

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Modificación genética de planta de tabaco utilizando *Agrobacterium* con el plásmido RUBY para la inducción de cambio de color en hoja con fines de investigación

Trabajo de graduación presentado por

Karen Natalia Xicará Coti

para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial

Guatemala

2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Modificación genética de planta de tabaco utilizando *Agrobacterium* con el plásmido RUBY para la inducción de cambio de color en hoja con fines de investigación

Trabajo de graduación presentado por

Karen Natalia Xicará Coti

para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial

Guatemala

2024

Vo. Bo.:

(f) 
Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc.

Tribunal Examinador:

(f) 
Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc.

(f) 
Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda, M.A

(f) 
Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc.

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala 11 de diciembre de 2024

PREFACIO

El presente trabajo de graduación surge a partir de la curiosidad e interés que poseo hacia los temas de modificaciones genéticas y sus aplicaciones en la vida diaria. Gracias a los conocimientos que adquirí durante los cinco años de carrera de Ingeniería en Biotecnología Industrial logré realizar el planteamiento de una investigación a la altura de mis intereses y el motivo principal del porque elegí esta carrera. Aunque mi investigación pueda ser una pequeña pieza en el mundo de la biotecnología moderna considero que es clave para el desarrollo de investigaciones con enfoque a los efectos de las modificaciones en los organismos, brindando un nuevo camino a futuros científicos y científicas que se interesen en esto.

Agradezco principalmente a mis papás, quienes me brindaron la oportunidad de estudiar en la Universidad del Valle de Guatemala y cumplir mi sueño de estudiar una carrera científica, aunque fuera lejos de casa, gracias por todo el apoyo que me brindaron durante estos años. A mi hermana Laura, quien siempre me brindó su cariño y apoyo a través de mensajes y llamadas para mantenerme comunicada siempre con casa. A mi abuelo Héctor, quien, aunque ya no esté presente en mi vida me brindó las palabras que en muchos momentos difíciles fueron mi consuelo para poder continuar. A Loki, mi fiel compañero que, aunque no pudo llegar hasta el final conmigo siempre le agradeceré su compañía en todo momento desde su llegada a mi vida. A Luis Carlos, mi novio, quien siempre estuvo para mí brindándome cariño y apoyo de forma incondicional siendo la calidez en mi vida que me acompañaba en los momentos más difíciles estando sola, además de su apoyo para cuidar de mis plantas cuando viajaba a casa, sin el la culminación de esta investigación no hubiese sido posible. A mis amigas, quienes me acompañaron durante toda la carrera, brindándome su apoyo y amistad a lo largo de esta aventura, especialmente a Yizel, quien se convirtió en mi mejor amiga brindándome alegría en los momentos más difíciles.

Además, agradezco a mi asesor, Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc., quien me dio la oportunidad de poder tomar este tema y desarrollarlo, su acompañamiento, orientación y apoyo para la realización de este trabajo. A mi director de carrera Ing. Gamaliel Zambrano, M. Sc., por su apoyo y orientación a lo largo de la carrera.

ÍNDICE

PREFACIO	IV
LISTADO DE CUADROS	VII
LISTADO DE FIGURAS	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	3
III. <i>OBJETIVOS</i>	5
A. GENERAL	5
B. ESPECÍFICOS	5
IV. MARCO TEÓRICO	6
A. INGENIERÍA GENÉTICA	6
B. GENES REPORTEROS.....	9
C. TÉCNICAS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS.....	10
D. <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	12
E. PLÁSMIDO CON GEN RUBY.....	14
F. TABACO (<i>NICOTIANA TABACUM L</i>).....	17
G. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS	18
H. CRECIMIENTO DE PLANTAS.....	19
I. DISEÑO ESTADÍSTICO DEL ESTUDIO	20
J. TASA DE CRECIMIENTO ABSOLUTO (AGR- ABSOLUTE GROWTH RATE).....	21
K. RENDIMIENTO GENERAL DEL CRECIMIENTO LONGITUDINAL	22
L. PRODUCTIVIDAD MEDIA DEL CRECIMIENTO LONGITUDINAL	22
M. PRUEBAS ESTADÍSTICAS UTILIZADAS	23
a. Análisis de varianza ANOVA.....	23
b. Prueba de Scheffé.....	23
N. DIAGRAMA DE FLUJO.....	25
O. BALANCE DE MASA Y ENERGÍA TEÓRICOS	25
V. ANTECEDENTES	27
VI. METODOLOGÍA.....	29
A. PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD.....	29
B. SELECCIÓN PLANTAS ESTUDIO	30
C. MEDICIÓN HUMEDAD DE LA TIERRA Y LUZ EN PLANTAS.....	31
D. PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN AGAR LB RIF/SPEC	31
E. INOCULACIÓN DE <i>AGROBACTERIUM</i> MODIFICADO CON PLASMIDO RUBY	32
F. MODIFICACIÓN GENÉTICA EN PLANTA.....	33

VII. RESULTADOS.....	35
A. AMBIENTE RECREADO PARA PLANTAS DE TABACO.....	35
B. MODIFICACIÓN GENÉTICA EN PLANTA.....	43
C. CURVAS DE CRECIMIENTO PLANTAS MODIFICADAS Y CONTROL ..	45
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
IX. CONCLUSIONES.....	65
X. RECOMENDACIONES	66
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	67
XII. ANEXOS.....	72
A. BALANCE DE MASA Y ENERGÍA	72
B. DATOS ORIGINALES	73
C. CÁLCULOS DE MUESTRA	76
D. DATOS DE PLACA	77
E. FOTOGRAFÍAS	78
XIII. GLOSARIO.....	83

LISTADO DE CUADROS

Cuadro no.1 Condiciones ambientales necesarias para el crecimiento de la planta de tabaco ..	36
Cuadro no. 2 Primera inyección <i>Agrobacterium</i> con plásmido <i>Ruby</i> en las hojas de planta de tabaco	43
Cuadro no.3 Segunda inyección <i>Agrobacterium</i> con plásmido <i>Ruby</i> en las hojas de planta de tabaco	44
Cuadro no. 4 Rendimiento general y productividad media del crecimiento de las plantas de tabaco	50
Cuadro no. 5 Tasa de crecimiento semanal planta control y plantas inyectadas con <i>Agrobacterium</i> con plásmido <i>RUBY</i>	51
Cuadro no. 6 Análisis de varianza crecimiento de plantas en las 23 semanas de experimentación	52
Cuadro no. 7 Análisis Scheffe crecimiento de plantas en las 23 semanas de experimentación	53
Cuadro no.6 Crecimiento de la planta control evaluado semanalmente	73
Cuadro no.7 Crecimiento de las plantas inyectadas evaluado semanalmente	74
Cuadro no. 8 Productividad semanal del crecimiento de las plantas utilizadas en la experimentación	75
Cuadro no.9 Placa luz fluorescente T5	77
Cuadro no. 10 Placa incubadora de laboratorio	77

LISTADO DE FIGURAS

Figura no.1 Representación del mecanismo CRISPR/cas9	8
Figura no.2 Principio tecnológico de los genes reporteros aplicados en el desarrollo de biosensores de células	10
Figura no.3 maquinaria molecular de la transformación de las plantas	13
Figura no.4 Reacciones químicas para la producción de betalaína	15
Figura no.5 Mapa plásmido RUBY	16
Figura no.6 <i>Nicotiana tabacum</i>	17
Figura no. 7 Diagrama de flujo modificación genética en plantas de tabaco	25
Figura no.8 Esquema requerimientos básicos para el crecimiento de las plantas de tabaco	35
Figura no. 9 Piping and Instrumentation Diagram (P&ID) sistema de crecimiento plantas de tabaco con el kit de propagación premium Super Sprouter en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala	37
Figura no. 9 Kit de propagación premium Super Sprouter en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala	38
Figura no. 10 Medidor de suelo de 3 vías en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala.....	39
Figura no.11 Temporizador analógico 1 evento en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala.....	39
Figura no.12 Piping and Instrumentation Diagram (P&ID) sistema de crecimiento plantas de tabaco en plataforma metálica en el interior del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.....	41
Figura no. 13 Soporte de metal aéreo para plantas en el interior del Laboratorio Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala	42
Figura no. 13 Curva de crecimiento planta control	45
Figura no. 14 Curva de crecimiento planta 1	45
Figura no.15 Curva de crecimiento planta 2	46
Figura no.16 Curva de crecimiento planta 3	46
Figura no.17 Curva de crecimiento planta 4	47
Figura no.18 Curva de crecimiento planta 5	48
Figura no.19 Curva de crecimiento planta 6	48
Figura no. 20 Curvas de crecimiento de las plantas inyectadas con <i>Agrobacterium</i> con plásmido <i>RUBY</i> comparadas con la curva de crecimiento de la planta control.....	49
Figura no. 21 Placa no.1 <i>Agrobacterium</i> con plásmido <i>RUBY</i> en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala	78

Figura no. 22 Placa no.2 <i>Agrobacterium</i> con plásmido <i>RUBY</i> en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala	78
Figura no. 23 Plantas de tabaco creciendo dentro del domo del Kit Super Sprouter en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala.....	79
Figura no. 24 Plantas de tabaco en etapa de adaptación al nuevo ambiente en el interior del Laboratorio Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.....	79
Figura no. 25 Planta de tabaco posterior a la inyección con <i>Agrobacterium</i> con plásmido <i>RUBY</i> en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala	80
Figura no. 26 <i>Agrobacterium</i> con plásmido <i>RUBY</i> sembrado en placas de agar <i>LB RIFF/Espec</i> para corroboración de modificación vigente en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala	80
Figura no. 27 Hoja de hortensia modificada genéticamente en el interior del Laboratorio de Operaciones Unitarias.....	81
Figura no. 28 Hoja 2 de hortensia modificada genéticamente en el interior del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala	81
Figura no. 29 Incubadora de laboratorio en el interior del Laboratorio de procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala.....	82
Figura no. 30 Tallos dañados de las plantas de tabaco	82

RESUMEN

La modificación genética de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens* permite introducir genes de interés de manera eficiente en el genoma vegetal, contribuyendo al avance de la biotecnología. Este estudio evaluó la introducción del plásmido RUBY en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), diseñado para inducir la síntesis de betalainas como marcador visual.

Los resultados indicaron que una de las plantas modificadas presentó el cambio fenotípico esperado, exhibiendo una coloración rojiza en su follaje, mientras que las demás no mostraron alteraciones visibles. Además, las plantas modificadas experimentaron un crecimiento más acelerado, alcanzando incrementos de altura de hasta el 190.83%, pero con mayor inestabilidad en comparación con las plantas no modificadas, que crecieron de manera constante y alcanzaron un promedio de 4.05 cm.

Estos hallazgos sugieren que factores como los mecanismos de defensa innata de la planta pudieron influir en la eficiencia de la modificación genética. La investigación destaca la importancia de la selección de especies adecuadas y del control riguroso de las condiciones experimentales para optimizar los resultados en futuros estudios de modificación genética.

Este trabajo aporta conocimiento valioso para quienes deseen replicar investigaciones similares, enfatizando la necesidad de comprender los factores biológicos y ambientales que pueden impactar en la eficacia del proceso de transformación genética.

I. INTRODUCCIÓN

Los Organismos Modificados Genéticamente (GMO's sus siglas en inglés) son todas las plantas, animales o microorganismos a los cuales se le fueron introducido, amplificado o eliminado uno o más genes en su genoma, generalmente por medio de ingeniería genética, para alterar características específicas del organismo. Los GMO son ampliamente utilizados con diversos fines en diferentes ámbitos, como por ejemplo en el área de medicina para la producción de insulina humana, en el área de alimentos en la producción de bebidas fermentadas o alimentos y para el desarrollo de resistencia a plagas, pesticidas o cambios en el entorno en cultivos (NIH, 2022). Los GMO existen desde hace muchos años con técnicas de reproducción tradicionales como la selección artificial para rasgos específicos deseados para la generación de organismos diferentes como mayor utilidad. Sin embargo, en las últimas décadas se ha obtenido avances en el campo de la genética que han permitido un control más preciso de los cambios genéticos que se introducen en un organismo (Claveria & Ramon, 2012).

A partir del desarrollo de las tecnologías surge la biotecnología moderna, la cual es definida como la aplicación científica y tecnológica a organismos vivientes, partes específicas, productos y modelos destinados a la modificación de organismos vivos o materiales que son aplicados a la producción de bienes, productos, servicios y conocimientos. La biotecnología es considerada una tecnología que posee un conjunto de principios científicos y técnicos con especificidades técnicas aplicables a desarrollos específicos, esta es una plataforma que sirve como base para tecnologías de uso concreto en actividades productivas. El uso de la biotecnología moderna es común para el mejoramiento de costos y desarrollo de productos tradicionales. Un ejemplo muy común es el uso de marcadores moleculares para el entrecruzamiento natural de especies obteniendo un producto final que no varía y es convencional bajo parámetros de la biología clásica, pero con el mejoramiento de la eficiencia e investigación y desarrollo (Bisang et al., 2017).

Uno de los instrumentos más utilizados en la biotecnología moderna es el CRISPR-Cas9, el cual se utiliza para realizar cambio o edición de segmentos de ADN en una célula; este utiliza una molécula de ARN con un diseño especial para guiar una enzima (Cas9) hacia una secuencia específica de ADN. Cas9 corta las hebras de ADN en el lugar específico

identificado y quita un segmento del ADN, produciendo un espacio donde se colocará la pieza de ADN nueva. CRISPR-Cas9 representa un gran avance dentro de la ciencia por el uso importante que se le da en diferentes líneas de investigación (NIH, 2019).

Los genes reporteros son secuencias de ADN que se utilizan en biología molecular para estudiar la actividad de otros genes. Estos genes codifican proteínas que producen señales fácilmente detectables, lo que permite a los investigadores monitorear la expresión génica, la localización de proteínas y otros procesos celulares. Recientemente, se han desarrollado nuevos sistemas de reporteros, como RUBY, que convierten compuestos en colores visibles sin necesidad de equipos especiales, lo que facilita el monitoreo de la expresión génica en condiciones de campo y en cultivos de tejidos. RUBY es sistema de reportero genético que convierte el aminoácido tirosina en betalaina roja, un pigmento que es claramente visible a simple vista. Este sistema fue desarrollado para facilitar el monitoreo de la expresión génica y la transformación de plantas de manera no invasiva y sin la necesidad de equipos especiales o tratamientos químicos.

Debido a que existe pocos estudios donde se aborde los efectos del uso de plásmidos como *RUBY* surge el interés de experimentar para obtener datos sobre esto. En este trabajo se presenta el estudio de la modificación genética en plantas de tabaco utilizando *Agrobacterium* con plásmido *RUBY*; a través de las diferentes secciones se encontrará información sobre las condiciones de crecimiento de las plantas que fueron replicadas para la experimentación, información sobre las plantas que fueron modificadas con éxito y las que no se lograron modificar y la comparación entre el crecimiento de las plantas sometidas a inyecciones con *Agrobacterium* y planta de control.

II. JUSTIFICACIÓN

La biotecnología es un campo que tiene su nacimiento hace miles de años pero que en las últimas décadas ha estado en constante evolución y desarrollo abarcando diversas áreas, desde la agricultura hasta campos como la medicina. La ingeniería genética se ha convertido en un pilar fundamental de la biotecnología moderna, ya que la capacidad de modificar y manipular genes ha llevado a avances significativos en la agricultura, medicina y organismos (REPSOL, 2023). La ingeniería genética en plantas es una herramienta crucial para la biotecnología agrícola, permitiendo la introducción de características deseables, como la resistencia a enfermedades, la mejora de la calidad nutricional y la adaptación a condiciones ambientales adversas. Entre 1996 y 2020 los GMO's han generado un aumento total en los ingresos de los agricultores de aproximadamente 261.3 mil millones de dólares. Este beneficio se ha distribuido entre países en desarrollo y desarrollados, mostrando que ambos grupos han experimentado ganancias sustanciales. En particular, los cultivos de soja, maíz, algodón y canola han sido los más beneficiados por la adopción de tecnologías GMO, lo que ha contribuido a mejorar la base de producción agrícola a nivel global (Brookes, 2022).

