel de confiabilidad alto sugerido por la cantidad de solicitudes según el proveedor.
- Se comprobó que las células de *RS* se transformaron exitosamente, ya que se identificó la emisión de bioluminiscencia a partir de un microscopio de fluorescencia. No fue posible verificar el procedimiento a partir de PCR, según los resultados observados en el gel de electroforesis; lo cual pudo deberse a la interferencia de ADN cromosomal co-purificado en el proceso de extracción del plásmido.
- Se recuperaron las células viables de *RS* de la solución extraída de plantas de tomate, mediante un proceso de centrifugación a 570 rpm durante 5 min y 4 °C. Se obtuvo un promedio de 8 UFC para *RS ILUX*, con una desviación estándar de 3.30 y un intervalo de confianza del 95% de ± 4.58 ; dada la amplitud estrecha del rango correspondiente, se consideró un nivel de dispersión aceptable, y, por lo tanto, la congruencia de los resultados. Esto se validó, además, mediante la tinción de Gram realizada, en la cual se observó la coloración rosada característica de la bacteria, lo cual sugirió que la pared celular se mantuvo viable.
- Se comprobó la emisión de bioluminiscencia de las células de *RS ILUX* recuperadas del tallo de plantas de tomate, utilizando un microscopio de fluorescencia, lo cual sugirió que es potencialmente aplicable el uso de la herramienta en el monitoreo de la propagación de *RS* en un cultivo de tomate.

X. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar un kit maxiprep para la extracción del plásmido de la cepa donante, ya que permite tratar volúmenes de cultivo más grandes, lo cual facilita el manejo y control de las muestras, y a su vez, puede contribuir a la mejora los rendimientos (100 ug – 1 mg) y pureza de ADN.
- Se sugiere evaluar el uso de gentamicina o tetraciclina como marcadores de selección para la transformación de *RS*, con el fin de cuantificar la capacidad de transformación a partir del conteo de las colonias transformadas, así como para comparar con los resultados obtenidos en la comprobación a partir de la expresión de bioluminiscencia.
- Se recomienda estudiar el proceso de filtración al vacío para determinar la presión y el medio filtrante adecuado, en base al tamaño del poro, con la finalidad de minimizar la pérdida de células, y lograr una mejor separación del material vegetal, lo cual a su vez contribuya a reducir el error en las medidas de absorbancia.
- Se recomienda comparar la tasa de viabilidad de las células a partir de diferentes velocidades de centrifugación, para establecer los parámetros que permitan maximizar la recuperación de bacterias viables.
- Se recomienda cuantificar la emisión de bioluminiscencia de las muestras de células de *RS* recuperadas, utilizando un luminómetro o un dispositivo CCD, con la finalidad de determinar si la luz emitida se encuentra dentro de los límites detectables.
- Se recomienda comparar el proceso de transformación por choque térmico y mediante conjugación bacteriana, con la finalidad de evaluar la inversión necesaria de tiempo y recursos para llevar a cabo el procedimiento, así como la capacidad de transformación alcanzada.

XI. ANEXOS

A. Referencias

- Addgene. (2024). *ilux pGEX(-)*. Obtenido de <https://www.addgene.org/107879/>
- Addgene. (2024). *Molecular Biology Reference*. Obtenido de Educational Resources: <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/>
- Addgene. (2024). *pBBR1MCS-2*. Obtenido de <https://www.addgene.org/85168/>
- Addgene. (2024). *pBEN276*. Obtenido de <https://www.addgene.org/69150/>
- Addgene. (2024). *Pouring LB Agar Plates*. Obtenido de Protocols: <https://www.addgene.org/protocols/pouring-lb-agar-plates/>
- Álvarez, P. (2014). *DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA BACTERIA Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Smith 1910), EN SEMILLAS DE TOMATE (Solanum lycopersicum L.)*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- AMGEN. (2019). *PCR de colonias. Guía para el estudiante*. AMGEN Foundation.
- Anand, U., Singh, A., Oleksak, P., Mishra, A., Krejcar, O., Raval, I., . . . Kuca, K. (2022). Recent advances in the potential applications of luminescence-based, SPR-based, and carbon-based biosensors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2827-2853. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-022-11901-6>
- Ares, M., Rocha, E., & Gonzalez, B. (2021). Evolution of ColE1-like plasmids across γ -Proteobacteria: From bacteriocin production to antimicrobial resistance. *PLoS Genet.*, 17(11). doi:10.1371/journal.pgen.1009919
- Atkins, P., & De Paula, J. (2006). *Atkins Química Física*. Madrid: University Press.
- Basumatary, B., Das, D., Choudhury, B., Dutta, P., & Ashok, B. (2021). Isolation and characterization of endophytic bacteria from tomato foliage and their in vitro efficacy against root-knot nematodes. *The journal of nematology*. doi:10.21307/jofnem-2021-104.
- Been, K., & Sills, G. (1981). Self-weight consolidation of soft soils: an experimental and theoretical study. *Géotechnique*, 31(4), 519-535. doi:10.1680/geot.1981.31.4.519
- Benton, T. (2017). Food Security. En B. Thomas, B. Murray, & D. Murphy, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)* (págs. 19-22). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-394807-6.00039-3.
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2008). *Bioquímica*. Barcelona: Reverté.
- Berthold. (2024). *¿Qué es un luminómetro?* Obtenido de <https://www.berthold.com/es/bioanalitica/conocimiento/glosario/luminometro/>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays Biochem.*, 60(1). doi:10.1042/EBC20150001

- Bolivar, F., Rodríguez, R., Greene, P., Betlach, M., Heyneker, H., Falkow, S., & Crosa, J. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 95-113.
- Brouwers, B., Meire, D., Toorman, E., Beeck, J., & Lataire, E. (2023). Conditioning procedures to enhance the reproducibility of mud settling and consolidation experiments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 290. doi:10.1016/j.ecss.2023.108407
- Cano, H. (2006). *Determinación de bacterias fitopatógenas en cultivos de papaya (Carica papaya) en finca La Estancia, municipio de La Libertad, Petén, Guatemala*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Canon. (2024). *Explicación de los sensores de imagen*. Obtenido de Tecnología: <https://www.canon.es/pro/infobank/image-sensors-explained/#ccd>
- Carter, M., Essner, R., Goldstein, N., & Iyer, M. (2022). Chapter 10 - Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. En M. Carter, R. Essner, N. Goldstein, & M. Iyer, *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Third Edition)* (págs. 227-243). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-818646-6.00014-2
- Center for climate and energy solutions. (2024). *Main Greenhouse Gases*. Obtenido de C2ES: <https://www.c2es.org/content/main-greenhouse-gases/>
- Ceroni, F., Boo, A., Furini, S., Goroehowski, T., Borkowski, O., Ladak, Y., . . . Ellis, T. (2018). Burden-driven feedback control of gene expression. *Nature Methods*, 15, 387-393. Obtenido de <https://doi.org/10.1038/nmeth.4635>
- Champoiseau. (2009). *Ralstonia solanacearum raza 3 biovar 2*. Universidad de Florida.
- Champosieau, & P. (2009). *Ralstonia solanacearum raza 3 biovar 2*. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Obtenido de http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/Trainingmodules/RalstoniaR3b2_Sptms_Module.html
- Coleman, S. (31 de Marzo de 2023). *Handling Genetically Modified Organisms in the Lab: Do's and Dont's*. Obtenido de Labcompare: <https://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/595770-Handling-Genetically-Modified-Organisms-in-The-Lab-Do-s-and-Donts/>
- Concha, F., & Bustos, M. (1991). Settling velocities of particulate systems, 6. Kynch sedimentation processes: batch settling. *International Journal of Mineral Processing*, 193-212.
- Coupat, B., Chaumeille, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., Nesme, X., & Bertolla, F. (2008). Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 14–24. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00552.x
- CSH . (2024). *SOC Medium*. Obtenido de Cold Spring Harbor Protocols: <https://cshprotocols.cshlp.org/content/2018/3/pdb.rec098863.short>

- Czamanski, L., Antunes, C., Martins, L., De Fátima, L., Oliveira, L., Guazzaroni, M., & Silva, R. (2019). The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial Biotechnology*, *12*(1), 125-147. doi:10.1111/1751-7915.13318
- Dagert, M., & Ehrlich, S. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, *6*(1), 23-28.
- Das, S., & Dash, H. (2014). Cloning and transformation. *Microbial Biotechnology-A Laboratory Manual for Bacterial Systems*, 35-72. doi:10.1007/978-81-322-2095-4_2
- DeWitt, W., & Helinski, D. (1965). Characterization of colicinogenic factor E1 from a non-induced and a mitomycin C-induced *Proteus* strain. *J Mol Biol*, *13*(3), 692-703. doi:10.1016/S0022-2836(65)80136-X
- Dubnau, D. (1991). The regulation of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbio.*, 11-18.
- EDVOTEK. (2016). *Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa*. The Biotechnology Education Company.
- Fall, S., Mercier, A., Bertolla, F., Calteau, A., Gueguen, L., Perriere, G., . . . Simonet, P. (2007). Horizontal gene transfer regulation in bacteria as a “spandrel” of DNA repair mechanisms. *PLoS ONE*(10). doi:10.1371/journal.pone.0001055
- FAO. (2 de Junio de 2021). *Climate change fans spread of pests and threatens plants and crops, new FAO study*. Obtenido de Food and Agriculture Organization of the United States: <https://www.fao.org/newsroom/detail/Climate-change-fans-spread-of-pests-and-threatens-plants-and-crops-new-FAO-study/en>
- FAO. (2021). *Corredor Seco*. Obtenido de Plataforma de conocimientos sobre agricultura familiar: <https://www.fao.org/family-farming/detail/es/c/1415695/>
- FAO. (2022). *Indicador 2.1.1 - Prevalencia de la subalimentación*. Obtenido de Portal de datos de indicadores de los ODS: <https://www.fao.org/sustainable-development-goals-data-portal/data/indicators/2.1.1-prevalence-of-undernourishment/es>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2024). *The state of food security and nutrition in the world. Urbanization, agrifood systems transformation and healthy diets across the rural-urban continuum*. Roma: FAO. Obtenido de <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/1c940464-8571-474b-b028-4ddcb385ac48/content/cd1254en.html#gsc.tab=0>
- Forbes, B., Sahm, D., & Trevino, E. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires: Médica Panamerica.
- Ford, T. (18 de Febrero de 2016). *Plasmids 101: Restriction Cloning*. Obtenido de addgene blog: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-restriction-cloning>