La agricultura es una parte esencial de la economía guatemalteca, la cual se ve ampliamente afectada por pérdidas relacionadas a medio ambiente, plagas y enfermedades en cultivos; a finales de 2020 y los primeros 3 meses de 2021 en Guatemala se registraron pérdidas en los cultivos de maíz, frijol, plátano, banano, tomate, cebolla y brócoli, sumando daños en cardamomo y café con un valor total de Q 897,160,992.35 generando un impacto en la economía guatemalteca (MAGA 2022). La ingeniería genética puede desarrollar plantas que sean más resistentes a estas condiciones adversas, mejorando la sostenibilidad y la resiliencia de los cultivos locales.

Actualmente en el país no se conocen proyectos publicados que utilicen modificaciones genéticas en plantas, por lo que en este trabajo de graduación se plantea el análisis de una modificación genética de planta de tabaco utilizando *Agrobacterium* con el plásmido RUBY producido a través de la técnica CRISP cas9, esto para la inducción de cambio de color en hoja y la comparación entre una planta de tabaco modificada

genéticamente con una no modificada para estudiar los posibles efectos que la modificación podría generar en el crecimiento de las plantas. Con esta investigación se busca seguir ampliando los conceptos iniciales de CRISPR para la modificación genética en plantas dentro de la facultad de ingeniería con el uso del plásmido RUBY para la obtención de betalaína en plantas que no lo producen de forma natural, colocando así un precedente para el uso de modificaciones genéticas en plantas para Guatemala.

III. OBJETIVOS

A. GENERAL

- Evaluar la modificación genética de una planta utilizando *Agrobacterium* con el plásmido RUBY para la inducción de cambio de color en el follaje de esta y comparar su modelo de crecimiento con planta no modificada

B. ESPECÍFICOS

- Recrear el ambiente adecuado para la planta seleccionada para evaluar su crecimiento por medio de un método manual en función del tiempo
- Modificar genéticamente la planta seleccionada con la adición de *Agrobacterium* con plásmido RUBY que contiene los genes CYP76AD1, DODA y *Glucosyltransferasa*, por medio de la técnica de CRISPR-Cas 9 para comprobar el cambio de tirosina a betalaína presentes en las hojas de la planta.
- Realizar curvas de crecimiento de la planta modificada hasta la etapa previa a floración utilizando técnicas manuales de medición para compararlo con la curva de crecimiento de plantas no modificadas

IV. MARCO TEÓRICO

A. INGENIERÍA GENÉTICA

La ingeniería genética es un proceso que permite alterar directamente el ADN de un organismo para modificar sus características de manera específica. Este proceso puede variar desde realizar cambios pequeños en una única base del ADN, hasta insertar o eliminar genes completos o regiones enteras del genoma. A través de estas modificaciones, los científicos son capaces de mejorar ciertos rasgos en los organismos (Farthing, 2019).

La ingeniería genética también desempeña un papel crucial en la investigación científica. Desde la creación del primer organismo modificado genéticamente en 1973, un avance que abrió la puerta a una nueva era en la biotecnología, se han realizado modificaciones en una amplia variedad de organismos para estudiar el funcionamiento de genes específicos. (Farthing, 2019).

El ADN recombinante (rADN) es una tecnología la cual utiliza enzimas para cortar y unir secuencias de ADN de interés. Las secuencias de ADN recombinado se pueden colocar en vectores que se encargan de transportar el ADN hacia el lugar adecuado de la célula huésped donde puede ser copiado o expresado. La tecnología del ADN recombinante comenzó con cosas muy simples, desde clonación de partículas muy pequeñas de ADN y su cultivo en bacterias; esta ha evolucionado a un campo enorme donde genomas completos puede ser clonados y transferidos de una célula a otra, utilizando técnicas que se podrían definir de un modo muy amplio como ingeniería genética (National Human Genome Research Institute, 2024).

A finales de los años 80 en el laboratorio de Yoshizumi Ishino de la Universidad de Osaka surge la primera descripción de secuencias repetidas características en el genoma de *E. coli*; así mismo en el año de 1993 en una investigación desarrollada por el microbiólogo Francisco Martínez se logró identificar secuencias repetidas en una arquea, *Haloferax mediterranei* (Garrigues, 2023). A partir de este descubrimiento estas secuencias fueron nombradas como “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas

Regularmente Interespaciadas” o CRISPR por sus siglas en inglés. Ambos descubrimientos, aunque estuvieron aislados fueron las bases para diferentes investigaciones las cuales llevaron en el año 2007 en una investigación dirigida por Rodolphe Barrangou titulada “CRISPR proporciona resistencia adquirida contra virus en procariotas”, en la cual descubrieron que, después de la exposición viral, las bacterias integraron nuevos espaciadores derivados de secuencias genómicas de fagos. La eliminación o adición de espaciadores particulares modificó el fenotipo de resistencia a los fagos de la célula. Por lo tanto, CRISPR, junto con los genes cas asociados, proporcionó resistencia contra los fagos, y la especificidad de la resistencia está determinada por la similitud de secuencias espaciador-fago (Barrangou et al., 2007).

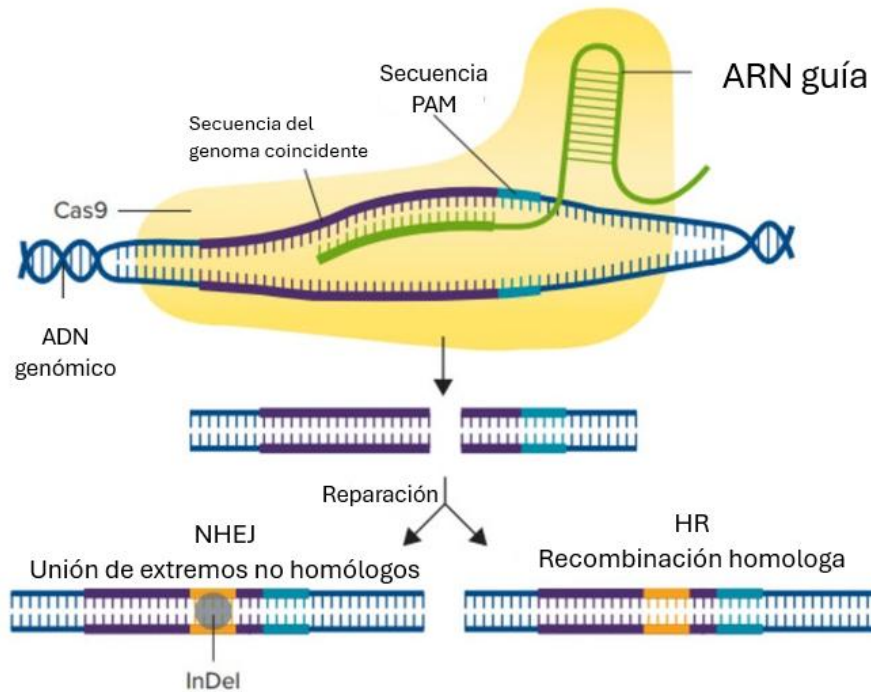
El sistema CRISPR-Cas9, que ha revolucionado la ingeniería genética, se basa en un sistema inmunológico adaptativo que está presente en las bacterias. La combinación de CRISPR y Cas9, una proteína asociada con CRISPR, es una herramienta que permite alterar de manera específica el ADN (Garrigues, 2023).

El ARN guía (ARNg) utilizado por CRISPR-Cas9 es diseñado para coincidir con la secuencia genómica deseada. La enzima Cas9 corta el ADN en la posición indicada por el ARN guía. Este corte realizado en la doble cadena hace que la célula se someta a una de las 2 vías posibles de reparación:

- a) Unión de extremos no homólogos (NHEJ)
- b) Recombinación dirigida por homología (HDR)

La vía NHEJ es utilizada con frecuencia para alterar los genes por medio de inserciones o deleciones de bases; la vía HDR se utiliza para la introducción de un gen indicador o una secuencia modificada por medio del intercambio de secuencias entre sdos moléculas similares o idénticas.

Figura no.1 Representación del mecanismo CRISPR/cas9



Fuente: (Molecular Devices, 2018)

El mecanismo de CRISPR/Cas9 comienza con la activación de la enzima Cas9, que se une inicialmente a un ARN guía específico. Luego, Cas9 se dirige hacia la secuencia genómica correspondiente, ubicada justo antes de la secuencia PAM de tres nucleótidos. Una vez allí, Cas9 induce un corte en la doble cadena de ADN. Posteriormente, se pueden emplear dos vías para la reparación del ADN: NHEJ (reparación por unión endógena no homóloga) o HDR (reparación dirigida por homología). Estos procesos permiten la modificación de la secuencia génica, dando lugar a cambios específicos en el ADN.

Debido a su eficacia y precisión, el uso de CRISPR-Cas9 para modificar la genética de las plantas ha sido crucial. En comparación con métodos anteriores, esta técnica permite una edición genética más rápida y específica, lo que facilita la manipulación de genes específicos en el genoma vegetal. Esto ha generado investigación y uso en una variedad de campos, incluida la mejora de características agronómicas y la producción de plantas resistentes a enfermedades.

Las ventajas del sistema CRISPR-Cas9 lo han convertido en una herramienta de ingeniería genética cada vez más popular para aplicaciones biológicas y terapéuticas. Además, CRISPR-Cas9 se ha empleado para reclutar dominios funcionales que pueden reprimir o activar la expresión génica o marcan sitios loci genómicos específicos en células u organismos vivos, para poder explorar los mecanismos de desarrollo, la regulación de la expresión génica y el comportamiento animal. Una de las principales preocupaciones sobre este sistema es su especificidad; aunque la mutación fuera del objetivo mediada por CRISPR-Cas9 se ha estudiado ampliamente, se requieren más esfuerzos para mejorar aún más la especificidad de CRISPR-Cas9 (Ma et al., 2014).

El uso de tecnologías como CRISPR cas9 para el mejoramiento de plantas insertando fragmentos específicos de ADN para el desarrollo de mejoramiento, resistencia a plagas y/o adaptación a condiciones climáticas, va más allá de la mejora de la productividad agrícola, abordando desafíos globales y contribuyendo a la sostenibilidad de la agricultura y la producción de alimentos en un mundo cambiante.

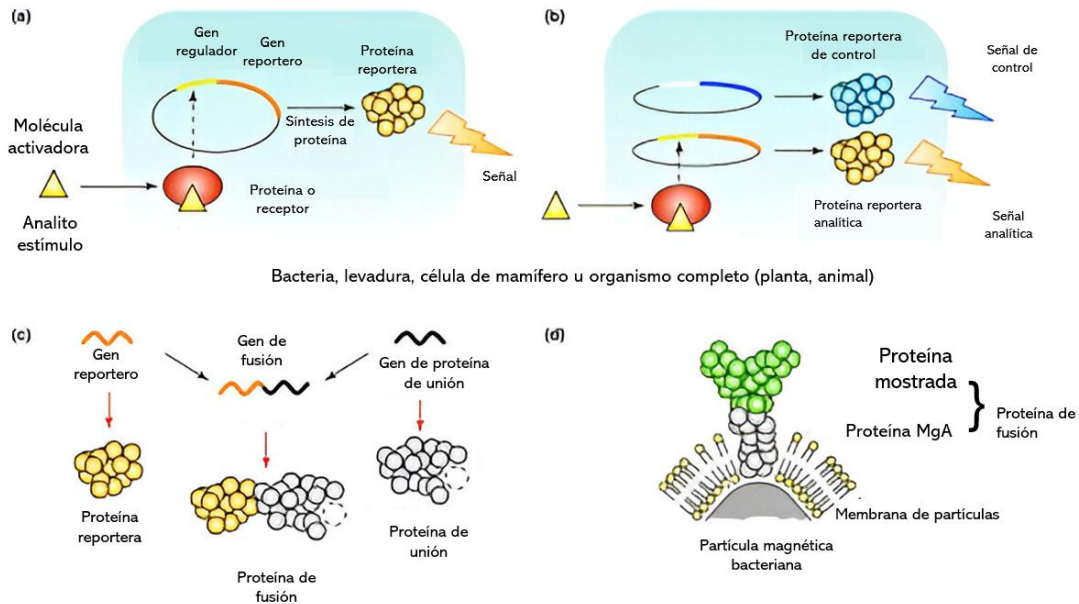
B. GENES REPORTEROS

Para poder validar y monitorear la precisión y eficiencia con la que se lleva a cabo una modificación genética es necesario el uso de genes reporteros. Un gen reportero es cualquier gen cuyo producto es capaz de señalar de forma visual la ubicación de una proteína, un tipo de célula o un circuito en particular. Estos pueden introducirse de forma artificial para monitorear la expresión génica (Carter & Shieh, 2015).

La Figura no. 2 representa (a) la tecnología de genes reporteros aplicada al desarrollo de un biosensor de célula completa de bioluminiscencia y quimioluminiscencia (BL/CL). Un analito o un estímulo activa específicamente una secuencia génica reguladora que controla la expresión del gen reportero y la síntesis de la proteína reportera, que luego se mide mediante técnicas BL/CL. (b) Sistema de doble reportero. La señal de la proteína de control, que se expresa de forma constitutiva, se utiliza como referencia interna para corregir la señal dependiente del analito/estímulo para reducir la variabilidad experimental; alternativamente, se pueden utilizar dos genes reporteros para detectar dos analitos de forma simultánea o secuencial en el mismo sistema. (c) Fusión génica de secuencias de una proteína reportera y un gen de proteína de unión para obtener una

proteína de fusión bifuncional BL/CL. (d) Las proteínas de fusión que contienen una proteína de unión adecuada (por ejemplo, la proteína MagA) permiten obtener partículas magnéticas bacterianas que muestran proteínas específicas en su superficie.

Figura no.2 Principio tecnológico de los genes reporteros aplicados en el desarrollo de biosensores de células



Fuente: (Roda et al., 2014)

C. TÉCNICAS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS

La transgénesis vegetal ha transformado la biotecnología agrícola, permitiendo la introducción de genes específicos en plantas para mejorar características como la resistencia a plagas, el aumento de nutrientes, y la adaptación a condiciones adversas. Para esto se han desarrollado diferentes técnicas de edición genética en plantas:

- Cultivo de callos y suspensión celular

El cultivo de callos es una técnica clave en la ingeniería genética de plantas. Los callos son masas de células vegetales no diferenciadas, obtenidas de explantes que crecen en un medio nutritivo con reguladores de crecimiento. Este proceso es fundamental para la transformación genética, ya que permite la manipulación de células vegetales antes de regenerar plantas completas a partir de ellas. El cultivo de suspensión celular es otra

técnica utilizada en la biotecnología vegetal, donde las células de los callos se mantienen en medio líquido agitado, lo que facilita su crecimiento y multiplicación. Este tipo de cultivo es útil para la producción a gran escala de células vegetales modificadas.(Archila, 2022).

- Aislamiento de protoplastos

El aislamiento de protoplastos consiste en la eliminación de la pared celular de las células vegetales utilizando enzimas. Este proceso es esencial para la ingeniería genética, ya que permite la transformación directa del material genético en las células vegetales sin la barrera de la pared celular. Posteriormente, las plantas pueden ser regeneradas a partir de estos protoplastos modificados genéticamente (Archila, 2022).

- Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* con plásmidos

El sistema binario de plásmidos es ampliamente utilizado en este método. Consiste en un par de plásmidos: el plásmido binario, que contiene el transgén y los bordes de T-DNA, y un plásmido helper que lleva los genes *vir* de *Agrobacterium*, necesarios para la transferencia del ADN a la célula huésped. Este sistema es eficiente en muchas especies de plantas, especialmente en dicotiledóneas (Archila, 2022). Esta técnica será ampliada más adelante.

- Bombardeo de microproyectiles (Biobalística)

El bombardeo de microproyectiles, también conocido como biobalística, es una técnica física en la que partículas metálicas (generalmente oro o tungsteno) recubiertas con ADN son disparadas a las células vegetales a alta velocidad. El ADN transportado por las partículas se integra en el genoma de la célula receptora. Esta técnica se utiliza en plantas que son menos susceptibles a la transformación por *Agrobacterium* (Archila, 2022).

- Transformación de cloroplastos

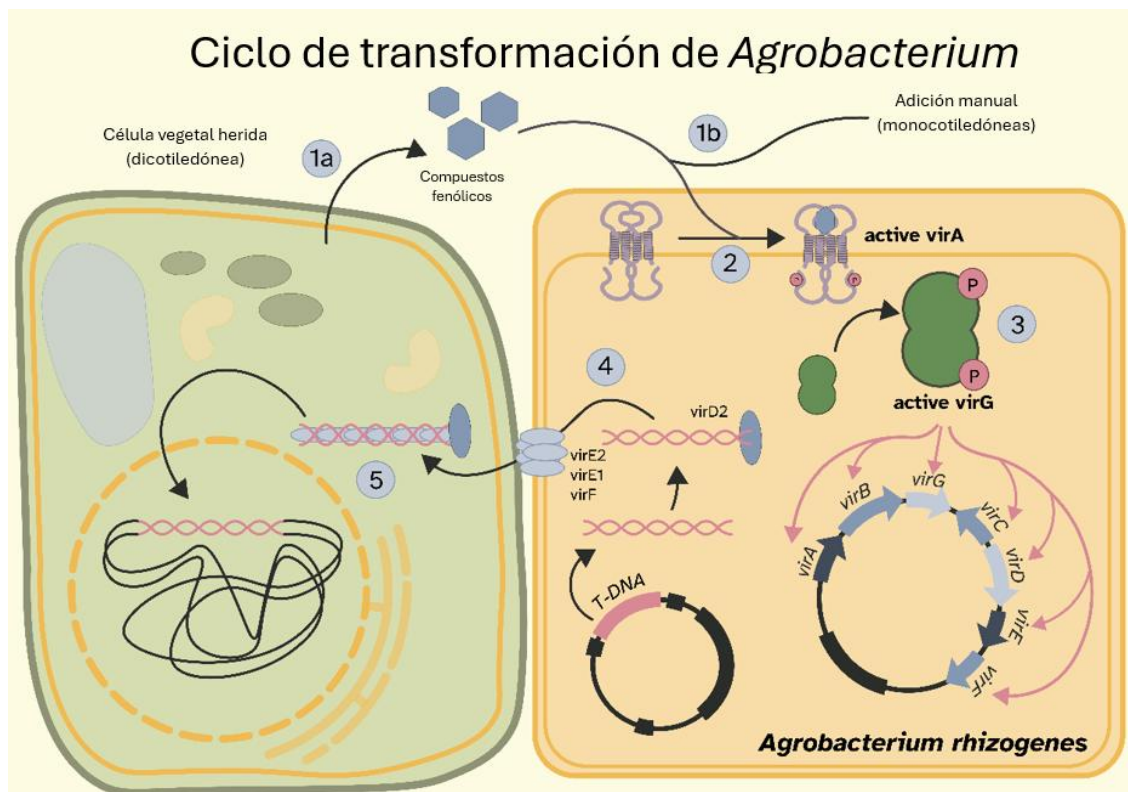
Una técnica innovadora es la transformación de los cloroplastos, los cuales contienen múltiples copias de su propio genoma. Este método ofrece varias ventajas sobre la transformación nuclear tradicional, como un mayor nivel de expresión del transgén y la capacidad de mantenerlo de manera estable sin transmisión por polen. Además, permite la expresión de múltiples genes a la vez (Archila, 2022).

El método elegido y utilizado en la metodología para la modificación genética de las plantas, que emplea *Agrobacterium tumefaciens* con un plásmido modificado, se considera el más adecuado para este tipo de experimentación por diversas razones. En primer lugar, este método es altamente eficiente para la transferencia de genes en plantas dicotiledóneas como el tabaco, debido a la capacidad natural de *Agrobacterium* para insertar fragmentos específicos de ADN en el genoma de la planta hospedante. Además, ofrece una integración estable de los genes de interés, lo que garantiza resultados consistentes y reproducibles. Su compatibilidad con una amplia gama de especies vegetales y su relativa simplicidad en la implementación hacen que sea una técnica ampliamente adoptada en la investigación biotecnológica.

D. AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria causante de tumores o agallas en el cuello de la raíz de las plantas. Esta afecta principalmente plantas herbáceas, frutales entre otros. Esta vive en el suelo y penetra al huésped a través de heridas que puedan tener. Se aloja en el espacio intercelular desde el cual puede transferir parte de su material genético a la célula huésped (EPPO Global Database, 2019). El fragmento de T-DNA que es integrado al huésped es el responsable de provocar la producción descontrolada de células que posteriormente genera tumores (GAN-NIK, 2021). Esta capacidad de poder transferir ADN de su plásmido Ti a las células vegetales es lo que la posiciona como una herramienta clave en la ingeniería genética de plantas. Esta bacteria ha sido utilizada como vector para la producción de plantas resistentes a enfermedades y la mejora de la calidad nutricional mediante la introducción de genes específicos. Además, se ha utilizado para estudios de la función génica mediante la introducción de ARN de interferencia o genes reporteros, así como para el desarrollo de plantas transgénicas con características agronómicas mejoradas.

Figura no.3 Maquinaria molecular de la transformación de las plantas



Fuente: (Morimoto, 2023)

La figura 3 ilustra los pasos clave de la inserción mediada por *Agrobacterium* de un ADN diana (ADN-T) en el genoma de una planta hospedante. Originalmente, el ADN-T y los genes de virulencia se encuentran ubicados en el mismo plásmido, el plásmido Ti en *A. tumefaciens* o el plásmido Ri en *A. rhizogenes*. La imagen muestra la transformación utilizando un plásmido binario, lo que significa que la región vir del plásmido Ti está separada en un plásmido auxiliar. La virulencia se induce si los compuestos fenólicos son secretados por la planta herida (dicotiledóneas, 1a) o deben agregarse manualmente (monocotiledóneas, 1b). Después de difundirse a través de la membrana externa, estos compuestos fenólicos son detectados por la quinasa sensora unida a la membrana VirA (2). VirA a su vez autofosforila y activa VirG (3). VirG es el regulador maestro del operón vir y se une como factor de transcripción a los promotores de los genes de virulencia. Estos genes participan en la transferencia del ADN-T al genoma de la planta huésped (pasos 4-5). La transformación mediada por *Agrobacterium* se puede utilizar para insertar cualquier región génica de interés en el genoma de una planta.

Una vez que el T-DNA está dentro de la célula vegetal, gracias a la maquinaria de los genes **vir** de *Agrobacterium*, este ADN se transfiere e integra en el genoma nuclear de la célula huésped. Este proceso permite que el gen de interés sea expresado en la planta de manera estable. Después de la transformación de las células vegetales, estas se cultivan en un medio selectivo para promover la regeneración de plantas completas a partir de las células transformadas. Se utilizan marcadores de selección para identificar las plantas que han incorporado el gen deseado (Angstrom, 2019).

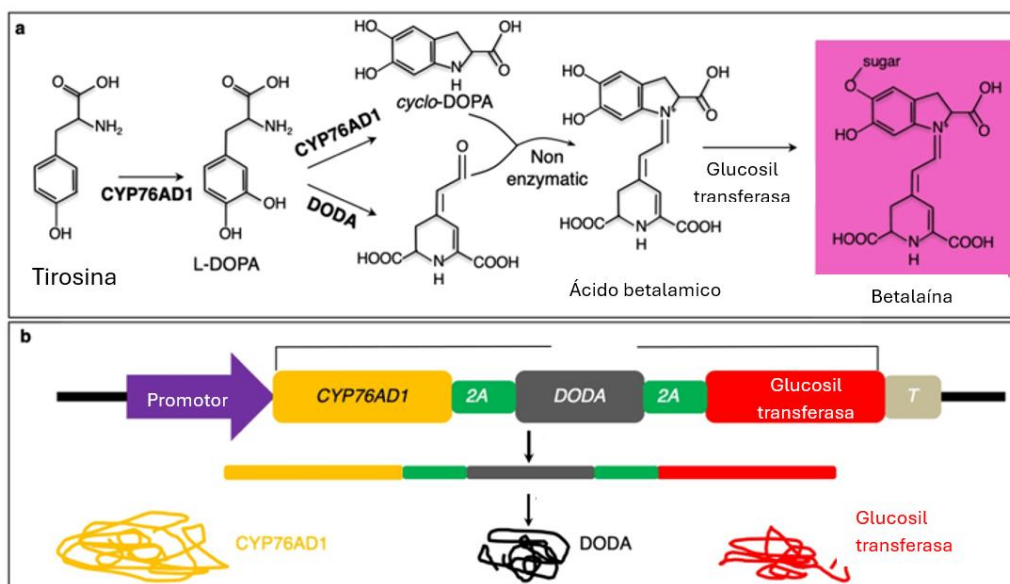
Además, existe el método de transformación in planta, que permite transformar plantas o semillas sin pasar por el cultivo de tejidos. Este método utiliza una infiltración al vacío donde se suspenden las plantas en una solución que contiene *Agrobacterium*. Posteriormente, las plantas se regeneran, se colectan y se evalúan los marcadores de resistencia (Archila, 2022).

E. PLÁSMIDO CON GEN RUBY

Las betacianinas y betaxantinas son miembros de la familia de pigmentos conocida como betalaína derivados del aminoácido tirosina. La coloración roja hace que sea fácil de diferenciar, lo que la convierte en un excelente marcador visual para experimentos de modificación genética de plantas (He et al., 2020).

En la ingeniería genética de plantas, se produce betalaína introduciendo genes específicos que codifican las enzimas involucradas en su síntesis. Para insertar estos genes en el genoma de la planta de interés, con frecuencia se emplea el método CRISPR-Cas9. RUBY es un gen sintético encargado de codificar enzimas para la síntesis de betalaína a partir de tirosina, generando un color rojo intenso que es visible a simple vista. Este es utilizado para monitorear de forma no invasiva la expresión génica en plantas (He et al., 2020).

Figura no.4 Reacciones químicas para la producción de betalaína



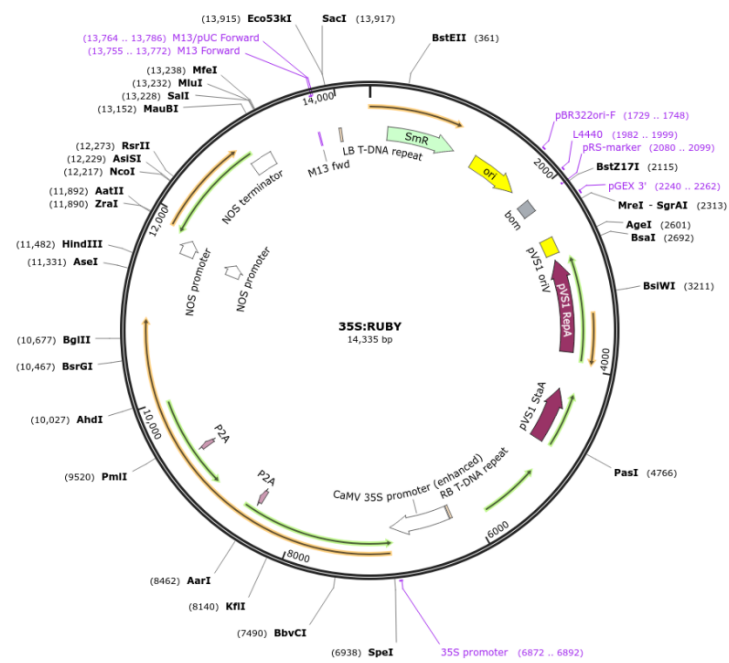
Fuente: (He et al., 2020)

(a) Reacciones químicas para convertir la tirosina en betalaína, que tiene un color rojo. La tirosina primero se oxida por el P450 CYP76AD1 en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), que puede ser convertida posteriormente en ciclo-DOPA por el P450 CYP76AD1. En presencia de L-DOPA 4,5-dioxigenasa (DODA), la DOPA se oxida y se circulariza en ácido betalámico. El ciclo-DOPA se condensa con ácido betalámico, una reacción no enzimática, para producir betanidina. La glucosilación de betanidina genera la betalaína de color rojo. (b) Una estrategia para expresar toda la vía biosintética de la betalaína en un solo casete. Los tres genes biosintéticos de la betalaína se fusionaron en un único marco de lectura abierto, que puede expresarse utilizando un único promotor y terminador. Entre los genes, se insertaron secuencias que codifican péptidos 2A. Los péptidos 2A se autoescinden, liberando así las enzimas individuales para la biosíntesis de betalaína. La unidad de síntesis de betalaína puede colocarse bajo el control de un promotor de interés. El terminador utilizado aquí fue el terminador HSP18.2 de Arabidopsis.

El plásmido Ruby tiene tres genes clave que están involucrados en la biosíntesis de la betalaína:

- **CYP76AD1:** Esta encargado de codificar la enzima citocromo P450, la cual está involucrada en la primera etapa de la biosíntesis de betalainas. Esta enzima convierte la L-tirosina en un precursor de las betalainas llamado L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (Sunnadeniya et al., 2016).
- **DODA (DOPA-dioxigenasa):** Codifica una enzima que cataliza la conversión de L-DOPA a betalamina, un intermediario crucial (Sheehan et al., 2019).
- **5GT (glucosiltransferasa):** Este gen codifica una enzima glucosiltransferasa que cataliza la adición de una molécula de glucosa a la betalamina, formando betacianina, que es el pigmento final que produce el color rojo. La acción de esta enzima es crítica para estabilizar el pigmento y darle la tonalidad roja brillante Genth & Just, 2015).

Figura no.5 Mapa plásmido RUBY



Fuente: (He et al., 2020)

Mapa gráfico basado en datos de secuencia de nucleótidos marcados con enzimas de restricción, características del plásmido, ORF (marcos de lectura abiertos teóricos) y cebadores.

F. TABACO (*NICOTIANA TABACUM* L)

El tabaco es una planta perteneciente a la familia de las solanáceas, cuyo nombre científico es *Nicotiana tabacum*. Es originaria de América y se cultiva principalmente por sus hojas, que contienen nicotina, un alcaloide con propiedades estimulantes. Estas hojas se procesan de diversas maneras para ser utilizadas en productos como cigarrillos, puros, tabaco de mascar, y rapé.

Figura no.6 *Nicotiana tabacum*



Fuente: (Lanas & Serón, 2017)

Dibujo de la planta típica de tabaco en su etapa inicial de floración

El tabaco suele cultivarse en diversas condiciones climatológicas, sin embargo las condiciones para un crecimiento óptimo varían desde los 18-28 °C; la planta es muy sensible a la humedad elevada en la tierra, por lo que esta debe ser controlada para no tener un exceso de humedad que favorezca un crecimiento pobre. Es necesario el uso de tierra negra, franca o sueltas con profundidad para que las raíces puedan extenderse, además esta debe tener un pH neutro ligeramente ácido, cuidando que este no se vea muy variado durante el crecimiento de la planta para evitar enfermedades, déficit de nutrientes

o cualquier otro factor asociado que apoye su debilitamiento (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2016).

El tabaco es una de las plantas más fáciles de transformar genéticamente. Su alta eficiencia de transformación y regeneración de plantas completas a partir de células individuales lo convierten en un sistema modelo para estudiar la función de genes y la expresión de proteínas en plantas. Gracias a los estudios en tabaco, se han desarrollado técnicas que luego se aplican a otros cultivos comerciales. Esto ha permitido mejorar características agronómicas como la resistencia a plagas, enfermedades, y condiciones ambientales adversas en una amplia variedad de plantas de interés agrícola. La variedad de tabaco más comúnmente utilizada para modificaciones genéticas *Petit Havana SRI*, la cual es particularmente popular en investigaciones debido a su alta capacidad de regeneración y transformación genética. Otra especie utilizada, especialmente en estudios más básicos y como planta modelo, es *Nicotiana benthamiana*, conocida por su susceptibilidad a la infección por diversos virus, lo que la hace ideal para estudios de virología y la expresión transitoria de genes mediante técnicas como la agroinfiltración. (Huang et al., 2021).

G. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS

El uso de *Agrobacterium tumefaciens* representa ventajas para modificaciones genéticas, sin embargo como fue descrito anteriormente esta bacteria en su estado natural afecta de forma negativa las plantas a las que infecta, por lo que su uso en modificaciones genéticas puede inducir a mecanismos de defensa en las plantas que son inyectadas con esta bacteria; dentro de estos mecanismos tenemos dos principales:

- **Reacción de hipersensibilidad:** es la máxima expresión de resistencia en plantas ante el ataque de agentes patógenos. Durante la reacción las células que se encuentran situadas alrededor del sitio donde penetra el patógeno se suicidan para evitar el avance de este y detener la infección. Este tipo de reacción es considerado como Muerte Celular Programada (MCP). Este surge ante los factores de estrés que son generados en la planta estimulando el crecimiento para poder continuar con un desarrollo normal de la planta.

- Inmunidad innata: Las plantas poseen receptores de patrones asociados a patógenos (PRRs) que pueden reconocer moléculas comunes en patógenos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Al detectar PAMPs de *Agrobacterium*, como la flagelina, la planta puede activar una cascada de señalización que conduce a la expresión de genes de defensa.
 - PTI (PAMP-triggered immunity): Inmunidad desencadenada por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) mediante receptores en la superficie celular.
 - ETI (Effector-triggered immunity): Inmunidad desencadenada por el reconocimiento de efectores patogénicos a través de receptores adicionales, que activan respuestas efectoras.

H. CRECIMIENTO DE PLANTAS

El crecimiento de las plantas suele ser un proceso biológico complejo y dinámico ya que involucra muchos factores, como la división celular, expansión de células y acumulación de biomasa. Este proceso está atado a factores internos y externo, como las condiciones ambientales (agua, luz, temperatura, nutrientes) (Taiz & Zeiger, 2015).

El crecimiento vegetal es el aumento irreversible en tamaño, biomasa o volumen de una planta. Este crecimiento ocurre a través de la proliferación celular en los meristemos, que son regiones de división activa, y la posterior expansión de estas células. El crecimiento puede ser observado de forma primaria, centrándose en la elongación de raíces y tallos, y de forma secundaria, enfocándose en el engrosamiento de tallos y raíces (Taiz & Zeiger, 2015).

La medición del crecimiento de las plantas es un factor clave para la evaluación de la salud, el desarrollo y la respuesta a distintos factores ambientales o tratamientos experimentales. Existen varios métodos para medir este crecimiento, entre los cuales tenemos:

- a. Medición del crecimiento longitudinal: este método mide el incremento en longitud de alguna parte de la planta, como tallos o raíces. Se utiliza una regla o cinta métrica para medir desde la base hasta la parte más alta del tallo o medir la

longitud total de las raíces principales. Es común la medición del tallo ya que es menos invasiva y no representa un riesgo para la planta.

- b. Medición del crecimiento radial: este método mide el diámetro de los tallos o troncos, lo que refleja el crecimiento secundario. Se utiliza un calibrador o cinta dendrometría para realizar estas mediciones. Este método es utilizado principalmente en plantas leñosas con ensanchamiento pronunciado del tronco.
- c. Medición de biomasa: La biomasa se refiere al peso total de la planta y es un indicador directo de la acumulación de materia orgánica. Para este método es necesario cortar la planta, pesarla de manera inmediata posterior a ser cortada, secarla para eliminar todo el contenido de agua y finalmente sacar la proporción de peso que corresponde al aumento orgánico. Este método no es recomendado para la experimentación por lo invasivo que es (Coll et al., 2019).

I. DISEÑO ESTADÍSTICO DEL ESTUDIO

Para la determinación de la población necesaria para esta experimentación se deben tomar diferentes elementos clave para el uso de pruebas estadísticas:

- Objetivo del estudio y variables de interés.
- Tamaño del efecto esperado, estimado a partir de estudios previos o un piloto.
- Variabilidad de la población o desviación estándar de las plantas.
- Nivel de significancia (α), comúnmente 0.05.
- Potencia estadística, comúnmente 80%.

Sin embargo, para esta experimentación no se cuenta con estudios previos o pilotos estrechamente relacionadas a la experimentación para el tamaño del efecto esperado. Además, no se cuenta con la variabilidad de la población esperada.

En investigaciones biológicas, es común utilizar un tamaño de muestra reducido para minimizar el uso de recursos y el posible daño a las plantas u organismos involucrados. Utilizar más plantas de lo necesario podría considerarse un desperdicio de recursos si el tamaño de muestra es estadísticamente suficiente para obtener resultados significativos.

Algunos ejemplos de estudios que empleaban modificaciones genéticas similares o en plantas de tabaco nos brindaron los siguientes datos:

1. Según Vermeulen, T. et al. (2017) en la experimentación “*Expresión transitoria de GFP en plantas de tabaco mediante agroinfiltración*” los investigadores evaluaron la eficiencia de la expresión transitoria de la proteína fluorescente verde (GFP) en plantas de tabaco. Para la prueba inicial, se utilizaron solo **3-5 plantas** para verificar la viabilidad del sistema de expresión genética antes de expandir el estudio.
2. Li, H. et al. (2016) para su estudio “*Transformación génica mediada por Agrobacterium en el arroz: análisis de expresión transitoria con un número mínimo de plantas*”, los investigadores utilizaron **4-6 plantas** para probar la eficiencia del método de transformación mediado por *Agrobacterium*. El enfoque se centró en evaluar la presencia de transgenes antes de pasar a una escala mayor.
3. En el estudio “*Selección a pequeña escala de Arabidopsis transgénica para tolerancia a la sequía*” Xie, Q. et al. (2015) evaluaron la tolerancia a la sequía en plantas de *Arabidopsis thaliana* modificadas genéticamente. Los investigadores probaron la resistencia al estrés hídrico utilizando solo **5 plantas** por tratamiento en condiciones controladas.

Estos estudios tienen en común el uso de un número reducido de plantas en experimentos preliminares, pruebas de concepto o en situaciones donde las condiciones experimentales están altamente controladas. Utilizar pocas plantas es una estrategia eficiente para obtener resultados rápidos y optimizar recursos, sin comprometer la validez de los resultados, especialmente en estudios biotecnológicos, de modificación genética o de interacción planta-microorganismo.

J. TASA DE CRECIMIENTO ABSOLUTO (AGR- ABSOLUTE GROWTH RATE)

La tasa de crecimiento absoluto mide el cambio neto en un parámetro del crecimiento, como la longitud, el peso o el área foliar, durante un periodo de tiempo. Esta tasa proporciona el incremento directo en ese parámetro. Tomando la longitud como parámetro la tasa de crecimiento se mide:

Ecuación no. 1 Tasa de crecimiento longitudinal

$$Tasa\ de\ crecimiento = \frac{(Longitud_{final} - Longitud_{inicial})}{Longitud_{inicial}} * 100\%$$

Fuente: Pugnaire y Valladares (2017)

Esta ecuación nos permite evaluar la tasa de crecimiento de forma regular para determinar el crecimiento de las plantas en un periodo de tiempo establecido igualitario.

K. RENDIMIENTO GENERAL DEL CRECIMIENTO LONGITUDINAL

El rendimiento general se refiere al cambio neto en la longitud de la planta durante un determinado periodo de tiempo. Se centra en la diferencia total entre la longitud inicial y final de la planta.

Ecuación no.2 rendimiento general crecimiento longitudinal

$$RG = Crecimiento_{final} - Crecimiento_{inicial}$$

Fuente: Pugnaire y Valladares (2017)

La ecuación nos brinda la cantidad total de crecimiento en términos de longitud, expresado en centímetros (cm).

L. PRODUCTIVIDAD MEDIA DEL CRECIMIENTO LONGITUDINAL

La productividad media del crecimiento longitudinal mide el crecimiento promedio por unidad de tiempo, es decir, cuánto crece la planta en términos de longitud en un periodo de tiempo específico. Es una forma de estandarizar el crecimiento para facilitar la comparación entre diferentes plantas o en distintos intervalos de tiempo.

Ecuación no.3 Productividad media

$$PM = \frac{Crecimiento_{final} - Crecimiento_{inicial}}{t_2 - t_1}$$

Fuente: Gardner et al. (2016)

Donde $t_2 - t_1$ es el intervalo de tiempo entre las dos mediciones, expresado en días, semanas, meses, etc. El resultado indica la tasa promedio de crecimiento longitudinal por unidad de tiempo, expresado en unidades como cm/semana.

M. PRUEBAS ESTADÍSTICAS UTILIZADAS

1. Análisis de varianza ANOVA

El análisis de varianza (ANOVA) de un factor es un método estadístico utilizado para evaluar las diferencias en las medias de tres o más grupos y para probar la hipótesis nula (H_0) de que tres o más medias poblacionales son iguales, frente a la hipótesis alternativa (H_a) de que al menos una de las medias es diferente. Este enfoque se aplica cuando se tiene una única variable o factor independiente y se busca determinar si las variaciones o distintos niveles de ese factor afectan significativamente una variable dependiente.

Ecuación no. 4 Notación formal de las hipótesis estadísticas

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_K$$

Fuente: (JMP Statistical Discovery, 2019)

Donde H_0 es la hipótesis nula y μ es la media del n nivel del factor

2. Prueba de Scheffé

La prueba de Scheffé es una técnica utilizada para realizar comparaciones múltiples entre las medias de distintos grupos, estrechamente relacionada con el análisis de la varianza (ANOVA). Este análisis contrasta la hipótesis de igualdad de medias entre dos o más grupos, y si se encuentra un resultado estadísticamente significativo, indica que al menos una de las medias es diferente de las demás. Este se utiliza principalmente cuando se tienen muestras de diferentes tamaños. Las pruebas de comparaciones múltiples, como la de Scheffé, corrigen este error para asegurar que no supere el nivel de significancia establecido, como el 5%. La prueba de Scheffé se lleva a cabo comparando todos los pares posibles de medias, utilizando como error típico la varianza residual o intragrupos obtenida durante el análisis de la varianza (Mazuera, 2020).

Para analizar las diferencias entre las plantas modificadas y el control, se utilizaron pruebas estadísticas como el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Scheffé. Estas herramientas permiten evaluar si existen diferencias significativas en las tasas de crecimiento y otros parámetros evaluados.

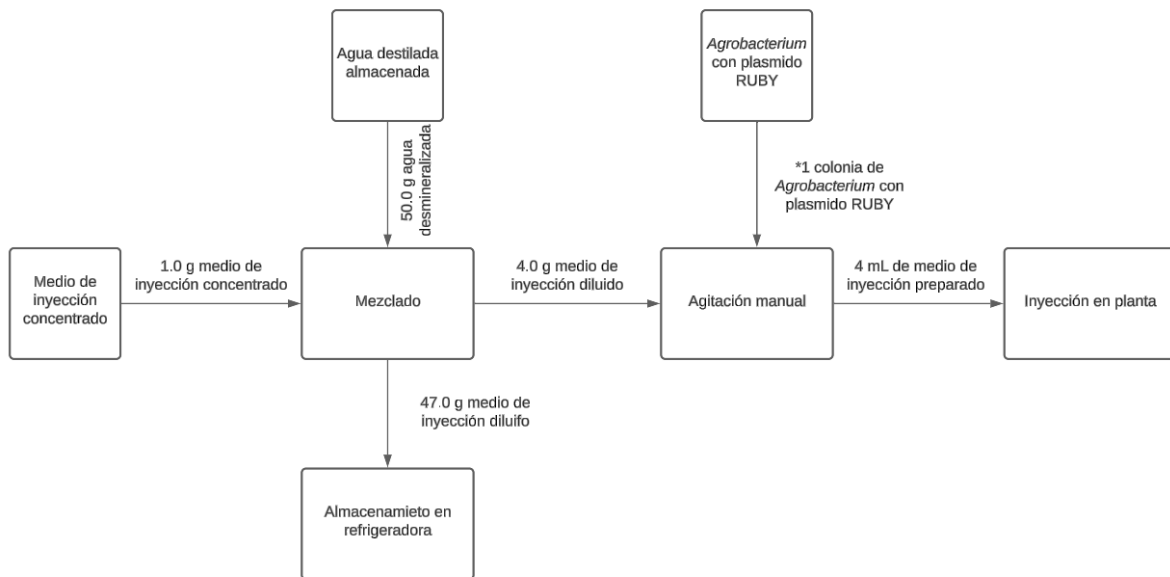
El ANOVA es particularmente útil en estudios experimentales porque permite comparar las medias de tres o más grupos simultáneamente, minimizando el riesgo de error tipo I. En este estudio, se utilizó un ANOVA de una vía para determinar si las variaciones en las condiciones de crecimiento tuvieron un impacto significativo en los resultados. La hipótesis nula (H_0) establece que las medias de crecimiento de todos los grupos son iguales, mientras que la hipótesis alternativa (H_a) sugiere que al menos una media es distinta.

Para identificar específicamente qué grupos difieren entre sí, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé. Esta prueba es especialmente robusta y adecuada para experimentos donde los tamaños de muestra pueden ser desiguales. Su aplicación garantiza que los errores de comparación se mantengan dentro del nivel de significancia establecido. Además, la prueba de Scheffé ofrece flexibilidad al permitir contrastes entre combinaciones de grupos, lo que proporciona una evaluación más detallada de las diferencias observadas.

Los datos estadísticos se analizaron utilizando software especializado (*IBM STATISTICS*), lo que asegura la precisión de los resultados y facilita la interpretación de estos. Estas pruebas están alineadas con la metodología empleada y respaldan la robustez de las conclusiones del estudio.

N. DIAGRAMA DE FLUJO

Figura no. 7 Diagrama de flujo modificación genética en plantas de tabaco



En la figura se puede observar el procedimiento general de modificación genética a seguir para las plantas de tabaco, Este diagrama detalla los pasos, desde la preparación del medio de inyección hasta la inoculación en la planta.

O. BALANCE DE MASA Y ENERGÍA TEÓRICOS

Los balances fueron realizados para la etapa crítica de la experimentación, el crecimiento de la planta, tomando algunos supuestos para poder completarlos.