- Fujimori, S., Hasegawa, T., Rogel, J., Su, X., Havlik, P., Krey, V., . . . Riahi, K. (2018). Inclusive climate change mitigation and food security policy under 1.5 °C climate goal. *Environmental Research Letters*, 13. doi:10.1088/1748-9326/aad0f7
- García, R., Kerns, J., & Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Quick Diagnostic Guide. *Plant Health Progress*, 20(1). doi:10.1094/PHP-04-18-0015-DG
- Gregor, C., Gwosch, K., Sahl, S., & Hell, S. (2018). Strongly enhanced bacterial bioluminescence with the lux operon for single-cell imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(5), 962-967.
- Harrison, R., Todd, P., Rudge, S., & Petrides, D. (2003). *Bioseparations science and engineering*. Nueva York: Oxford.
- Howe, K., Karsi, A., Germon, P., Wills, R., Lawrence, M., & Bailey, R. (2010). Development of stable reporter system cloning luxCDABE genes into chromosome of *Salmonella enterica* serotypes using Tn7 transposon. *BMC Microbiol.* doi:10.1186/1471-2180-10-197
- INSA Lyon. (2022). *Fiat Lux INSA Lyon 1 - hardware*. Obtenido de IGem 2022: <https://2022.igem.wiki/insa-lyon1/index.html>
- INSA Lyon. (2022). *Fiat Lux INSA Lyon 1 - software*. Obtenido de IGem 2022: <https://2022.igem.wiki/insa-lyon1/software#>
- INSA Lyon. (2022). *Project Description*. Obtenido de Fiat Lux INSA Lyon 1 IGEM 2022: <https://2022.igem.wiki/insa-lyon1/description#>
- Joong, P., Singh, G., Huang, C., Koyyappurath, S., Seo, J., Mao, H., . . . Chau, N. (2021). Rapid Detection and Quantification of Plant Innate Immunity Response Using Raman Spectroscopy. *Front. Plant Sci.*, 12. doi:10.3389/fpls.2021.746586
- Karcher, S. (1995). 2 - RECOMBINANT DNA CLONING. En S. Karcher, *Molecular Biology* (págs. 45-134). Indiana: Academic Press. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123977205500360>
- Karki, P. (12 de Abril de 2024). *Fluorescence Microscope: Principle, Parts, Uses, Examples*. Obtenido de Microbe Notes: <https://microbenotes.com/fluorescence-microscope-principle-instrumentation-applications-advantages-limitations/>
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 693-695.
- Konne, J., & Adiukwa, P. (2016). SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF SEDIMENTATION RATES OF CuS and BaS IN AQUEOUS MEDIA. *Nigeria Journal of Oil and Gas Technology*, 57-65.
- Kumara, U., Cooray, P., Ambanpola, N., & Thiruchelvan, N. (2022). 23 - Plant-pathogen interaction: Mechanisms and evolution. En R. Soni, D. Chandra, A. Nath, & R. Goel, *Trends of Applied Microbiology for Sustainable Economy* (págs. 655-687). Academic Press.

- Leica . (2019). *LEICA DM1000 - 3000* . Wetzlar: Leica Microsystems.
- Li, J., Li, L., & Sheen, J. (2010). Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology. *Plant Methods*(1). Obtenido de <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-6-1>
- Li, R., Zhang, N., Deng, X., Tao, C., Pei, X., Yue, Y., . . . Li, R. (2024). Tomato bacterial wilt disease outbreaks are accompanied by an increase in soil antibiotic resistance. *Environment International*, *190*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412024004823>
- Li, T., Ou, Y., Ling, S., Gao, M., Deng, X., & Liu, H. (2024). Suppressing *Ralstonia solanacearum* and Bacterial Antibiotic Resistance Genes in Tomato Rhizosphere Soil through Companion Planting with Basil or Cilantro. *Agronomy*, *14*(6). doi:10.3390/agronomy14061129
- Lorenz, M., & Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev*, 563-602. doi:10.1128/mr.58.3.563-602.1994
- Makawa, T., Bhattarai, G., Chiwina, K., Quirong, A., Xiong, H., & Alatawi, I. (2024). An Evaluation of Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*) Resistance in a Set of Tomato Germplasm from the United States Department of Agriculture. *Agronomy*, *14*(2). doi:10.3390/agronomy14020350
- Manen, D., & Caro, L. (1991). The replication of plasmid pSC101. *Molecular microbiology*, 233-237. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02103.x>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., . . . Machado, M. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(6), 614-629. Obtenido de <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Markos, T., & Feyissa, T. (202'). Effect of antibiotics in eliminating bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) from in vitro propagated ginger. *CELL BIOLOGY & DEVELOPMENT*, *4*(1), 46-52. doi:10.13057/cellbioldev/v040105
- Martins, P., Merfa, M. T., & De Souza, A. (2018). Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? *Frontiers Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2018.01099
- Matic, I. (2013). DNA repair | DNA Mismatch Repair and Homologous Recombination. En I. Matic, *Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition)* (págs. 181-187). El Sevier. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819460-7.00547-8>
- McCabe, W., Smith, J., & Harriott, P. (2007). *Operaciones unitarias de la ingeniería química*. México: Mc-Graw Hill Interamericana.
- McNees, C., Law, A., & Moe, L. (2020). Characterization of Endophytic Microbial Communities in Store-Bought Kale Evaluated by Different Plant Tissue Homogenization Methods.

- Phytobiomes Journal*, 211-216. Obtenido de <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PBIOMES-08-19-0046-SC>
- Mendoza, E., Ortega, E., Aragón, W., & Villeda, L. (2018). *Manual de manejo integrado de bacterias*. MAGA.
- Miller, S., Ferreira, J., & LeJeune, J. (2022). Antimicrobial Use and Resistance in Plant Agriculture: A One Health Perspective. *Agriculture*, 12(2). Obtenido de <https://www.mdpi.com/2077-0472/12/2/289#B6-agriculture-12-00289>
- Morel, A., Peeters, N., Vailleau, F., Barberis, P., Jiang, G., Berthomé, R., & Guidot, A. (2018). Plant Pathogenicity Phenotyping of *Ralstonia solanacearum* Strains. *Methods in Molecular Biology*, 223-239. doi:10.1007/978-1-4939-7604-1_18
- Morgan, K. (3 de Abril de 2014). *Plasmids 101: The Promoter Region – Let's Go!* Obtenido de Addgene Blog: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-the-promoter-region>
- Mutka, A., Fentress, S., Sher, H., Berry, J., Pretz, C., Nusinow, D., & Bart, R. (2016). Quantitative, Image-Based Phenotyping Methods Provide Insight into Spatial and Temporal Dimensions of Plant Disease. *Plant Physiol.*, 650-660.
- Naciones Unidas. (2015). *Acuerdo de París*. París: Conferencia de las Partes sobre el Cambio Climático (COP21). Obtenido de <https://unfccc.int/es/acerca-de-las-ndc/el-acuerdo-de-paris>
- Naciones Unidas. (2024). *Causes and Effects of Climate Change*. Obtenido de ONU: <https://www.un.org/en/climatechange/science/causes-effects-climate-change>
- Naciones Unidas. (2024). *Objetivo 2: Poner fin al hambre*. Obtenido de Objetivos de desarrollo sostenible: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/hunger/>
- Nature Education. (2014). *genotype*. Obtenido de definition: <https://www.nature.com/scitable/definition/genotype-234/>
- Nature Education. (2014). *phenotype/phenotypes*. Obtenido de definition: <https://www.nature.com/scitable/definition/phenotype-phenotypes-35/>
- Nature Education. (2014). *Scitable*. Obtenido de conjugation (prokaryotes): <https://www.nature.com/scitable/definition/conjugation-prokaryotes-290/>
- New England Biolabs. (2024). *Colony PCR*. Obtenido de NEB: <https://www.neb.com/en/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-analysis/colony-pcr>
- NIH. (10 de Diciembre de 2024). *Genetic Engineering*. Obtenido de National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Genetic-Engineering>
- Nunes, V., & Duran, N. (2003). BIOLUMINESCENT BACTERIA: LUX GENES AS ENVIRONMENTAL BIOSENSORS. *Brazilian Journal of Microbiology*, 91-96.

- Oxford . (2024). *Cameras for Luminescence Plant Imaging Experiments*. Obtenido de Oxford Instruments: <https://andor.oxinst.com/learning/view/article/detectors-for-luminescence-imaging-experiments>
- Paulson, D. (2008). *Biostatistic and microbiology. A survival Manual*. Nueva York: Springer.
- Prakash, D., Verma, S., Bhatia, R., & Tiwary, B. (2011). Risks and Precautions of Genetically Modified Organisms. *International Scholarly Research Notices*, 2011(1), 1-13. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.5402/2011/369573>
- Rizzo, D., Lichtveld, M., & Mazet, J. (2021). Plant health and its effects on food safety and security in a One Health framework: four case studies. *One Health Outlook*. Obtenido de <https://doi.org/10.1186/s42522-021-00038-7>
- Sanderson, M., Smith, I., Parker, I., & Bootman, M. (2014). Fluorescence Microscopy. *Fluorescence Microscopy*(10). doi:10.1101/pdb.top071795
- ScientificProtocols (Dirección). (2013). *Conjugación de bacterias* [Película].
- Serrano, R. (2003). *Introducción al análisis de datos experimentales: tratamiento de datos en bioensayos*. Castelló: Universitat Jaume I.
- Skoog, D., West, D., Holler, J., & Crouch, S. (2015). *Fundamentos de química analítica*. México: Cengage Learning.
- Smith, H., Dannner, D., & Deich, R. (1981). Genetic transformation. *Rev. Biochem*, 41-68.
- Sosbich, T., Lerche, D., & Koch, T. (2019). MEASURING SOLID/LIQUID SEPARATION OF VISCOUS POLYDISPERSE SUSPENSIONS AT GRAVITY AND IN CENTRIFUGAL FIELD. *Particle and slurry characterization*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/337195470_MEASURING_SOLIDLIQUID_SEPARATION_OF_VISCOUS_POLYDISPERSE_SUSPENSIONS_AT_GRAVITY_AND_IN_CENTRIFUGAL_FIELD
- Soto, R., López, L., Ramírez, J., González, P., & Quemé, G. (2023). *Impacto del cambio climático en la inseguridad alimentaria. Áreas afectadas por ETA, IOTA y Julia*. Guatemala: Care.
- Tao, L., Jackson, R., & Cheng, Q. (2005). Directed evolution of copy number of a broad host range plasmid for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 10-17. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1096717604000813>
- Thermo Fisher Scientific. (2024). *Plasmid DNA isolation*. Obtenido de Plasmid DNA Maxiprep Kits: <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/plasmid-isolation/plasmid-dna-maxiprep.html>
- Thompson, M., Sedaghatian, N., & Keasling, H. (2018). Isolation and characterization of novel mutations in the pSC101 origin that increase copy number. *Scientific Reports*, 8(1590). doi:10.1038/s41598-018-20016-w

- Tolmasky, M. (2013). Plasmids. En *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (págs. 362-366). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.01174-8
- Torrance, E., Burton, C., Diop, A., & Bobay, L. (2024). Evolution of homologous recombination rates across bacteria. *Proc. Natl., 121*(18). doi:10.1073/pnas.2316302121
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Madrid: Editorial Panamericana.
- Tsarkova, A. (2021). Luciferins Under Construction: A Review of Known Biosynthetic Pathways. *Frontiers in Ecology and Evolution*. doi:10.3389/fevo.2021.667829
- UCCL. (S.f). *ETAPA DE GERMINACION* . Obtenido de Leguminosas: https://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/legumino/frejol/germinac.htm
- United States Environmental Protection Agency. (7 de Noviembre de 2024). *Basics of Climate Change* . Obtenido de EPA: <https://www.epa.gov/climatechange-science/basics-climate-change>
- Velásquez, A., Castroverde, C., & Yang, S. (2018). Plant-Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Curr Biol.*, 619-634. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29787730/>
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020). Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: from the cellular to the community. *Genes, 11*(11). doi:10.3390/genes11111239
- Wang, Z., Yuan, Z., & Hengge, U. (2004). Processing of plasmid DNA with ColE1-like replication origin. En *Plasmid* (Vol. 51, págs. 149-161). Elsevier. doi:10.1016/j.plasmid.2003.12.002.
- Wei, H., & Wang, H. (2019). Development and applications of bioluminescent and chemiluminescent reporters and biosensors. *Annual review of analytical chemistry*, 129-150. doi:10.1146/annurev-anchem-061318-115027
- Wiggins. (2024). *Filtración al vacío*. Obtenido de <http://es.wiggins.com/show-132-137-1.html>
- Wikipedia. (7 de Febrero de 2018). *Bacterial conjugation*. Obtenido de https://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial_conjugation
- Wikipedia. (6 de Abril de 2024). *ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)*. Obtenido de <https://es.wikipedia.org/wiki/ELISA>
- Wilson, K., & Walker, J. (2000). *Principles and techniques of practical biochemistry*. United Kingdom: Cambridge University Press .
- Xu, C., Zhong, L., Huang, Z., Li, C., Lian, J., Zheng, X., & Liang, Y. (2022). Real-time monitoring of *Ralstonia solanacearum* infection progress in tomato and *Arabidopsis* using bioluminescence imaging technology. *Plant Methods*. Obtenido de <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00841-x>

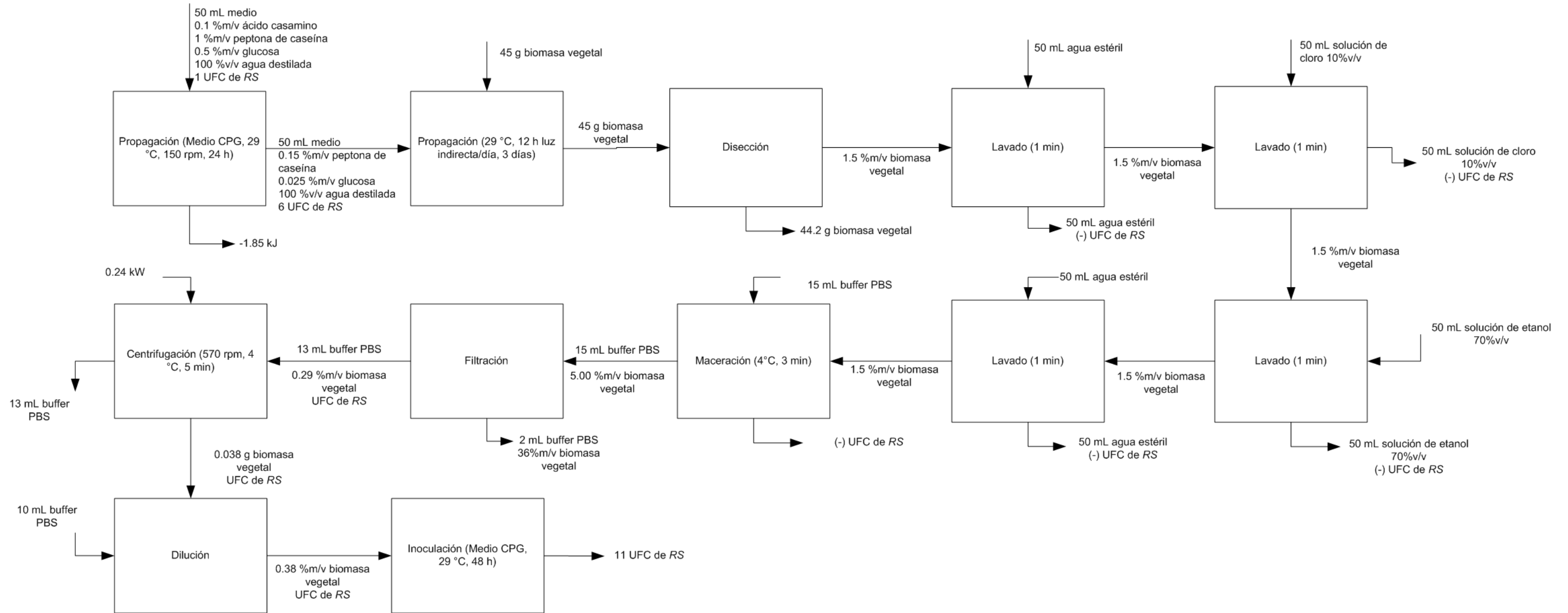
Xu, Y. (2018). *Robust colony PCR from multiple E. coli strains using OneTaq Quick-Load Master Mixes*. NEB.

Zhang, Y., & Janoch, E. (2023). *Guatemala: Una realidad constante de inseguridad alimentaria*. Guatemala: Care.

Zymo Research. (15 de 11 de 2023). *zymoresearch*. Obtenido de ZymoPURE Plasmid miniprep kit: <https://zymoresearch.eu/products/zymopure-ii-plasmid-miniprep-kit>

B. Balances de masa y energía del proceso real

Figura 22. Balance de masa y energía real



En la figura 22 se muestra el balance de masa y energía real para el proceso de infección de una planta de tomate con un cultivo de *RS* y para operaciones necesarias para la recuperación de las células viables. En algunas operaciones, se sugirió la pérdida de cultivo como “(-) UFC de *RS*”.

C. Incertidumbre

No aplica.

D. Cálculos de muestra

Cálculo 1. Balance de masa para la propagación de *RS*

$$\text{entrada} = \text{salida} + \text{reacción} + \text{acumulación}$$

$$\text{entrada} = \text{salida} + \text{reacción}$$

$$\begin{aligned} 0.5\% \frac{m}{v} \text{ glucosa} * 50 \text{ mL} \\ = 0.025\% \frac{m}{v} \text{ glucosa} * 50 \text{ mL} + 0.95 * \left(0.5\% \frac{m}{v} \text{ glucosa} * 50 \text{ mL} \right) \end{aligned}$$

$$0.25 \text{ g glucosa} = 0.0125 \text{ g glucosa} + 0.2375 \text{ g glucosa}$$

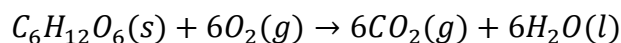
$$0.25 \text{ g glucosa} = 0.25 \text{ g glucosa}$$

El cálculo anterior se realizó para determinar el balance másico de la operación de propagación del microorganismo. Se consideró el sistema como batch o intermitente y se asumió que no presentó acumulación. El mismo análisis fue realizado para las demás operaciones descritas en el proceso.

Cálculo 2. Balance de energía de la propagación de *RS*

$$\Delta H + \cancel{\Delta E_p} + \cancel{\Delta E_k} = Q + \cancel{W_s}$$

$$\Delta H = Q$$



$$\Delta H^\circ = -2803 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

$$50\% * 0.2375 \text{ g glucosa} * \frac{1 \text{ mol glucosa}}{180.16 \text{ g glucosa}} * -2803 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} = -1.85 \text{ kJ}$$

El cálculo anterior se realizó para determinar el balance energético de la operación de propagación del microorganismo. Se consideró el sistema como batch o intermitente y se asumió que para el crecimiento del microorganismo se utilizó el 50% de glucosa mediante la respiración celular aeróbica. Se tomó como referencia el valor estándar de la entalpía de combustión de la glucosa

(Atkins & De Paula, 2006). El mismo análisis fue realizado para las demás operaciones descritas en el proceso.

Cálculo 3. Extrapolación para la recuperación de células de *RS ILUX* en la centrifuga Forma Scientific Inc

$$\omega_2 = \sqrt{\frac{\left(3400 \frac{rev}{min} * \frac{1 min}{60 s} * \frac{2\pi rad}{1 rev}\right)^2 * 0.121 m}{0.258 m * 5 min * \frac{1 min}{60 s}}}$$

$$\omega_2 = 59.44 \frac{rad}{s} * \frac{1 rev}{2\pi rad} * \frac{60 s}{1 min}$$

$$\omega_2 = 567.63 \frac{rev}{min}$$

El cálculo anterior se realizó para determinar los parámetros necesario para realizar la centrifugación de las células de *RS ILUX* en la centrifuga Forma Scientific Inc. Se utilizaron las ecuaciones 8 y 9.

E. Datos originales del experimento

Cuadro 11. Mapa de electroforesis para productos de PCR de *RS*

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Muestra	ES 100	ES PCR Marker	RS1 dil	RS1 dil	RS2 dil	RS2 dil	C+	C+ (2)	BL
Resultado	+	+	-	-	+	+	+	+	-

En el cuadro anterior se muestra el mapa del gel de electroforesis realizado para los productos de PCR de la prueba para *RS*. C+ y C+ (2): controles positivos; ES 100: escalera estándar “100 pb” y ES Marker: Escalera estándar “Maker”; “dil” indica que se utilizó una dilución de la muestra original. El gel de electroforesis y las especificaciones del equipo utilizado se indican en la figura 24.