1) Balance de masa teórico

Para el balance de masa se tomó una masa inicial de 10 g con un crecimiento en planta de 14 cm, lo cual representa aproximadamente 7g de biomasa. Se consideró que se necesita 1 kg de tierra para que la planta pueda crecer de forma adecuada.

$$\begin{aligned}
 & M_{\text{entrada}} = M_{\text{salida}} \\
 & M_{\text{planta inicial}} + M_{\text{tierra}} + M_{\text{medio de inyección}} + M_{\text{agrobacterium}} + M_{\text{agua}} \\
 & = M_{\text{final planta}} + M_{\text{pérdidas}} + M_{\text{tierra}} + M_{\text{agua retenida}} + M_{\text{agua perdida}}
 \end{aligned}$$

NOTA: la masa de la colonia del *Agrobacterium* es despreciada ya que es extremadamente pequeña y no se cuenta con una balance o método con la sensibilidad necesaria para medir esta masa

$$\begin{aligned} &0.01 \text{ kg planta de tabaco} + 1 \text{ kg tierra} + 0.004 \text{ kg de medio} + 9 \text{ kg de agua} \\ &= 0.17 \text{ kg de planta} + 1 \text{ kg tierra} + 0.9 \text{ kg agua retenida} \\ &+ 8.1 \text{ kg agua perdida} \end{aligned}$$

Nota: se asumió un 90% de agua perdida por medio de evaporación o transpiración de la tierra por la temperatura ambiente.

2) Balance de energía

Para el balance de energía se tomaron 3 fuentes principales de luz durante el crecimiento de la planta: Luz artificial, el tapete de calentamiento y la luz solar. Estas 3 fuentes fueron las utilizadas durante el crecimiento de toda la planta.

$$\begin{aligned} E_{total} &= E_{luz\ artificial} + E_{tapete} + E_{solar} \\ E_{total} &= 1.44 \text{ MJ} + 9.504 \text{ MJ} + 1.296 \text{ MJ} = 12.24 \text{ MJ} \end{aligned}$$

Nota: se supuso que el sol aporta aproximadamente 600 W/m²

V. ANTECEDENTES

Recientemente, en el año 2020, He, *et al.*, introdujeron un nuevo sistema de reportero denominado RUBY, que convierte el aminoácido tirosina en betalaina roja, un pigmento visible a simple vista. Este sistema no solo permite la visualización de la expresión génica sin la necesidad de equipos especiales, sino que también facilita la selección no invasiva de eventos de transformación en especies como *Arabidopsis* y arroz. RUBY se ha demostrado como un marcador efectivo que puede ser utilizado en condiciones de cultivo natural, lo que representa una ventaja significativa sobre los reporteros tradicionales. Además, RUBY ofrece beneficios adicionales en términos de costo y sostenibilidad. Al no requerir sustratos costosos ni tratamientos químicos, este sistema proporciona una alternativa más accesible y económica para la investigación y el desarrollo de cultivos. Asimismo, al ser un producto natural, presenta menos preocupaciones ambientales y de salud en comparación con los marcadores que utilizan resistencia a antibióticos o herbicidas.

Otra investigación realizada por Tabara, *et al.*, en 2024, habla sobre como la agroinfiltración ha emergido como una técnica fundamental en la biología molecular de plantas, permitiendo la expresión transitoria de genes a través de la introducción de T-DNA por *Agrobacterium tumefaciens*. Este método ha facilitado avances significativos en el estudio del silenciamiento de RNA, un proceso esencial para la regulación genética y la defensa de las plantas contra patógenos. Recientemente, se ha introducido un nuevo sistema de reportería basado en RUBY, un mRNA policistrónico que codifica tres enzimas clave en la biosíntesis de betalainas. Este sistema no solo proporciona una confirmación visual de la expresión génica y los niveles de silenciamiento, sino que también permite la cuantificación rápida de los niveles de betalainas mediante mediciones de absorbancia. En experimentos, la co-infiltración de RUBY con p19, un conocido supresor de silenciamiento de RNA, resultó en una acumulación de betalainas cinco veces mayor en comparación con la infiltración de RUBY solo, lo que resalta la eficacia del sistema para evaluar la silenciamiento de RNA. Además, se ha demostrado que la co-infiltración de RUBY con inductores de silenciamiento de RNA, dirigidos a genes específicos dentro del constructo RUBY, reduce de manera efectiva

los niveles de mRNA de RUBY y de betalainas. Esto sugiere que el sistema RUBY puede ser utilizado como una herramienta simple y rápida para el análisis cuantitativo de la silenciación de RNA, eliminando la necesidad de equipos especializados. Este enfoque representa una mejora significativa sobre los métodos de reportería convencionales, ofreciendo una plataforma accesible para una amplia gama de estudios sobre la silenciación de RNA en plantas.

VI. METODOLOGÍA

A. PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD

Materiales y equipo

- Guantes desechables de nitrilo
- Bata de laboratorio
- Campana de extracción con flujo laminar
- Contenedor de desechos biológicos

Procedimiento

1. Colocarse guantes desechables de nitrilo y utilizarlos en todo momento de la experimentación para evitar contacto directo con muestras biológicas.
2. Usar mascarillas de protección respiratoria durante todo el procedimiento experimental para prevenir la inhalación de partículas potencialmente peligrosas.
3. Portar bata de laboratorio que cubran completamente la ropa para proteger al personal de posibles contaminantes biológicos.
4. Trabajar dentro de campanas de extracción con flujo laminar para garantizar un ambiente aséptico y evitar la diseminación de materiales biológicos.
5. Disponer de contenedores especializados para recolectar desechos biológicos y evitar su contacto con el entorno.
6. Limpiar el área de trabajo con una solución de etanol al 70% antes y después de cada sesión experimental para eliminar cualquier contaminante.
7. Esterilizar todas las herramientas antes de su uso, asegurando que estén libres de microorganismos.
8. Preparar los medios de cultivo y realizar la inoculación empleando técnicas de manejo aséptico para evitar contaminaciones cruzadas.
9. Recolectar los restos de plantas y medios de cultivo contaminados en bolsas especiales para desechos biológicos, evitando su manipulación directa.
10. Esterilizar los desechos mediante autoclave antes de su disposición final para garantizar su desactivación segura.
11. Registrar detalladamente cada sesión experimental, incluyendo el manejo de organismos genéticamente modificados, para mantener un control estricto de las actividades.

12. Limitar el acceso al área de trabajo al personal autorizado y capacitado en bioseguridad para prevenir el ingreso no autorizado.
13. Garantizar que todas las plantas se manipulen exclusivamente dentro de los laboratorios asignados en la Universidad, evitando su traslado bajo cualquier circunstancia.

***Cumplimiento de normativas:** El experimento se llevó a cabo siguiendo los lineamientos internacionales de bioseguridad para el manejo de organismos genéticamente modificados (OGM), así como las normativas locales aplicables en Guatemala.

B. SELECCIÓN PLANTAS ESTUDIO

Materiales y equipo

- Plantas de tabaco adquiridas en vivero (13 unidades).
- Herramientas de medición para evaluación de tamaño.
- Espacio controlado para adaptación de plantas.

Procedimiento

14. Se exploraron diversas opciones de viveros a nivel nacional.
15. San Juan La Laguna fue elegido por ser el único lugar que contaba con plantas de tabaco disponibles.
16. Se realizó una visita al vivero para inspeccionar las condiciones de las plantas y garantizar su idoneidad para el experimento.
17. Se compraron un total de 13 plantas para la experimentación
18. Las 13 plantas de tabaco fueron adquiridas y transportadas al laboratorio bajo condiciones controladas para evitar daños.
19. Cada planta fue inspeccionada individualmente en busca de uniformidad en tamaño, salud general (hojas y tallo) y ausencia de plagas visibles.
20. Se eligieron 7 plantas con tamaño similar para garantizar un punto de partida homogéneo en la experimentación y tener un grupo reducido para un mejor monitoreo y control de las variables ambientales.
21. Se tomó un periodo de adaptación en las cuales las plantas seleccionadas fueron expuestas gradualmente a las condiciones experimentales.

22. Durante este periodo se vigiló su salud y desarrollo para confirmar que estaban en condiciones óptimas antes de iniciar el experimento.

C. MEDICIÓN HUMEDAD DE LA TIERRA Y LUZ EN PLANTAS

Materiales y equipo

- Medidor de suelo de 3 vías

Procedimiento:

23. Colocar las 2 sondas inferiores del medidor en la tierra procurando que los sensores queden cubiertos por completo
24. Colocar el aparato en medición de humedad
25. Dejar el aparato por un minuto
26. Realizar lectura y anotar
27. Leer en la parte de medidor Lux y anotar

D. PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN AGAR LB RIF/SPEC

Materiales y equipo:

- Cajas Petri
- Cinta testigo
- Probeta de 100 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Agua destilada
- Aluminio
- Agitador magnético
- Estufa de laboratorio
- Agar LB Rif/Spec
- Autoclave

Procedimiento:

1. Tomar el tubo etiquetado como LB Rif/Spec Agar y se verter su contenido en el Erlenmeyer de 250 mL

2. Añadir 150 mL de agua destilada utilizando la probeta de 500 mL.
3. Cubrir el Erlenmeyer con aluminio en la parte superior y se rotular adecuadamente.
4. Trasladar el Erlenmeyer a una estufa eléctrica con temperatura de 130°C y agitación a 200 rpm para calentar el medio.
5. Calentar y alcanzar el punto de ebullición el Erlenmeyer, posteriormente trasladar a una autoclave colocándole un trozo de cinta testigo.
6. Esterilizar el agar dentro del Erlenmeyer a 121°, 103 kPa por 20 minutos, el ciclo en total de la autoclave tomando en cuenta preparación y enfriamiento es de 2 horas.
7. Al terminar el ciclo de la autoclave retirar el erlenmeyer de este y se dejó enfriar a temperatura ambiente
8. Verter el medio esterilizado en 5 cajas Petri cubriendo la mitad inferior de las placas, posteriormente fueron cerradas y selladas con Parafilm, identificadas con los datos necesarios.
9. Almacenar las cajas Petri en refrigerador a 4 °C, volteando los platos boca abajo para que la condensación no goteara sobre el medio.

E. INOCULACIÓN DE *AGROBACTERIUM* MODIFICADO CON PLASMIDO RUBY

Materiales y equipo:

- Micropipeta de 10- 100 µL
- Puntas de micropipeta estériles
- Pipeta pasteur
- Mechero
- Encendedor
- Asa bacteriológica
- Parafilm
- Etanol al 70%

Reactivos y material biológico

- *Agrobacterium* con plásmido RUBY liofilizado

- Agua estéril

Procedimiento:

1. Limpiar el interior de la campana de extracción con etanol al 70%, se encendió la lámpara de luz UV de esta por 2 minutos, posteriormente se apagó la luz y se encendió el flujo laminar y la luz blanca de la campana.
2. Trabajar en el interior de la campana con un mechero encendido para garantizar que el área de trabajo se mantuvo estéril
3. Tomar el tubo que contenía el *Agrobacterium* con plásmido RUBY liofilizado y agregar 6 gotas de agua estéril utilizando la pipeta pasteur.
4. Agitar suavemente durante un minuto para asegurarse de que las bacterias se disuelvan
5. Agregar 50 μL de la bacteria a una placa con agar LB Rif/Spec.
6. Usando el asa bacteriológica propagar las bacterias en la placa, colocar la tapadera de la placa y se cerrar con Parafilm dejando en incubación a 25 °C durante 24 horas.

F. MODIFICACIÓN GENÉTICA EN PLANTA

Materiales y equipo:

- Tubo de 15 mL
- Jeringas
- Pipeta de 100 a 1000 μL
- Puntas esterilizadas
- Tubo de 50 mL
- Probeta de 50 mL
- Pipeta pasteur
- Asa bacteriológica

Reactivos y material biológico:

- Concentrado de medio de inyección
- Agua desmineralizada
- Plantas de tabaco

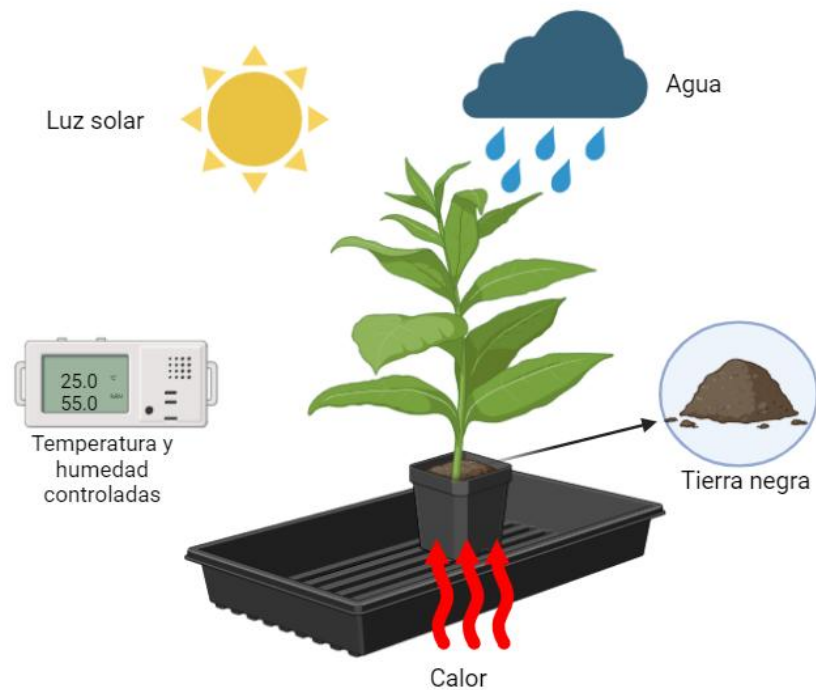
Procedimiento:

1. Tomar la probeta de 50 mL y se llenó hasta la línea de 50 mL con agua desmineralizada. Pipetear 1000 μ L de medio de inyección, se enroscó la tapadera al tubo y se agitó suavemente la solución
2. Agregar 4 mL de medio de inyección diluido al tubo de 15 mL, guardando el resto en la refrigeradora.
3. Con ayuda del asa bacteriológica se tomar una muestra de *Agrobacterium* de la placa inoculada.
4. Colocar la muestra en el interior de los 4 mL del medio diluido, se agitó suavemente el asa para liberar el *Agrobacterium* tomado. Cerrar el tubo con la tapadera y mezclar levemente para deshacer grumos presentes.
5. Utilizando la jeringa se tomar 0.5 mL del medio con *Agrobacterium*. Sacar el aire de la jeringa y colocar el extremo firmemente contra la parte inferior de una hoja en un lugar plano y suave, evitando las venas.
6. Colocar un dedo suavemente, pero con firmeza, contra el otro lado para sostener la hoja. Se presionó muy lentamente el émbolo para empujar el medio y las bacterias dentro de la hoja (para instrucciones visuales consultar anexos).
7. Dejar las plantas inyectadas en observación de 2 a 7 días.