Cuadro 12. Cuantificación y pureza de la extracción de plásmido

Réplica	Concentración de ADN (ng/μL)	A260/280	A260/230
A1	2,533.4	2.22	2.50
A2	2,669.7	2.21	2.46
A3	3,158	2.09	2.25

En el cuadro anterior se muestran los datos de cuantificación obtenidos para la extracción de plásmido. Se indica la concentración de ADN y medidas de pureza A260/280 y A260/230 que sugieren contaminación por proteínas y químicos, respectivamente. Se utilizó un Nanodrop para las cuantificaciones correspondientes. El gel de integridad del plásmido se muestra en la figura 54,

las réplicas A2 y A3 se trataron con 10 mg/mL de ARNasa, mientras que no se le aplicó este tratamiento a la réplica A1.

Cuadro 13. Cuantificación y pureza de extracciones de colonia

Muestra	Concentración de ADN (ng/ μ L)	A260/280	A260/230
<i>RS salvaje</i>	74.7	1.43	0.48
<i>E. coli ILUX</i>	89.3	1.31	0.51
<i>RS ILUX</i>	56.6	1.31	0.54

En el cuadro anterior se muestran los datos de cuantificación obtenidos para las extracciones de colonia de las cepas indicadas. Se presenta la concentración de ADN y medidas de pureza A260/280 y A260/230 que sugieren contaminación por proteínas y químicos, respectivamente. Se utilizó un Nanodrop para las cuantificaciones correspondientes

Cuadro 14. Mapa de electroforesis para la integridad del plásmido

Pozo	1	2	3	4	5
Muestra	ES 100	ES 1 kb	A1	A2	A3
Resultado	+	+	+	+	+

En el cuadro anterior se muestra el mapa del gel realizado para verificar la integridad del plásmido extraído, utilizando el kit mini prep de Zymo Pure. . ES 100: escalera estándar “100 pb” y ES 1 kb. escalera estándar de “1 kb”. Las réplicas A2 y A3 se trataron con 10 mg/mL de ARNasa, mientras que no se le aplicó este tratamiento a la réplica A1. El gel de integridad del plásmido se muestra en la figura 54 de la sección Anexos.

Cuadro 15. Mapa de electroforesis para productos del PCR ILUX

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Muestra	ES 100	ES Marker	C+	C-	Sac 1	CaCl2 1	Sac 2	CaCl2 2	BL
Resultado	+	+	-	-	-	-	-	-	-

En el cuadro anterior se muestra el mapa del gel de electroforesis realizado para los productos de PCR de la prueba ILUX, para verificar la transformación genética. C+: control positivo *E. coli DH5a ILUX* y C-: control negativo *RS salvaje*. ES 100: escalera estándar “100 pb” y ES Marker: Escalera estándar “Maker”. Se distinguen dos tipos de muestra según el tratamiento aplicado para compatibilizar las células. Sac: tratamiento de sacarosa, CaCl2: tratamiento con cloruro de calcio. El gel se muestra en la sección de Anexos en las figuras 55 y 56.

Cuadro 16. Masa de las muestras de tallo de las plantas de tomate

Muestra	Masa en g (± 0.0005)
SB1	0.753
SB2	0.751
RS WT1	0.753
RS WT2	0.753
RS ILUX1	0.753
RS ILUX2	0.753
RS ILUX3	0.753
RS ILUX4	0.753

En el cuadro anterior se indica la masa obtenida para las muestras diseccionadas del tallo de las plantas de tomate, al tercer día post inoculación. Se utilizó la balanza analítica Ohaus.

Cuadro 17. Datos de absorbancia para las células de *RS* recuperadas de las plantas de tomate

Tiempo (min)	Muestra 1	Muestra 2	Control (-)	Promedio
0	0.117	0.188	0.071	0.1525
5	0.016	0.086	0.033	0.051
10	0.009	0.084	0.031	0.0465
12	0.006	0.082	0.031	0.044
14	0.009	0.082	0.031	0.0455
17	0.004	0.076	0.03	0.04
20	0.004	0.075	0.029	0.0395
23	0.01	0.075	0.032	0.0425

En el cuadro anterior se muestran los datos obtenidos para la absorbancia, de las muestras de células de *RS* recuperadas del tallo de las plantas de tomate al tercer día post inoculación. Se utilizó el espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240 a 600 nm.

Cuadro 18. Parámetros de centrifugación para la recuperación de células de *RS ILUX*

	Centrífuga Fischer Scientific Modelo 228	Centrífuga Forma Scientific Inc.
Radio de la centrífuga (cm)	12.1	25.8
Tiempo equivalente de sedimentación (min)	23	5
Velocidad angular (rpm)	3400	570

En el cuadro anterior se presentan los parámetros utilizados para la extrapolación del proceso de centrifugación para la recuperación de las células de *RS ILUX* en la centrífuga Forma Scientific Inc. Se obtuvieron a partir del cálculo 3.

Cuadro 19. Análisis de varianza de un factor y probabilidad realizado para datos de absorbancia obtenidos en la centrifugación

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.020520563	1	0.020520563	13.826	0.002292621	4.600109937
Dentro de los grupos	0.020778875	14	0.001484205			
Total	0.041299438	15				

En el cuadro anterior se muestran los resultados obtenidos para el análisis de varianza de un factor y probabilidad realizado para los datos de absorbancia obtenidos durante el proceso de centrifugación de las células de *RS*. Se obtuvo este análisis utilizando el software Excel.

F. Glosario

a. ADN (Ácido Desoxirribonucleico)

Molécula que contiene la información genética de los organismos vivos. Consiste en dos cadenas enrolladas en forma de hélice que incluyen las bases nitrogenadas A (adenina), T (timina), G (guanina) y C (citosina).

b. Clonación molecular

Proceso mediante el cual se inserta un fragmento de ADN en un vector para ser amplificado y manipulado en un organismo huésped.

c. Enzimas de restricción

Proteínas que reconocen secuencias específicas de ADN y cortan en esos sitios. Se utilizan para generar fragmentos que pueden ser ensamblados en vectores.

d. Electroforesis

Técnica de laboratorio que separa moléculas, como ADN o proteínas, según su tamaño y carga mediante un campo eléctrico aplicado en un gel de agarosa o poliacrilamida.

e. Elementos genéticos móviles (EGMs)

Unidades de material genético, como transposones, plásmidos e integrones, que pueden transferirse entre genomas o dentro del mismo genoma, facilitando la transferencia horizontal de genes.

f. Ingeniería genética

Conjunto de técnicas que permiten modificar el ADN de un organismo para añadir, eliminar o alterar genes con propósitos específicos.

g. Marcador de selección

Gen incorporado en un vector que confiere una característica detectable, como resistencia a antibióticos, permitiendo identificar células que contienen el vector.

h. Ori (Origen de replicación)

Secuencia específica en un plásmido reconocida por la maquinaria celular que permite la replicación del plásmido en la célula huésped.

i. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Técnica que amplifica un fragmento específico de ADN millones de veces mediante ciclos repetidos de desnaturalización, alineación y extensión.

j. Plásmido

Molécula de ADN circular de doble hebra que se encuentra en bacterias y en algunos organismos eucariotas. Puede actuar como vector para introducir genes de interés en células huésped.

k. Recombinación homóloga

Mecanismo por el cual se integra una secuencia de ADN en el genoma receptor mediante el intercambio de fragmentos genéticamente similares.

l. Transferencia horizontal de genes (THG)

Mecanismo mediante el cual se transfiere material genético entre organismos de la misma o diferente especie sin reproducirse. Ocurre por transformación, transducción o conjugación.

m. Vector de expresión

Plásmido diseñado para permitir la transcripción y traducción de un gen de interés, produciendo una proteína funcional en la célula huésped.

n. Vector de clonación

Plásmido utilizado para almacenar y replicar secuencias de ADN en una célula huésped.

G. Cuadros y figuras

Cuadro 20. Muestreo para verificar la presencia de *RS* en departamentos de Guatemala (Parte I)

RESULTADOS DE CULTIVOS POSITIVOS DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>					
Muestra	Codigo	Cultivo	Localidad	Departamento	Ralstonia
1	EO0091	Tomate	La Union Barrios	Baja Verapaz	Positivo
2	EO0067	Tomate	Aldea San Nicolas	Baja Verapaz	Positivo
3	EO0092	Tomate	Purulha	Baja Verapaz	Positivo
4	EO0099	Tomate	Santa Barbara	Baja Verapaz	Positivo
5	EO0012	Tomate	Santa Barbara	Baja Verapaz	Positivo
6	EO00101	Tomate	Aldea las Tunas	Baja Verapaz	Positivo
7	EO0014	Tomate	Matanzas	Baja Verapaz	Positivo
8	EO 0103	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
9	EO 0102	Tomate	Purulha	Baja Verapaz	Positivo
10	EO122	Tomate	Rabinal	Baja Verapaz	Positivo
11	EO120	Tomate	Rabinal	Baja Verapaz	Positivo
12	EO111	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
13	EO116	Tomate	Rabinal	Baja Verapaz	Positivo
14	EO113	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
15	EO114	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
16	EO104	Tomate	Rabinal	Baja Verapaz	Positivo
17	EO119	Tomate	Rabinal	Baja Verapaz	Positivo
18	EO109	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo

Fuente: (Mendoza, Ortega, Aragón, & Villeda, 2018).

Cuadro 21. Muestreo para verificar la presencia de *RS* en departamentos de Guatemala (Parte II)

RESULTADOS DE CULTIVOS POSITIVOS DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>					
Muestra	Código	Cultivo	Localidad	Departamento	Ralstonia
19	EO112	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
20	EO115	Tomate	Rabinal	Baja Verapaz	Positivo
21	EO124	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
22	WA025	Tomate	San Juan Monjas	Jalapa	Positivo
23	EO 126	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
24	EO 126	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
25	EO 126	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
26	WA 171	Chile	San Pedro Pinula	Jalapa	Positivo
27	EO 135	Tomate	La Union Barrios	Baja Verapaz	Positivo
28	EO 135	Tomate	La Union Barrios	Baja Verapaz	Positivo
29	EO 135	Tomate	La Union Barrios	Baja Verapaz	Positivo
30	EO 126	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
31	EO 126	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
32	EO 126	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
33	EO 126	Tomate	Salamá	Baja Verapaz	Positivo
34	EO 160	Tomate	Cubulco	Baja Verapaz	Positivo
35	EO 160	Tomate	Cubulco	Baja Verapaz	Positivo
36	EO117	Tomate	Chiquimula	Chiquimula	Positivo
37	LV	Tomate	San Raymundo	Guatemala	Positivo
38	LV 146B	Tomate	El Paraiso Palencia	Guatemala	Positivo
39	WA 187	Tomate	Monjas	Jalapa	Positivo
40	WA137	Tomate	San Manuel Chaparrón	Jalapa	Positivo
41	WA151	Tomate	Mataquescuintla	Jalapa	Positivo
42	WA151	Tomate	Mataquescuintla	Jalapa	Positivo
43	WA151	Tomate	Mataquescuintla	Jalapa	Positivo
44	WA 141	Tomate	Jalapa	Jalapa	Positivo
45	WA 141	Tomate	Jalapa	Jalapa	Positivo
46	WA 141	Tomate	Jalapa	Jalapa	Positivo
47	WA 184	Tomate	Jalapa	Jalapa	Positivo
48	WA 185	Tomate	Jalapa	Jalapa	Positivo
49	WA 185	Tomate	Jalapa	Jalapa	Positivo
50	WA 187	Tomate	Monjas	Jalapa	Positivo

Fuente: (Mendoza, Ortega, Aragón, & Villeda, 2018).

Cuadro 22. Muestreo para verificar la presencia de *RS* en departamentos de Guatemala (Parte III)

RESULTADOS DE CULTIVOS POSITIVOS DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>					
Muestra	Codigo	Cultivo	Localidad	Departamento	Ralstonia
51	WA 187	Tomate	Monjas	Jalapa	Positivo
52	WA094	Tomate	Jocote Dulce	Jutiapa	Positivo
53	WA062	Tomate	Laguna de Retana	Jutiapa	Positivo
54	WA067	Tomate	Laguna de Retana	Jutiapa	Positivo
55	WA 168	Tomate	Agua Blanca	Jutiapa	Positivo
56	WA 156	Tomate	Suchitan	Jutiapa	Positivo
57	WA 156	Tomate	Suchitan	Jutiapa	Positivo
58	WA 157	Tomate	Suchitan	Jutiapa	Positivo
59	WA 157	Tomate	Suchitan	Jutiapa	Positivo
60	WA 157	Tomate	Suchitan	Jutiapa	Positivo
61	WA 178	Tomate	Suchitan	Jutiapa	Positivo
62	WA 179	Tomate	Suchitan	Jutiapa	Positivo
63	WA 179	Tomate	Suchitan	Jutiapa	Positivo
64	WA 180	Tomate	Suchitan	Jutiapa	Positivo
65	WA 180	Tomate	Suchitan	Jutiapa	Positivo
66	WA 173	Tomate	Asunción Mita	Jutiapa	Positivo
67	WA 173	Tomate	Asunción Mita	Jutiapa	Positivo
68	WA 174	Tomate	Agua Blanca	Jutiapa	Positivo
69	WA 180	Tomate	Laguna de Retana	Jutiapa	Positivo
70	WA 183	Tomate	Laguna de Detana	Jutiapa	Positivo
71	WA 183	Tomate	Laguna de Detana	Jutiapa	Positivo
72	WA115	Tomate	Santa Rosa de Lima	Santa Rosa	Positivo
73	WA149	Tomate	Santa Rosa de Lima	Santa Rosa	Positivo
74	WA152	Tomate	San Rafael las Flores	Santa Rosa	Positivo
75	EO123	Tomate	Rabinal	Baja Verapaz	Positivo
76	WA 043	Tomate	Nueva Santa Rosa	Santa Rosa	Positivo
77	WA 166	Tomate	San Cruz Naranjo	Santa Rosa	Positivo
78	WA 167	Tomate	Nueva Santa Rosa	Santa Rosa	Positivo
79	WA 170	Tomate	Nueva Santa Rosa	Santa Rosa	Positivo

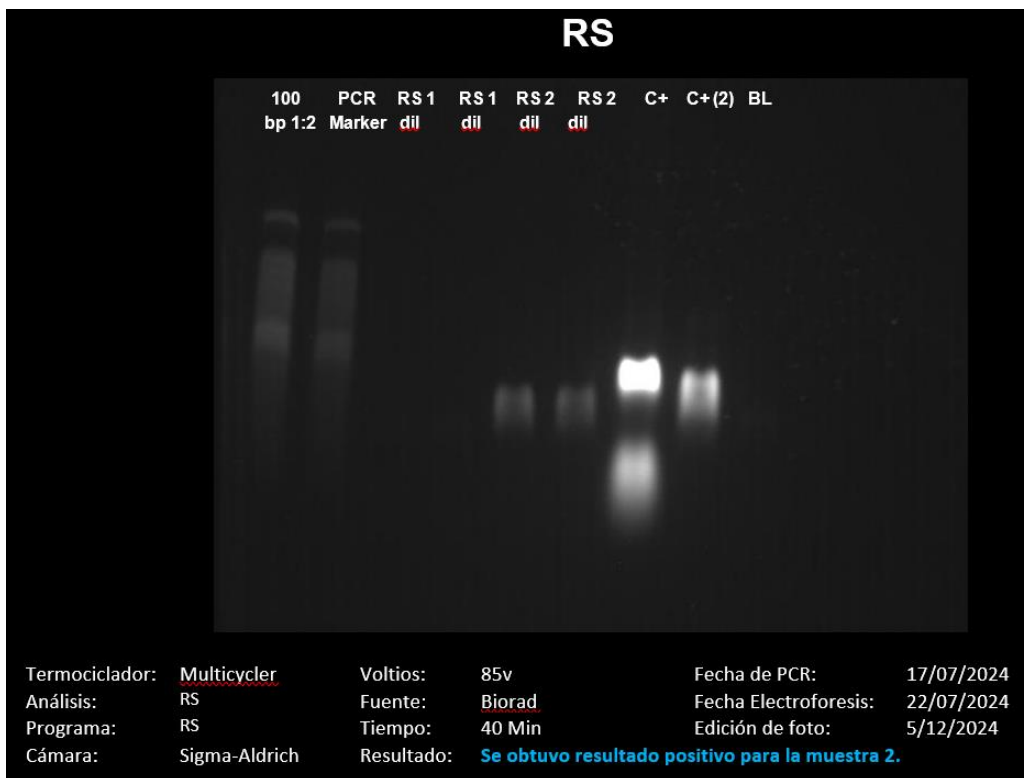
Fuente: (Mendoza, Ortega, Aragón, & Villeda, 2018).

Figura 23. Cultivo de *RS* proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología de FAUSAC



Fuente: (Elaboración propia).

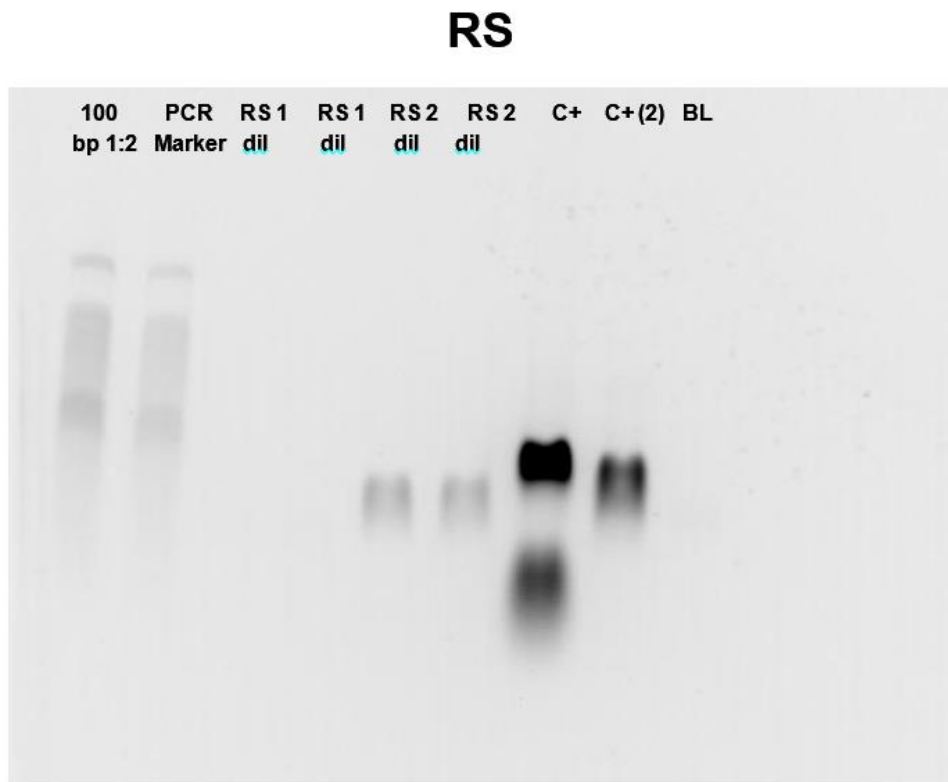
Figura 24. Gel de electroforesis de *RS* aislada



Fuente: (Elaboración propia).

El mapa del gel se presenta en el Cuadro 7 de la Sección de Datos originales. La imagen con colores invertidos para mejorar su visualización se presenta en la Figura 24.

Figura 25. Imagen con colores invertidos del gel de electroforesis de *RS* aislada



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 26. Vista frontal del invernadero destinado para la inoculación de *RS* ILUX



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 27. Vista lateral (1) del invernadero destinado para la inoculación de *RS ILUX*



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 28. Vista lateral (2) del invernadero destinado para la inoculación de *RS ILUX*



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 29. Vista trasera del invernadero destinado para la inoculación de *RS ILUX*



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 30. Desinfección de invernadero con equipo de aspersión



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 31. Limpieza de invernadero con hidro lavadora



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 32. Equipo de protección para desinfección de invernadero



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 33. Ingreso al área de invernadero



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 34. Tratamiento de residuos líquidos de bacteria transformada



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 35. Tratamiento de residuos sólidos de bacteria transformada.