VII. RESULTADOS

A. AMBIENTE RECREADO PARA PLANTAS DE TABACO

Figura no.8 Esquema requerimientos básicos para el crecimiento de las plantas de tabaco



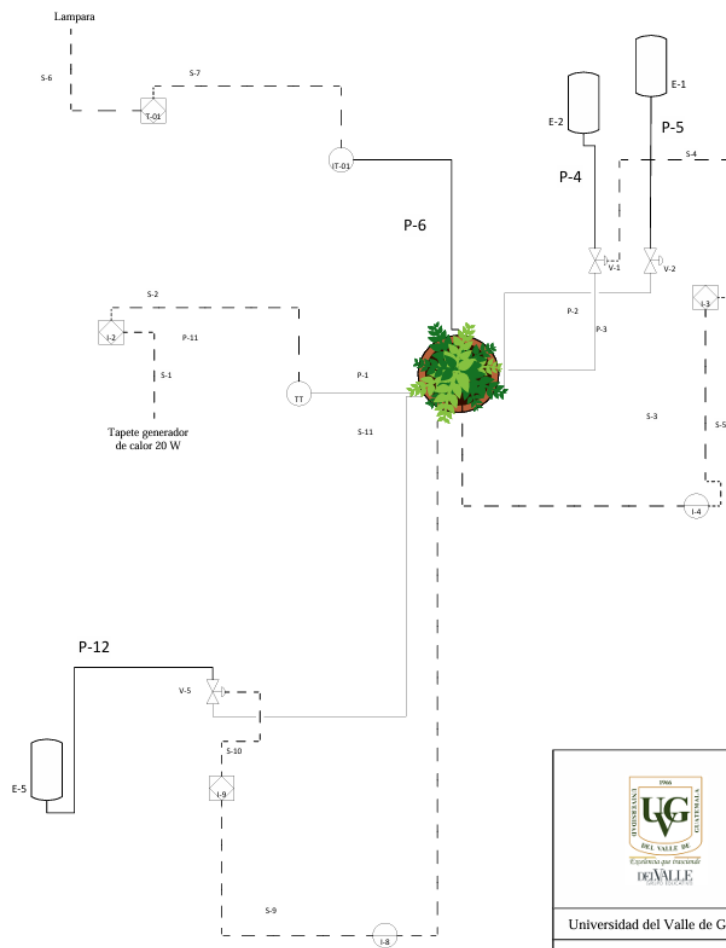
La Figura No. 8 muestra un esquema visual sobre los factores ambientales que deben ser gestionados para un crecimiento exitoso de las plantas de tabaco; entre estos se encuentra la luz solar, agua, tipo de tierra, calor y condiciones a controlar. El esquema fue realizado en la herramienta web *BioRender*.

Cuadro no.1 Condiciones ambientales necesarias para el crecimiento de la planta de tabaco

Condiciones necesarias	Rango teórico	Rango experimental	Incertidumbre	Condiciones del suelo
Temperatura	20-30°C	26-28°C	±0.05	Tierra negra con textura franca; pH 6.5-7.0
Humedad	60-70%	60-70%	±0.5	Moderada capacidad para la retención de agua
Luz	6-8 horas	8 horas	±0.5	N/A

El Cuadro No. 1 presenta las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento de la planta de tabaco, comparando el rango teórico recomendado para cada parámetro con el rango utilizado experimentalmente durante toda la experimentación. La humedad fue medida en base seca. Las plantas de tabaco se cultivaron en tierra negra con textura franca, seleccionada por su adecuada porosidad y drenaje, lo que permite un desarrollo radicular eficiente.

Figura no. 9 Piping and Instrumentation Diagram (P&ID) sistema de crecimiento plantas de tabaco con el kit de propagación premium Super Sprouter en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala



Lista de válvulas

Texto mostrado	Descripción
V-1	válvula de control para el flujo de ácido.
V-2	válvula de control para el flujo de base.
V-5	válvula de control para el flujo de ácido.

Lista de equipamiento

Texto mostrado	Descripción	Material
E-1	Dosificador con base para regular el pH de la reacción.	Acero Inoxidable
E-2	Dosificador con ácido para regular el pH de la reacción.	Acero Inoxidable
E-5	Tanque de agua	Acero Inoxidable

Lista de canalizaciones

Texto mostrado	Descripción	Cantidad
P-1	Conección sensor temperatura con reactor.	1
P-11	Conductor de agua	1
P-12	Conductor de agua	1
P-2	Conductor de ácido.	1
P-3	Conductor de base.	1
P-4	Conductor de ácido.	1
P-5	Conductor de base.	1

Lista de instrumentos

Texto mostrado	Descripción
I-2	válvula de control de medición de temperatura.
I-3	Válvula de control medidor de pH de la reacción dentro del reactor.
I-4	Indicador de pH PLC.
I-8	Indicador de humedad PLC.
I-9	Válvula de control medidor de humedad
IT-01	Controlador de tiempo
T-01	Temporizador analógico
TT	Indicador de temperatura PLC.


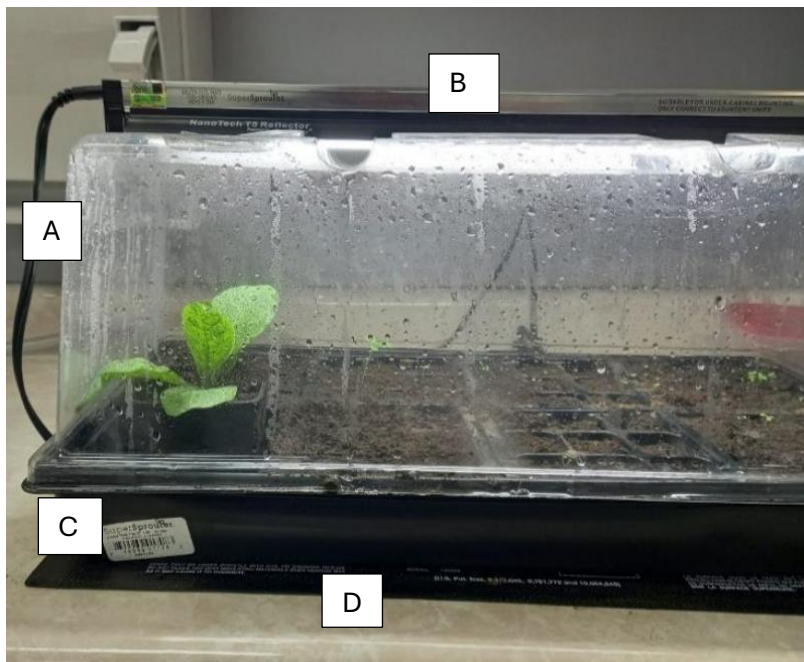
	Karen Natalia Xicará Coti Carné 20532		
	Piping and Instrumentation Diagram (P&ID) sistema de crecimiento plantas de tabaco con el kit de propagación premium Super Sprouter en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala		
Universidad del Valle de Guatemala	TAMAÑO A2	Nº DE FAX N/A	Nº DIBUJO 01
Trabajo de graduación	ESCALA 1:1	HOJA 1 DE 1	REV. 1 DE 1

Figura no. 9 Kit de propagación premium Super Sprouter en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala



El kit de propagación premium Super Sprouter es un sistema completo para la proveer el ambiente para el crecimiento de semillas y plantas. El kit incluye un (A) domo ventilado ultra transparente de 7 pulgadas con canales de riel de luz incorporados, (B) una luz de cultivo fluorescente T5 de alto rendimiento de 18 pulgadas diseñada para el domo con canales, (C) una bandeja plástica de 10 x 20 pulgadas de espesor doble sin agujeros y (D) un tapete térmico que alcanza 5-10°C superior a la temperatura ambiente.

Figura no. 10 Medidor de suelo de 3 vías en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala



Este medidor de suelo 3 en 1 marca *Bond*, es capaz de proporcionar lecturas rápidas y precisas de la humedad del suelo, el pH y la luz solar, lo que facilita la determinación de cuándo regar las plantas y controlar los niveles de pH. La doble sonda debe insertarse en la tierra de las plantas, esto permite la medición precisa en un rango de humedad del 1-10, y un rango de pH de 3,5-8 pH. En la parte superior cuenta con un sensor automático de luz relativa de 0-2,000 Lux.

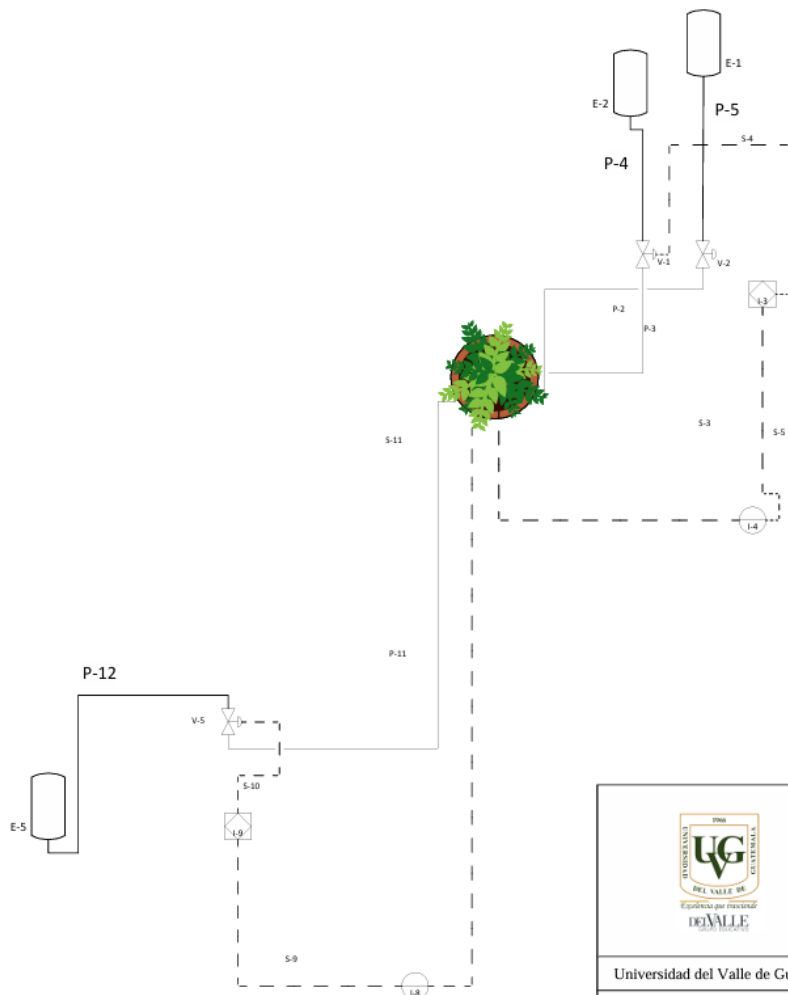
Figura no.11 Temporizador analógico 1 evento en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala



Este temporizador permite el paso de electricidad para programar el encendido o apagado de diferentes aparatos eléctricos; posee un tiempo de ajuste mínimo de 15 minutos y ajuste

máximo de 24 horas. Cuenta con interruptor de mano para cualquier cambio instantáneo. Este temporizador fue utilizado para brindar periodos de luz controlados a las plantas durante el tiempo que se encontraron dentro de laboratorio.

Figura no.12 Piping and Instrumentation Diagram (P&ID) sistema de crecimiento plantas de tabaco en plataforma metalico en el interior del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala



Lista de válvulas	
Texto mostrado	Descripción
V-1	válvula de control para el flujo de ácido.
V-2	válvula de control para el flujo de base.
V-5	válvula de control para el flujo de agua

Lista de instrumentos	
Texto mostrado	Descripción
I-2	válvula de control de medición de temperatura.
I-3	Válvula de control medidor de pH de la reacción dentro del reactor.
I-4	Indicador de pH PLC.
I-8	Indicador de humedad PLC.
I-9	Válvula de control medidor de humedad

Lista de equipamiento		
Texto mostrado	Descripción	Material
E-1	Docificador con base para regular el pH de la reacción.	Acero Inoxidable
E-2	Dosificador con ácido para regular el pH de la reacción.	Acero Inoxidable
E-5	Tanque de agua	Acero Inoxidable

Lista de canalizaciones		
Texto mostrado	Descripción	Cantidad
P-11	Conductor de agua	1
P-12	Conductir de agua	1
P-2	Conductor de ácido.	1
P-3	Conducto de base.	1
P-4	Conductor de ácido.	1
P-5	Conducto de base.	1


	Karen Natalia Xicará Coti Carné 20532			
	Piping and Instrumentation Diagram (P&ID) sistema de crecimiento plantas de tabaco en plataforma metalico en el interior del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala			
Universidad del Valle de Guatemala	TAMAÑO A2	Nº DE FAX N/A	Nº DIBUJO 01	REV.
Trabajo de graduación	ESCALA 1:1		HOJA	1 DE 1

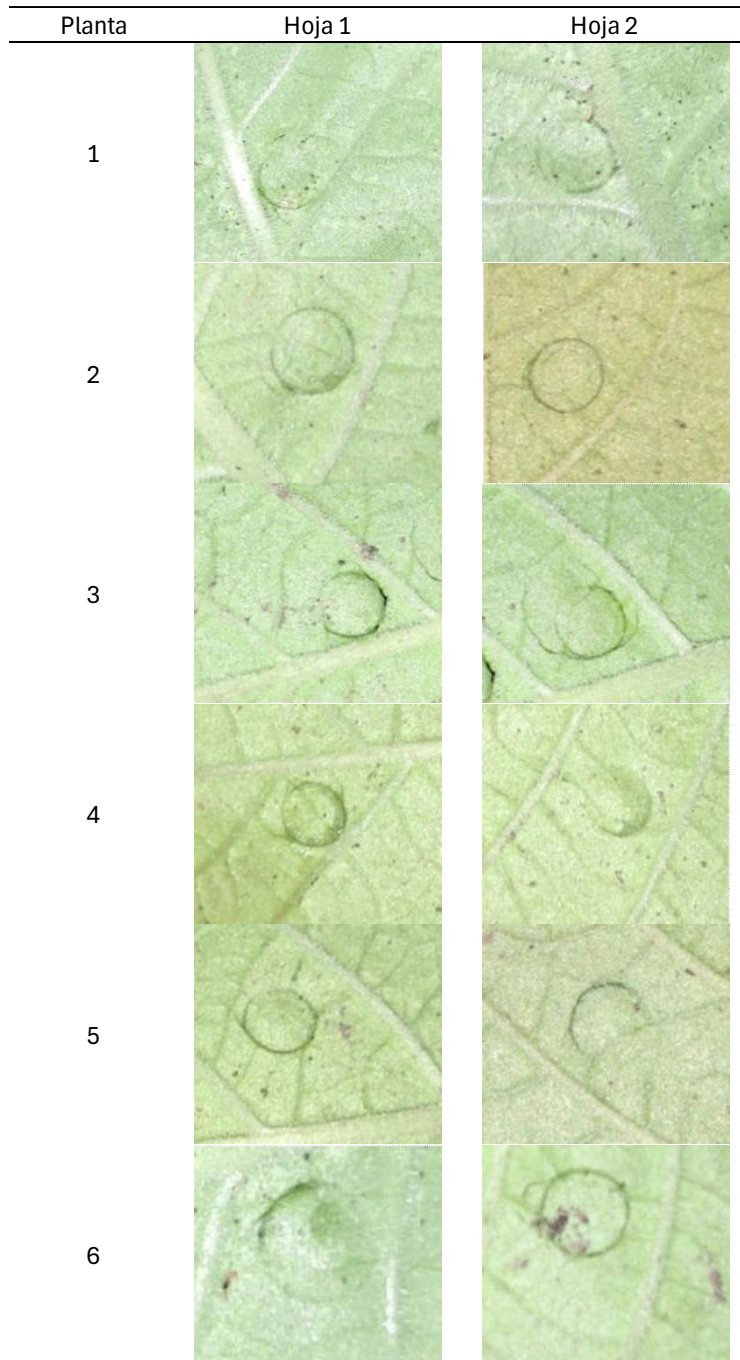
Figura no. 13 Soporte de metal aéreo para plantas en el interior del Laboratorio Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala



Soporte metálico con piso tipo reja y tubos en los laterales. Se encuentra en la parte superior de Laboratorio de Operaciones Unitarias, junto a una serie de ventanas. Este espacio brindó el aislamiento necesario dentro del laboratorio para poder controlar las plantas manteniendo condiciones de luz y aire óptima para su crecimiento.