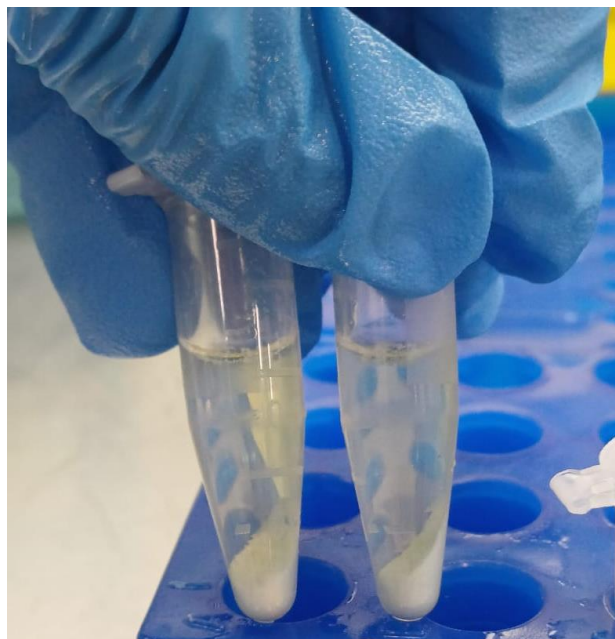
Fuente: (Elaboración propia).

Figura 36. Clasificación de residuos biopeligrosos



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 37. Procedimiento de extracción de plásmido



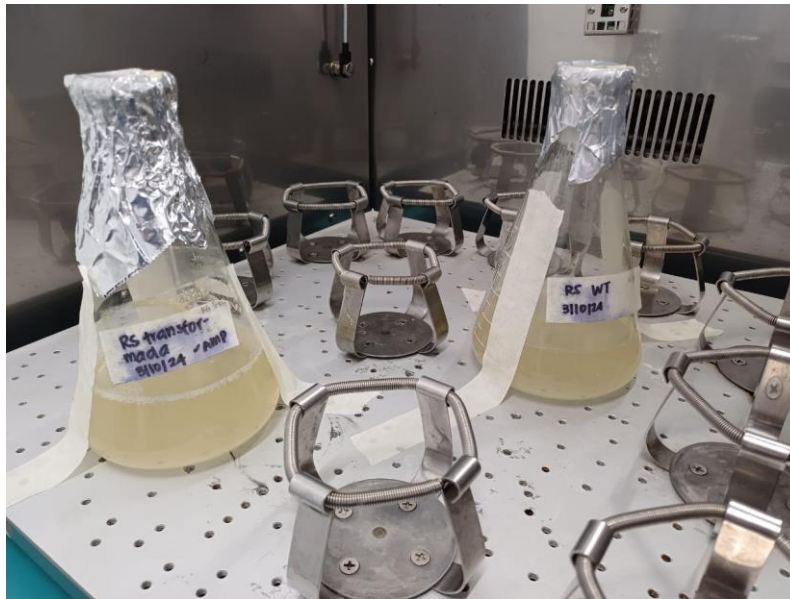
Fuente: (Elaboración propia).

Figura 38. Procedimiento de compatibilización de células de *RS*



Fuente: (Elaboración propia)

Figura 40. Propagación de cultivos de RS y RS ILUX



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 41. Rallado de raíces de la planta de tomate



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 42. Plantas de tomate inoculadas con *RS ILUX*



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 43. Tallo de planta de tomate diseccionado



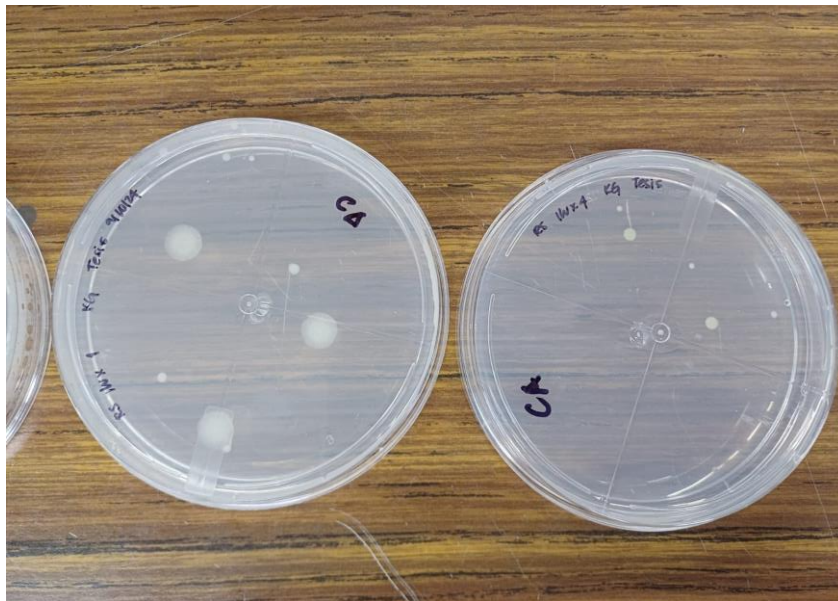
Fuente: (Elaboración propia).

Figura 44. Centrifuga Forma Scientific Inc



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 45. Crecimiento de *RS ILUX* recuperada por centrifugación



Fuente: (Elaboración propia).

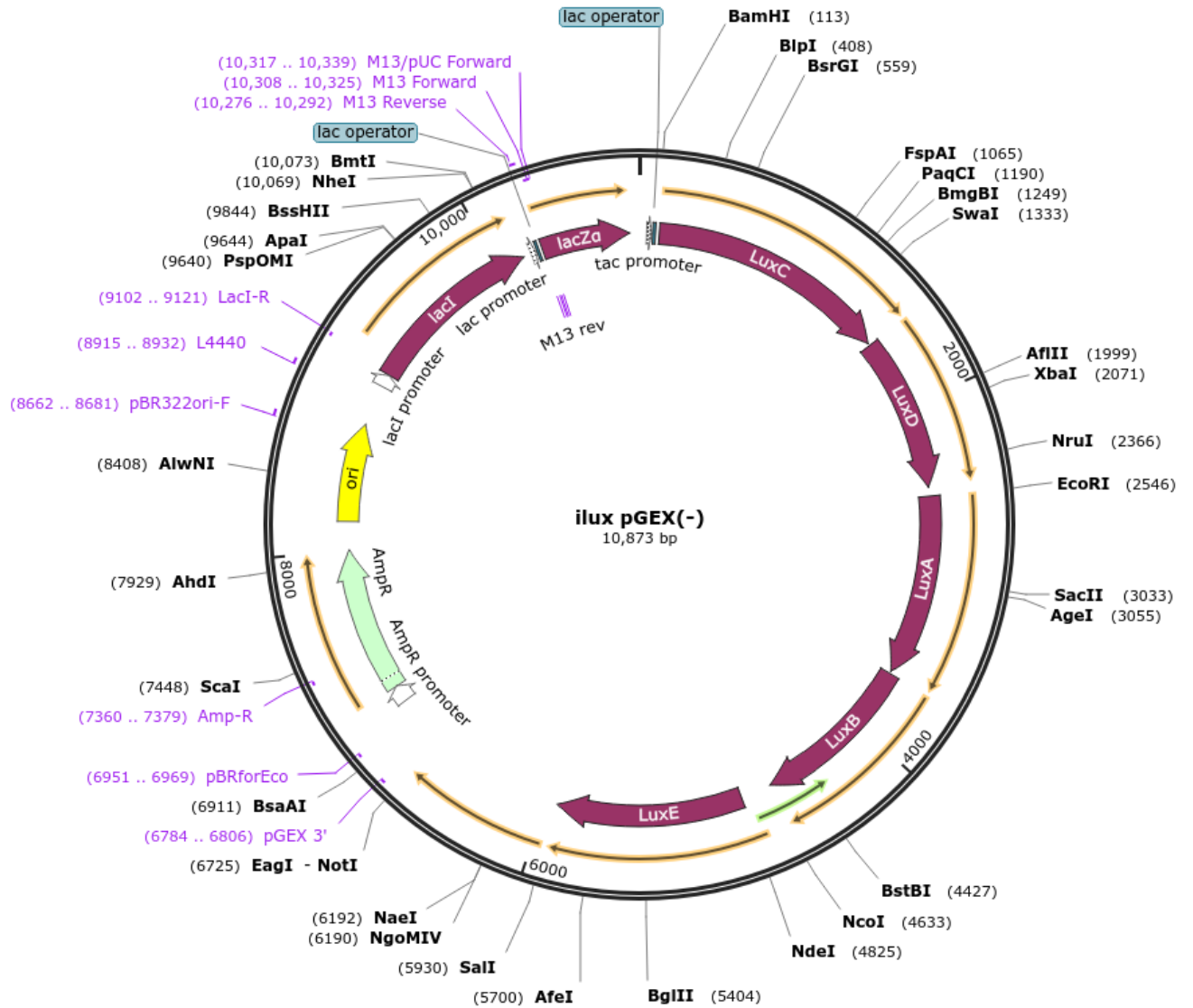
Figura 46. Centrífuga Fisher Scientific



Fuente: (Elaboración propia).

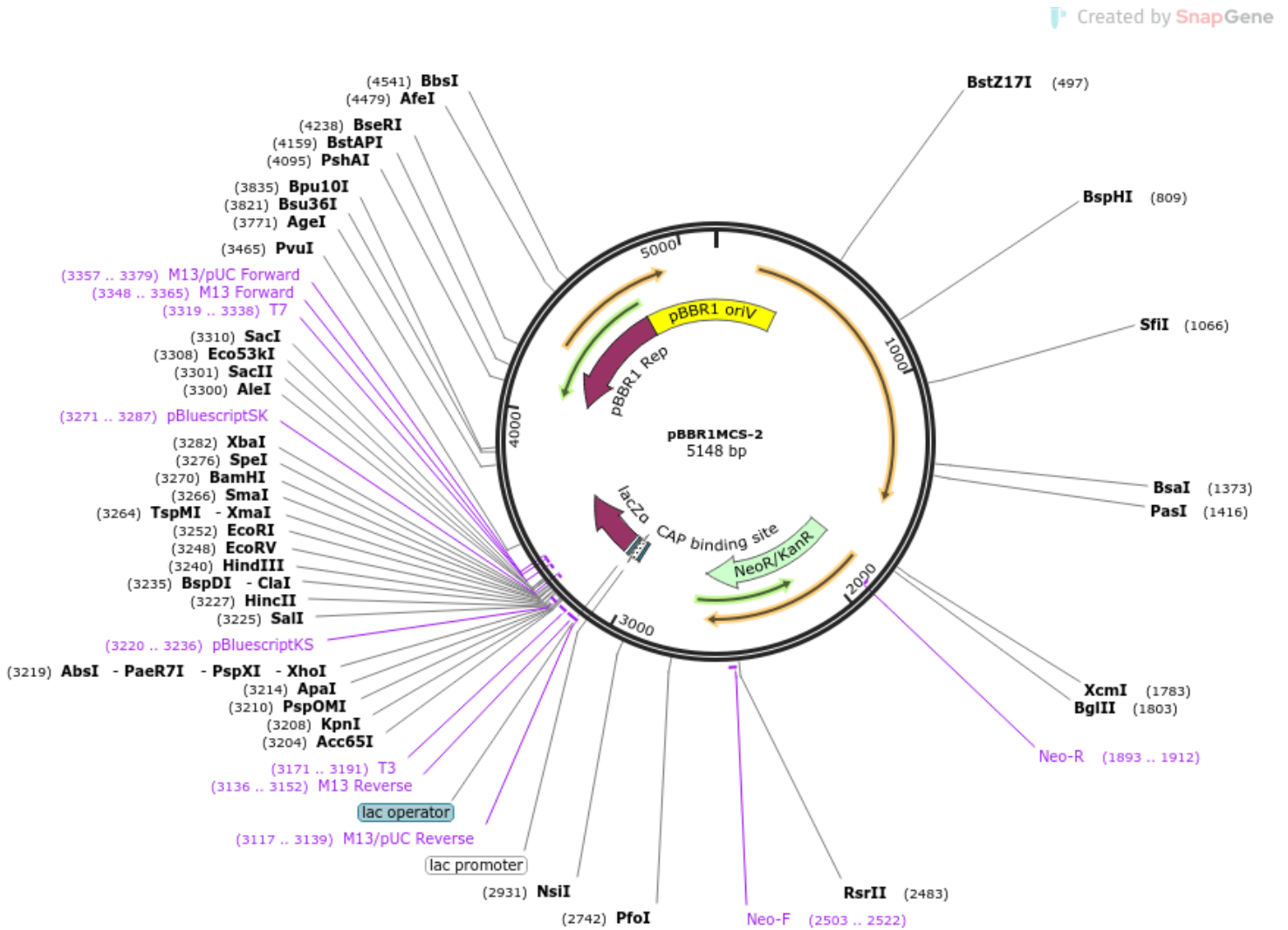
Figura 47. Mapa del plásmido *ilux pGEX(-)*

Created by SnapGene



Fuente: (Addgene, 2024).

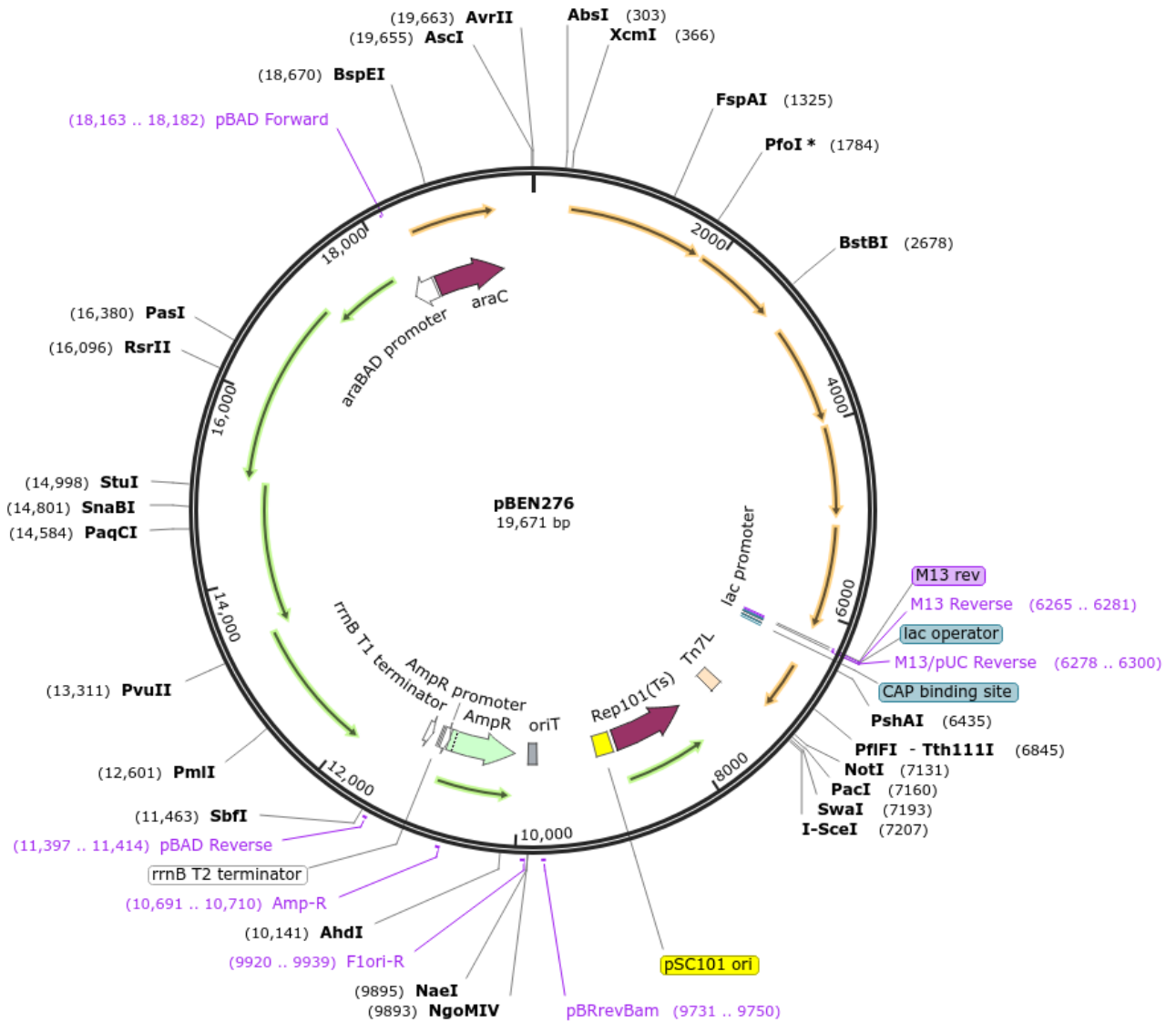
Figura 48. Mapa del plásmido pBBR1MCS-2



Fuente: (Addgene, 2024).

Figura 49. Mapa del plásmido pBEN276

Created by SnapGene



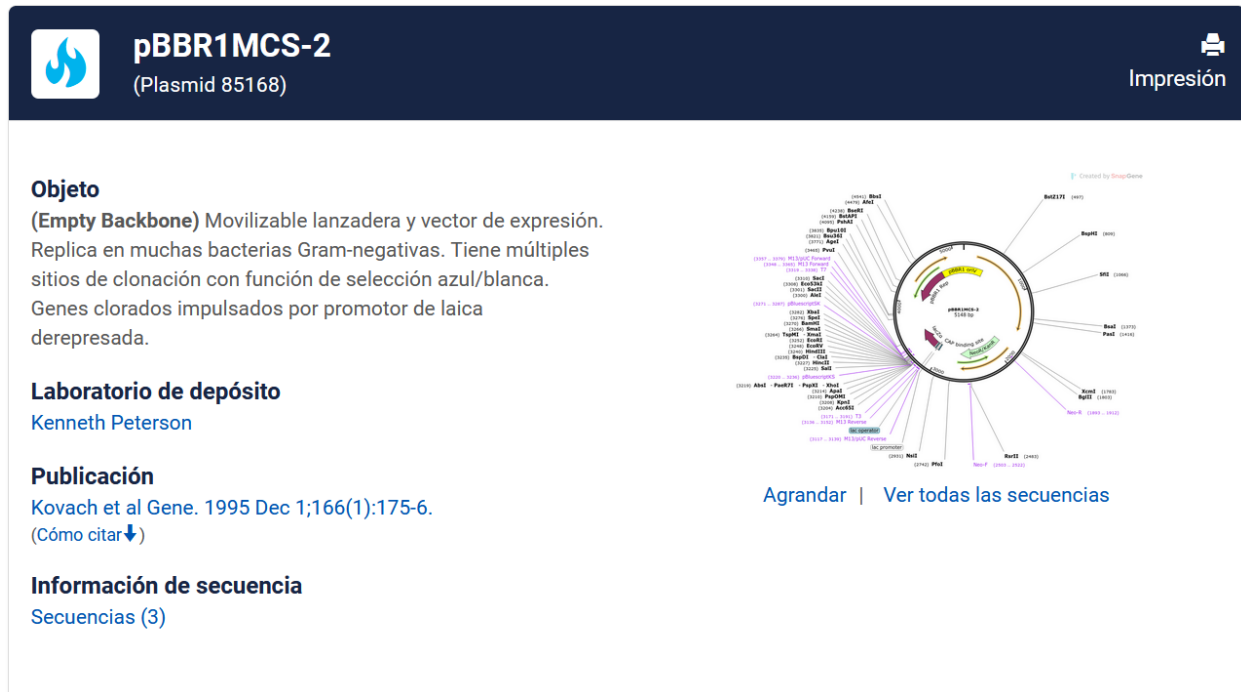
Fuente: (Addgene, 2024).

Figura 50. Descripción del plásmido *ilux pGEX(-)*



Fuente: (Addgene, 2024).

Figura 51. Descripción del plásmido *pBBR1MCS-2*



Fuente: (Addgene, 2024).

Figura 52. Descripción del plásmido *pBEN276*



pBEN276
(Plasmid 69150)



Impresión

Objeto
Integración de la operon luciferasa en Tn7 sitio de inserción de bacterias Gram negativas

Laboratorio de depósito
Pierre Germon

Publicación
Howe et al BMC Microbiol. 2010 Jul 23;10:197. doi: 10.1186/1471-2180-10-197.
(Cómo citar↓)

Información de secuencia
Secuencias (3)






Agrandar | Ver todas las secuencias



Fuente: (Addgene, 2024).