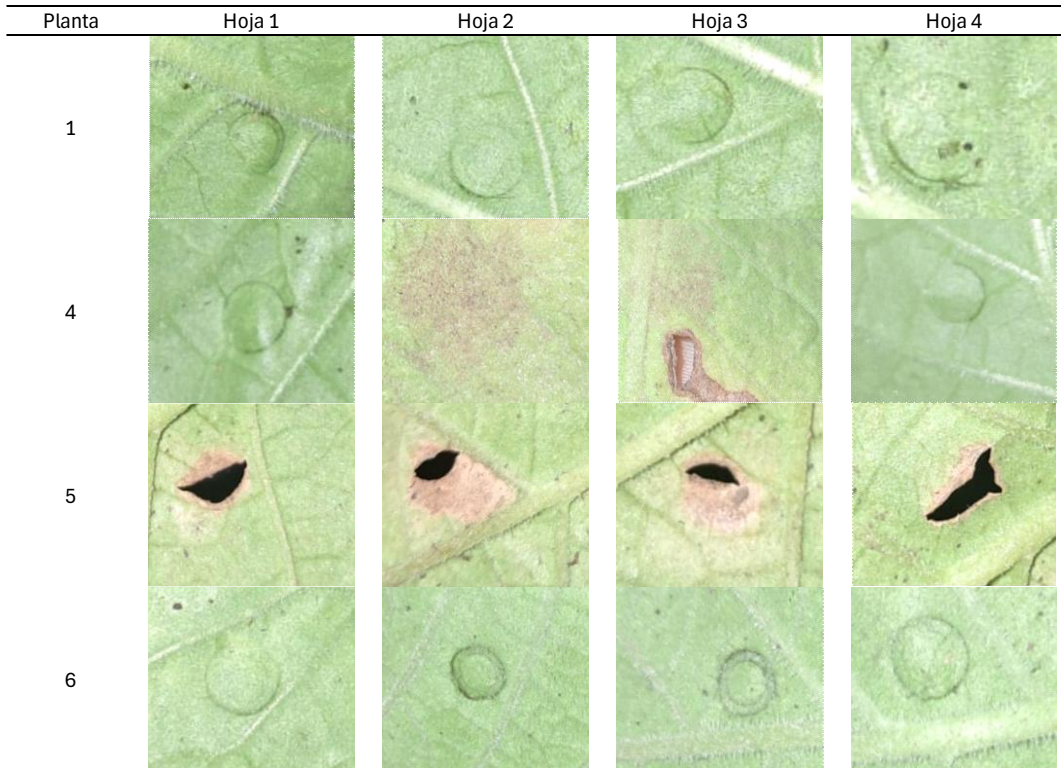
B. MODIFICACIÓN GENÉTICA EN PLANTA

Cuadro no. 2 Primera inyección *Agrobacterium* con plásmido *Ruby* en las hojas de planta de tabaco



Como se puede observar en el Cuadro no.1 las 6 plantas se sometieron a la primera inyección, todas las fotografías fueron tomadas pasados 7 días después de la exposición al plásmido. No se obtuvo ningún cambio de coloración en las hojas inyectadas, la modificación no se llevó a cabo.

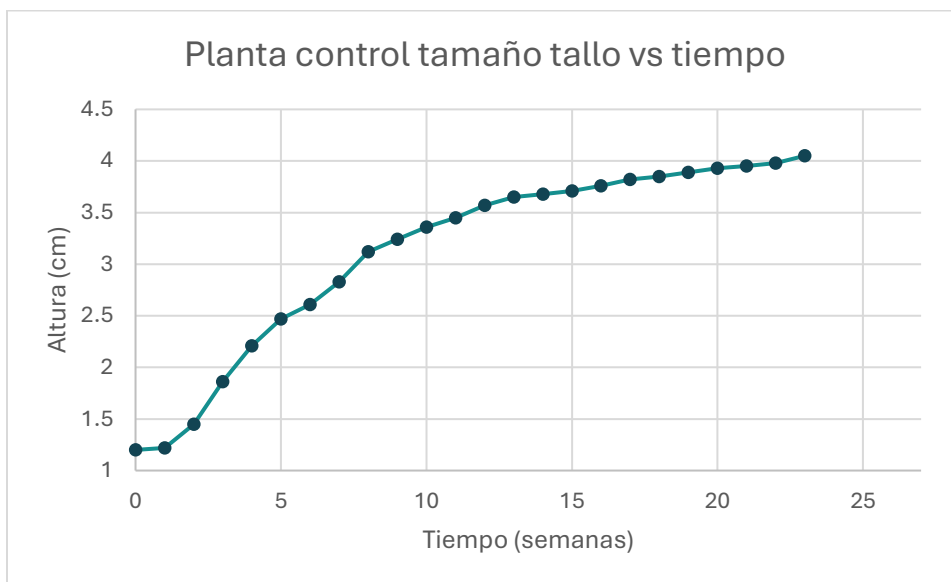
Cuadro no.3 Segunda inyección *Agrobacterium* con plásmido *Ruby* en las hojas de planta de tabaco



Como se puede observar en el Cuadro, 4 de las 6 plantas se volvieron a someter a una segunda inyección, todas las fotografías fueron tomadas pasados 7 días después de la exposición al plásmido. Se obtuvo resultados positivos a modificación genética en la hoja 2 y 3 de la planta no.4, el resto de las plantas se mantuvieron sin la modificación.

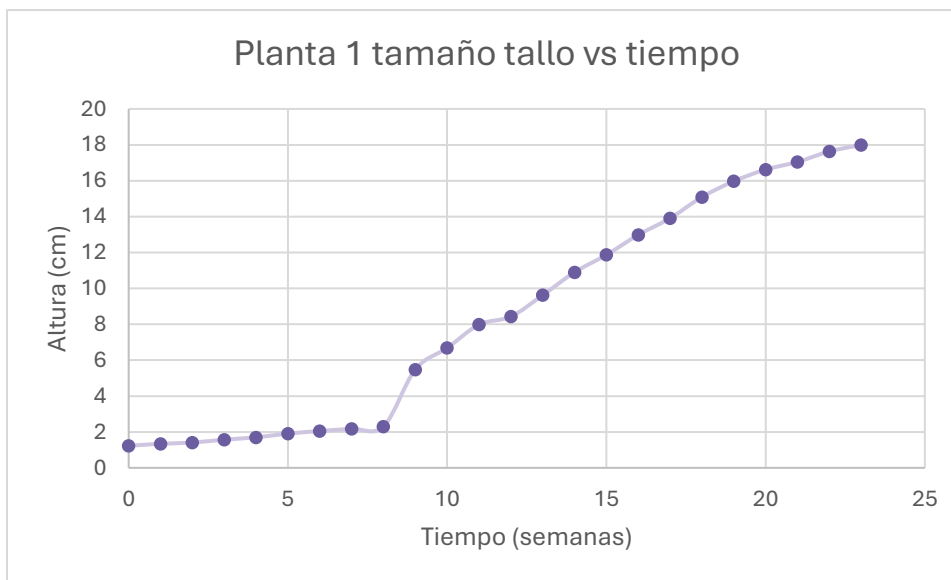
C. CURVAS DE CRECIMIENTO PLANTAS MODIFICADAS Y CONTROL

Figura no. 13 Curva de crecimiento planta control



En la figura se evaluó el crecimiento de la planta control bajo las condiciones adaptadas para su crecimiento, esta planta tuvo una altura máxima de 4.17 cm en un crecimiento de 25 semanas en total. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos por medición manual, la línea que une los puntos es una suavización automática realizada en el software *Microsoft Excel* para unir los puntos.

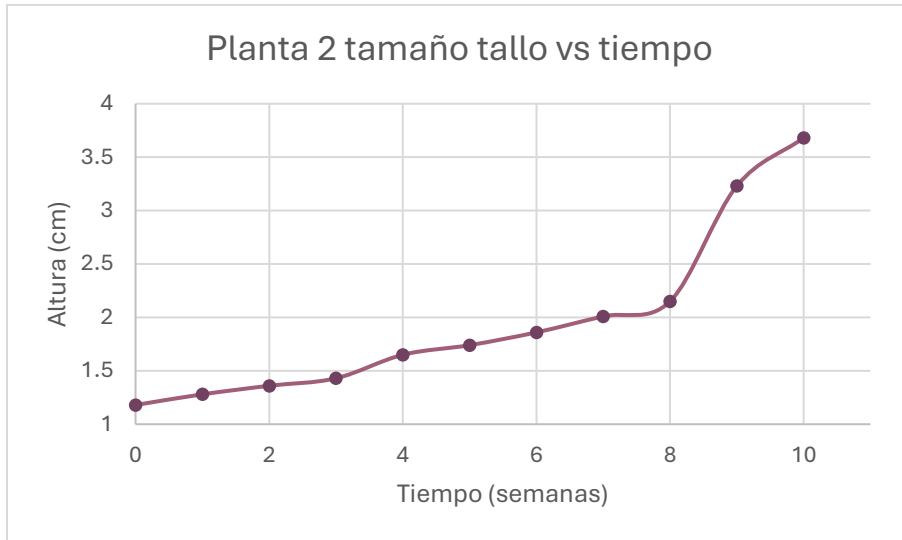
Figura no. 14 Curva de crecimiento planta 1



En la figura se evaluó el crecimiento de la planta no.1, en esta se puede observar un salto en el crecimiento posterior a la primera modificación realizada en la semana 8, el cual continúa aumentando más su tamaño posterior a la segunda inyección en la semana 14. Esta planta

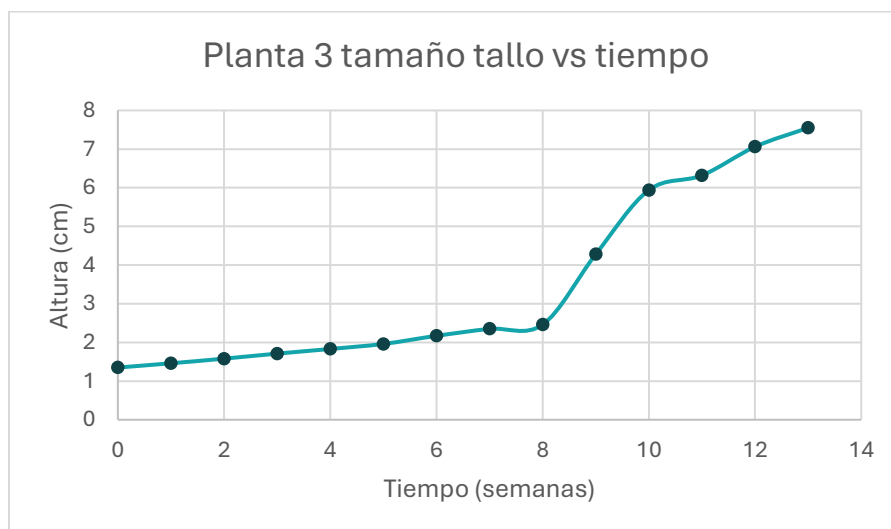
alcanzó un máximo de 18 cm. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos por medición manual, la línea que une los puntos es una suavización automática realizada en el software *Microsoft Excel* para unir los puntos.

Figura no.15 Curva de crecimiento planta 2



En la figura se evaluó el crecimiento de la planta no.2, en esta resalta un pequeño salto de crecimiento en la semana 9 seguido de la muerte de la planta en la semana 10 posterior a la primera inyección. Esta planta alcanzó un máximo de 3.68 cm. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos por medición manual, la línea que une los puntos es una suavización automática realizada en el software *Microsoft Excel* para unir los puntos.

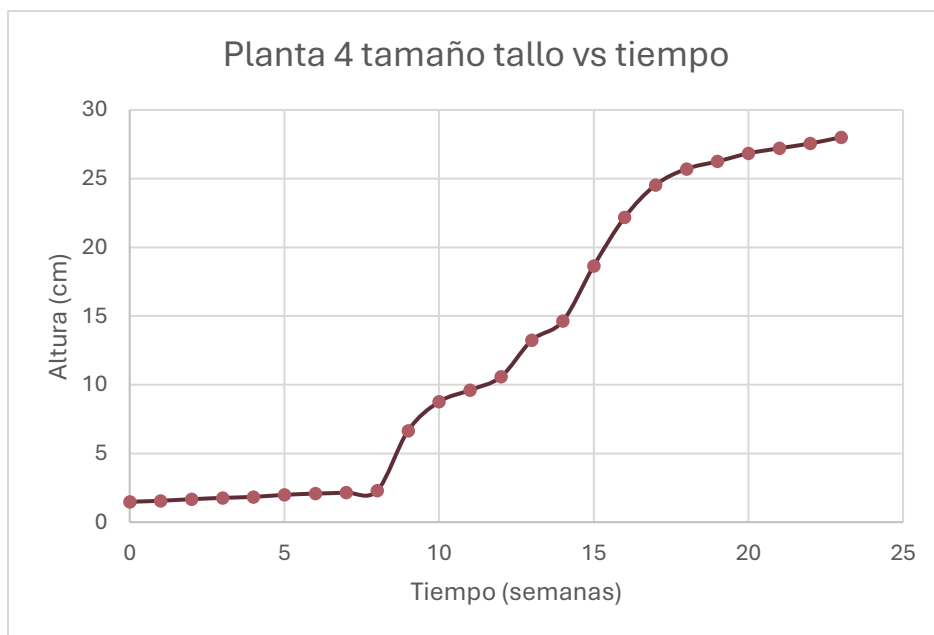
Figura no.16 Curva de crecimiento planta 3



En la figura se evaluó el crecimiento de la planta no.3, en esta resalta un salto de crecimiento en la semana 9 posterior a la primera inyección, seguido de la muerte alrededor de la semana 13 antes de la segunda inyección. Esta planta alcanzó un máximo de 7.55 cm. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos por medición manual, la línea que une los

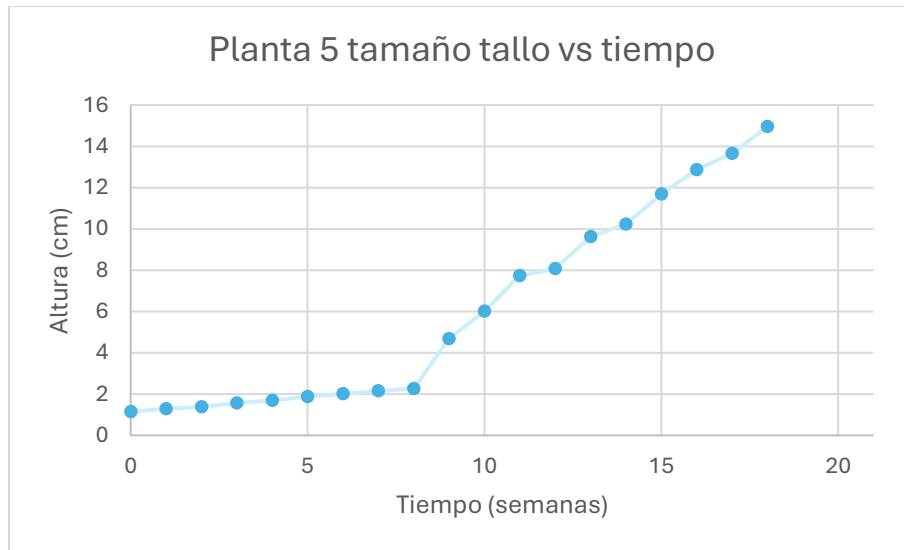
puntos es una suavización automática realizada en el software *Microsoft Excel* para unir los puntos.