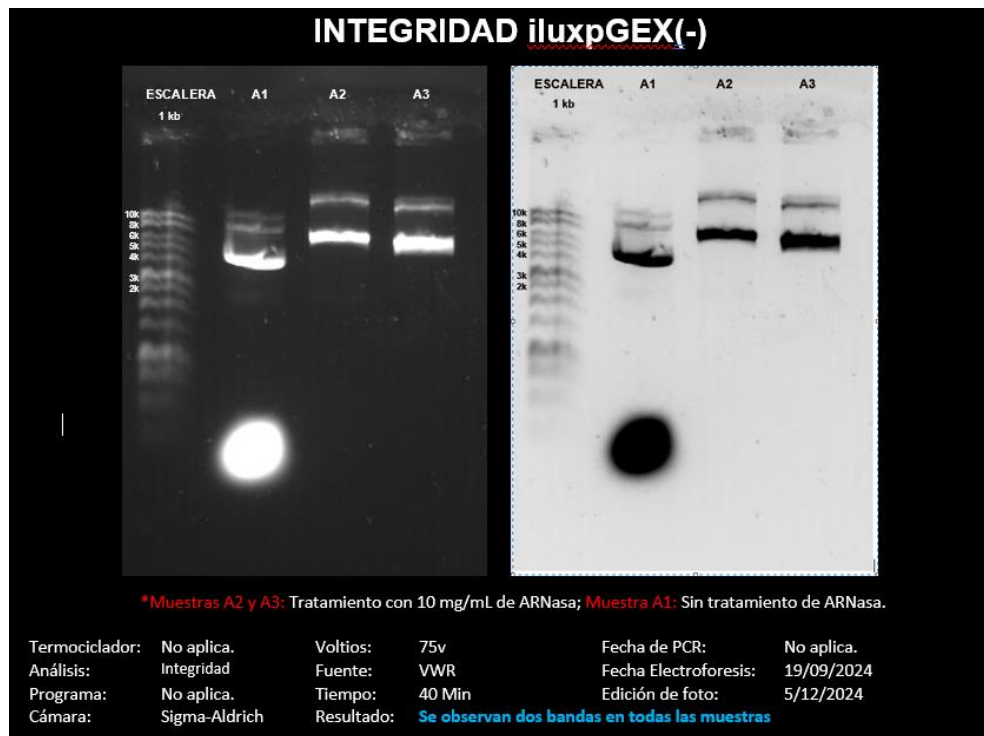
Figura 53. Indicador de solicitudes del plásmido según proveedor

Clave de las llamas

-  Más de 20 solicitudes
-  Más de 50 solicitudes
-  Más de 100 solicitudes

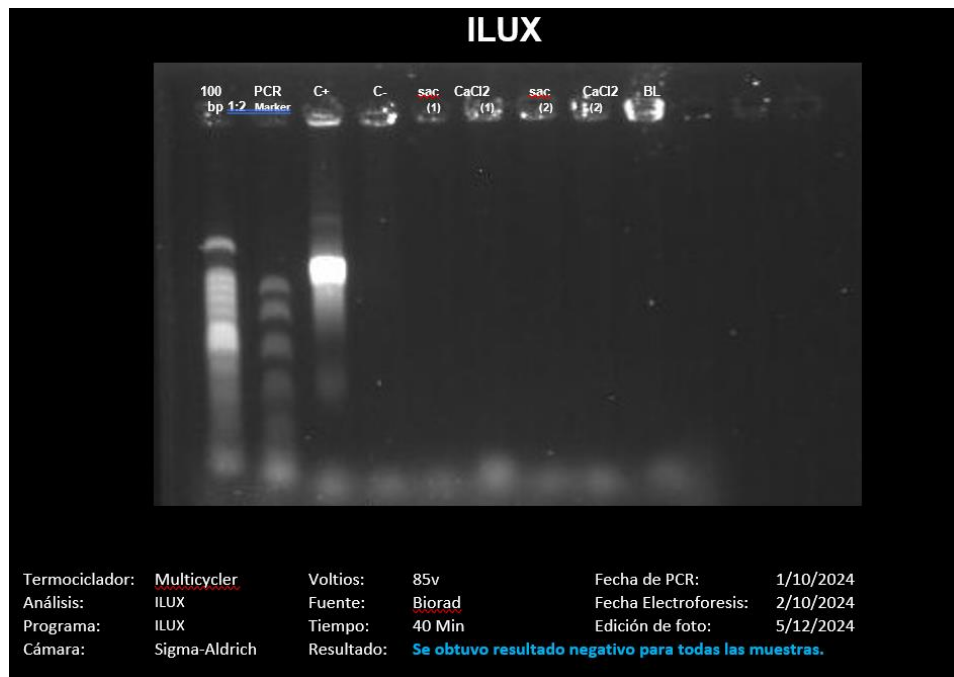
Fuente: (Addgene, 2024).

Figura 54. Electroforesis para evaluar la integridad de la extracción de plásmido



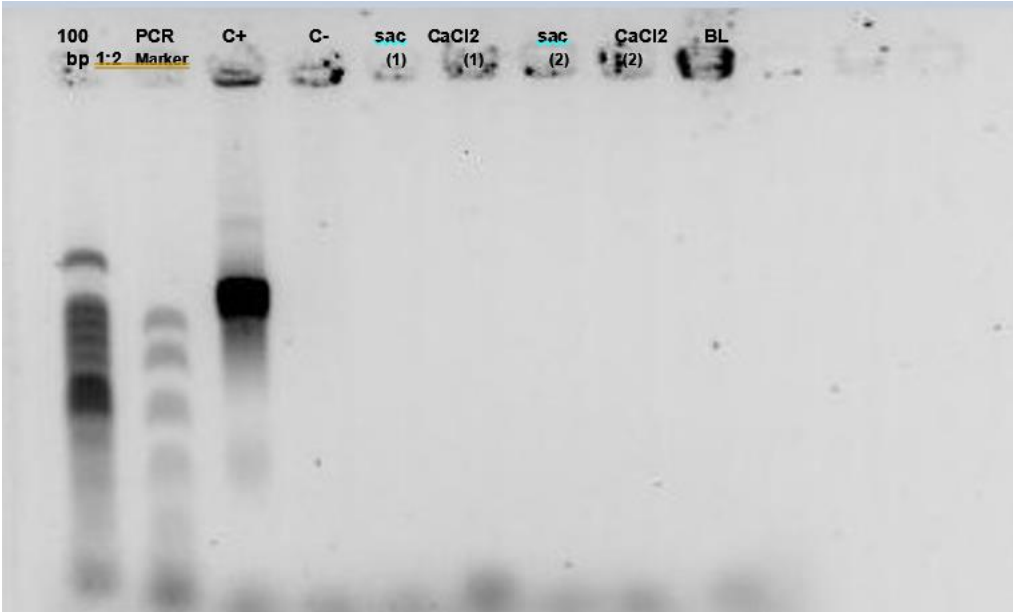
Fuente: (Elaboración propia).

Figura 55. Electroforesis de los productos del PCR para comprobar la transformación de *RS*



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 56. Electroforesis de los productos del PCR para comprobar la transformación de *RS* (colores invertidos)



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 57. Crecimiento de *RS salvaje* en medio CPG con ampicilina



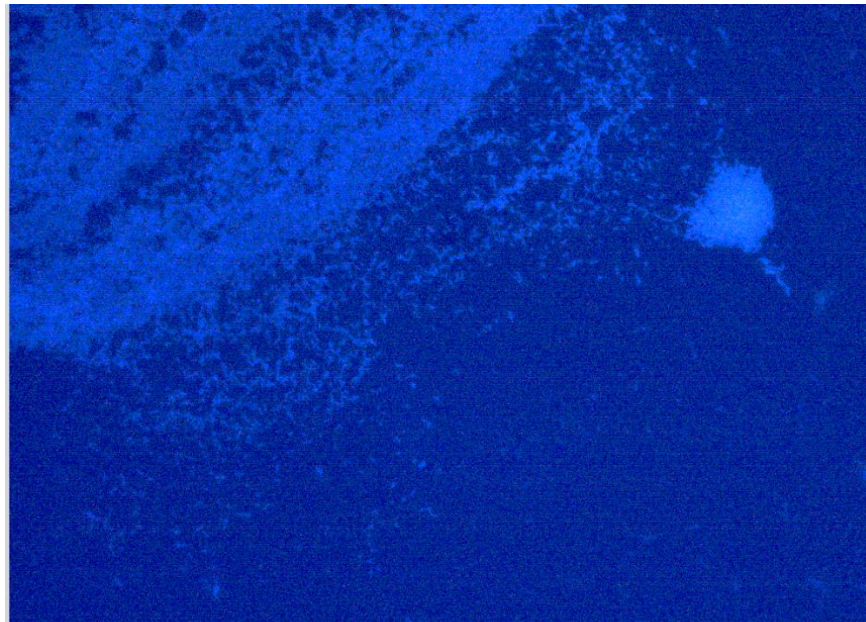
Fuente: (Elaboración propia).

Figura 58. Crecimiento observado de las células de *RS* recuperadas en un ensayo independiente



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 59. Comprobación de la emisión de bioluminiscencia de las células de *RS ILUX* recuperadas de la planta de tomate (muestra 4)



Fuente: (Elaboración propia).

Figura 60. Comprobación de la emisión de bioluminiscencia de las células de RS ILUX recuperadas de la planta de tomate (muestra 2)



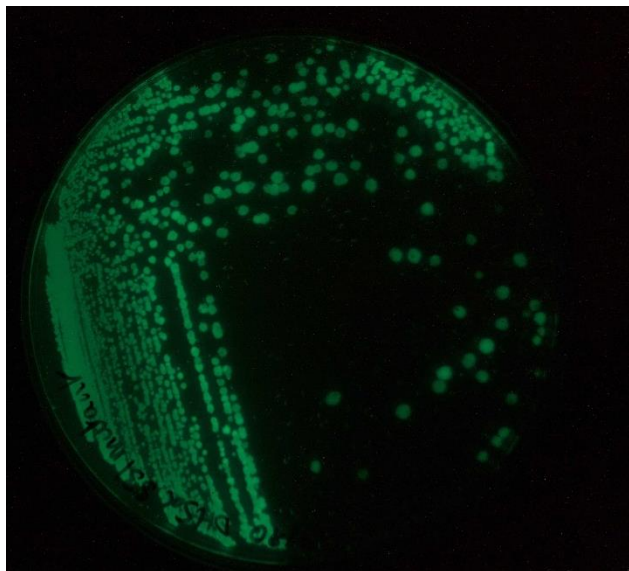
Fuente: (Elaboración propia).

Figura 61. Prototipo para el monitoreo en tiempo real del patógeno en planta



Fuente: (INSA Lyon, 2022).

Figura 62. Observación de bacterias luminiscentes con el prototipo desarrollado por INSA Lyon



Fuente: (INSA Lyon, 2022).