Figura no.17 Curva de crecimiento planta 4



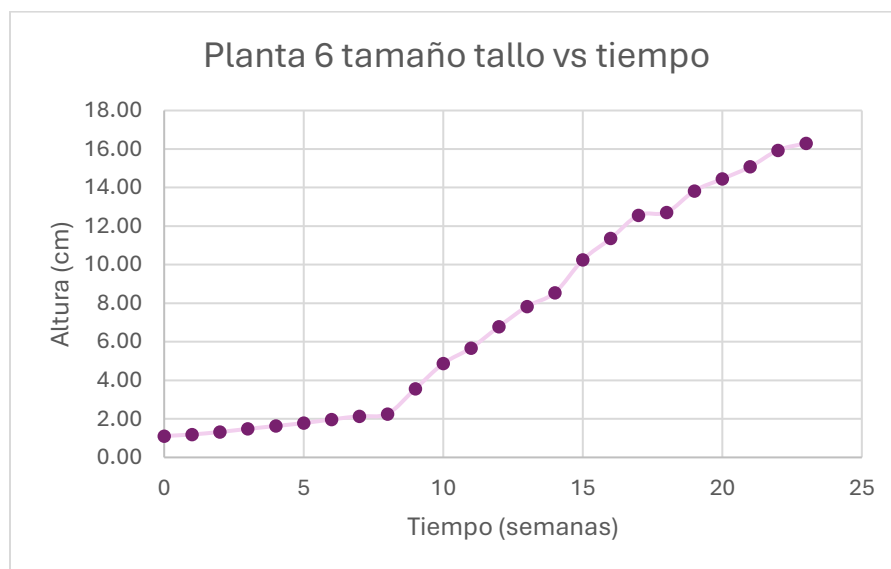
En la figura se evaluó el crecimiento de la planta no.4, en esta resaltan dos saltos de crecimiento posterior a las inyecciones estabilizando el crecimiento al ya no ser expuesta al *Agrobacterium* con plásmido *RUBY*. Esta planta alcanzó un máximo de 28.01 cm, siendo la planta con mayor crecimiento. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos por medición manual, la línea que une los puntos es una suavización automática realizada en el software *Microsoft Excel* para unir los puntos.

Figura no.18 Curva de crecimiento planta 5



En la figura se evaluó el crecimiento de la planta no.5, en esta resalta un salto de crecimiento en la semana 9 y 14 posterior a las inyecciones a las que fue sometida. Sin embargo, alrededor de la semana 19, posterior a la segunda inyección la planta entro en fase de muerte. Esta planta alcanzó un máximo de 14.95 cm. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos por medición manual, la línea que une los puntos es una suavización automática realizada en el software *Microsoft Excel* para unir los puntos.

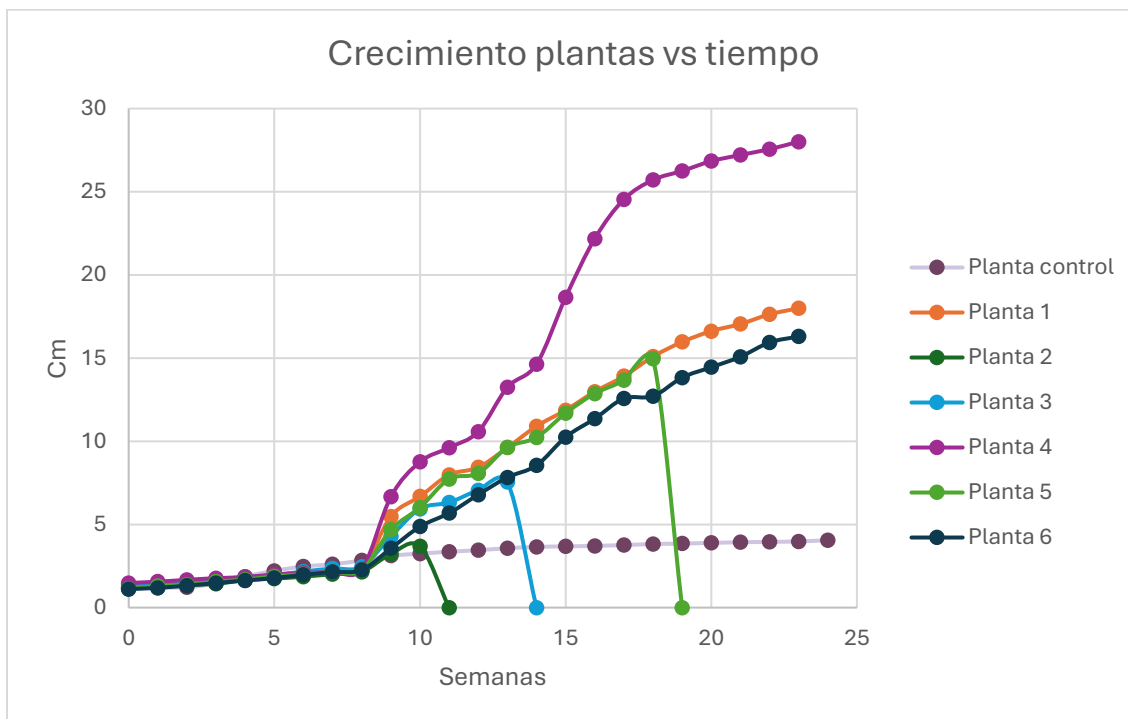
Figura no.19 Curva de crecimiento planta 6



En la figura se evaluó el crecimiento de la planta no.6, esta planta en particular presentó un crecimiento rápido con saltos de crecimiento poco notables en las semanas 9 y 15 posterior a las inyecciones que fue sometida. Esta planta alcanzó un máximo de 16.30 cm. Los puntos

representan los datos experimentales obtenidos por medición manual, la línea que une los puntos es una suavización automática realizada en el software *Microsoft Excel* para unir los puntos.

Figura no. 20 Curvas de crecimiento de las plantas inyectadas con *Agrobacterium* con plásmido *RUBY* comparadas con la curva de crecimiento de la planta control



En la figura se realizó la comparación de las curvas de crecimiento de la planta control y las plantas inyectadas con *Agrobacterium* que contiene plásmido *RUBY*. En esta resalta el crecimiento limitado constante que tuvo la planta control, mientras que las plantas modificadas presentan diferentes tasas de crecimiento resaltando la muerte de algunas plantas. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos por medición manual, la línea que une los puntos es una suavización automática realizada en el software *Microsoft Excel* para unir los puntos.

Cuadro no. 4 Rendimiento general y productividad media del crecimiento de las plantas de tabaco

	Planta control	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5	Planta 6
Rendimiento general (cm)	2.97	16.77	2.50	6.20	26.53	13.80	15.19
Productividad media (cm/semana)	0.13	0.73	0.11	0.27	1.15	0.60	0.66

El cuadro no.5 es un resumen el rendimiento total (crecimiento acumulado en cm) y la productividad media para cada planta al finalizar el experimento. Para las plantas 2,3 y 5 se tomó como base el tamaño máximo que alcanzaron antes de morir.

Cuadro no. 5 Tasa de crecimiento semanal planta control y plantas inyectadas con *Agrobacterium* con plásmido *RUBY*

Centímetros ± 0.071

Tasa de crecimiento							
Semana	Planta control	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5	Planta 6
0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1	1.67%	8.94%	8.47%	8.15%	5.41%	12.17%	7.21%
2	18.85%	5.22%	6.25%	8.22%	7.05%	6.98%	10.92%
3	28.28%	11.35%	5.15%	8.23%	5.99%	13.04%	12.12%
4	18.82%	8.28%	15.38%	7.02%	3.95%	8.33%	10.14%
5	11.76%	12.35%	5.45%	7.10%	8.15%	11.24%	9.20%
6	5.67%	7.33%	6.90%	10.71%	4.52%	6.91%	10.67%
7	8.43%	6.34%	8.06%	8.29%	3.37%	6.97%	8.63%
8	10.25%	5.50%	6.97%	4.68%	6.51%	5.12%	5.61%
9	3.85%	138.26%	50.23%	73.98%	190.83%	107.08%	57.52%
10	3.70%	21.90%	13.93%	38.79%	31.53%	28.63%	36.80%
11	2.68%	19.46%	-----	6.40%	9.70%	28.41%	16.63%
12	3.48%	5.64%	-----	11.71%	10.09%	4.40%	19.54%
13	2.24%	14.12%	-----	6.94%	25.14%	19.33%	15.32%
14	0.82%	13.31%	-----	-----	10.50%	6.23%	9.20%
15	0.82%	8.90%	-----	-----	27.48%	14.27%	19.88%
16	1.35%	9.35%	-----	-----	18.93%	10.09%	10.83%
17	1.60%	7.16%	-----	-----	10.64%	6.14%	10.65%
18	0.79%	8.48%	-----	-----	4.77%	9.44%	1.11%
19	1.04%	5.83%	-----	-----	2.10%	-----	8.81%
20	1.03%	4.07%	-----	-----	2.25%	-----	4.48%
21	0.51%	2.59%	-----	-----	1.38%	-----	4.36%
22	0.76%	3.40%	-----	-----	1.29%	-----	5.70%
23	1.76%	2.10%	-----	-----	1.63%	-----	2.26%

En el cuadro se puede observar la tasa de crecimiento (en porcentaje) semanal de todas las plantas. En el caso de las plantas 2,3 y 5 posterior a la muerte no fue posible sacar datos.

Cuadro no. 6 Análisis de varianza crecimiento de plantas en las 23 semanas de experimentación

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Semana	Entre grupos	640.567	6	106.761	2.573	0.022
	Dentro de grupos	5560.000	134	41.493		
	Total	6200.567	140			
Crecimiento	Entre grupos	1725.652	6	287.609	8.113	0.000
	Dentro de grupos	4750.508	134	35.452		
	Total	6476.160	140			

En el cuadro se muestran los resultados de un análisis de varianza (ANOVA) para dos factores: "Semana" y "Crecimiento", que miden las diferencias entre grupos a lo largo de semanas y entre plantas respectivamente. El análisis fue realizado con el software IBM *SPSS statistics*.

Cuadro no. 7 Análisis Scheffe crecimiento de plantas en las 23 semanas de experimentación

Comparaciones múltiples								
Variable dependiente		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%			
					Límite inferior	Límite superior		
Semana	0	1	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70	
		2	6.50	2.35	0.27	-1.96	14.96	
		3	4.50	2.12	0.61	-3.14	12.14	
		4	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70	
		5	2.50	1.98	0.95	-4.63	9.63	
		6	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70	
		0	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70	
		2	6.50	2.35	0.27	-1.96	14.96	
		3	4.50	2.12	0.61	-3.14	12.14	
		4	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70	
		5	2.50	1.98	0.95	-4.63	9.63	
		6	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70	
		0	-6.50	2.35	0.27	-14.96	1.96	
		1	-6.50	2.35	0.27	-14.96	1.96	
		3	-2.00	2.56	1.00	-11.22	7.22	
		4	-6.50	2.35	0.27	-14.96	1.96	
		5	-4.00	2.44	0.85	-12.80	4.80	
		6	-6.50	2.35	0.27	-14.96	1.96	
		0	-4.50	2.12	0.61	-12.14	3.14	
		1	-4.50	2.12	0.61	-12.14	3.14	
		2	2.00	2.56	1.00	-7.22	11.22	
		3	4	-4.50	2.12	0.61	-12.14	3.14
			5	-2.00	2.22	0.99	-10.02	6.02
			6	-4.50	2.12	0.61	-12.14	3.14
	0	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70		
	1	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70		
	2	6.50	2.35	0.27	-1.96	14.96		
	3	4.50	2.12	0.61	-3.14	12.14		
	5	2.50	1.98	0.95	-4.63	9.63		
	6	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70		
	0	-2.50	1.98	0.95	-9.63	4.63		
	1	-2.50	1.98	0.95	-9.63	4.63		
	2	4.00	2.44	0.85	-4.80	12.80		
	3	2.00	2.22	0.99	-6.02	10.02		
	4	-2.50	1.98	0.95	-9.63	4.63		

Variable dependiente		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
	6	-2.50	1.98	0.95	-9.63	4.63
	0	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70
	1	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70
	2	6.50	2.35	0.27	-1.96	14.96
	3	4.50	2.12	0.61	-3.14	12.14
	4	0.00	1.86	1.00	-6.70	6.70
	5	2.50	1.98	0.95	-4.63	9.63
Crecimiento	1	-5.38	1.72	0.14	-11.57	0.82
	2	1.16	2.17	1.00	-6.66	8.98
	3	-0.08	1.96	1.00	-7.15	6.98
	4	-9.68333*	1.72	0.00	-15.88	-3.49
	5	-2.93	1.83	0.86	-9.52	3.66
	6	-4.16	1.72	0.44	-10.36	2.04
	0	5.38	1.72	0.14	-0.82	11.57
	2	6.53	2.17	0.18	-1.28	14.35
	3	5.29	1.96	0.30	-1.77	12.36
	4	-4.31	1.72	0.40	-10.50	1.89
	5	2.45	1.83	0.94	-4.14	9.04
	6	1.22	1.72	1.00	-4.98	7.42
	0	-1.16	2.17	1.00	-8.98	6.66
	1	-6.53	2.17	0.18	-14.35	1.28
	3	-1.24	2.36	1.00	-9.76	7.28
	4	-10.84159*	2.17	0.00	-18.66	-3.02
	5	-4.09	2.26	0.77	-12.22	4.05
	6	-5.32	2.17	0.43	-13.13	2.50
	0	0.08	1.96	1.00	-6.98	7.15
	1	-5.29	1.96	0.30	-12.36	1.77
	2	1.24	2.36	1.00	-7.28	9.76
	4	-9.60117*	1.96	0.00	-16.67	-2.53
	5	-2.85	2.06	0.93	-10.26	4.57
	6	-4.08	1.96	0.63	-11.14	2.99
	0	9.68333*	1.72	0.00	3.49	15.88
	1	4.31	1.72	0.40	-1.89	10.50
	2	10.84159*	2.17	0.00	3.02	18.66
	3	9.60117*	1.96	0.00	2.53	16.67
	5	6.75513*	1.83	0.04	0.16	13.35
	6	5.53	1.72	0.12	-0.67	11.72
	0	2.93	1.83	0.86	-3.66	9.52
	1	-2.45	1.83	0.94	-9.04	4.14

Variable dependiente	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	
	2	4.09	2.26	0.77	-4.05	12.22
	3	2.85	2.06	0.93	-4.57	10.26
	4	-6.75513*	1.83	0.04	-13.35	-0.16
	6	-1.23	1.83	1.00	-7.82	5.36
	0	4.16	1.72	0.44	-2.04	10.36
	1	-1.22	1.72	1.00	-7.42	4.98
6	2	5.32	2.17	0.43	-2.50	13.13
	3	4.08	1.96	0.63	-2.99	11.14
	4	-5.53	1.72	0.12	-11.72	0.67
	5	1.23	1.83	1.00	-5.36	7.82

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

El cuadro presenta el análisis de Scheffe como prueba post-hoc utilizada después de realizar el ANOVA para hacer comparaciones múltiples entre diferentes plantas respecto a las semanas y al crecimiento.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El propósito principal de la investigación fue evaluar la modificación genética de una planta utilizando *Agrobacterium* con el plásmido RUBY para la inducción de cambio de color en el follaje de esta y comparar su modelo de crecimiento con planta no modificada.

Para poder llevar a cabo la experimentación se inició con el planteamiento de las condiciones necesarias para el crecimiento de las plantas de tabaco. Como se puede observar en la figura no.8 se realizó un esquema para visualizar todos los factores necesarios a tomar en cuenta durante la experimentación para garantizar el ambiente adecuado de las plantas y que estas no tuvieran ninguna barrera en el crecimiento asociada a factores controlables. A partir de este esquema se determinó que se debía controlar la luz solar, la temperatura y humedad en la tierra, para esto se hizo uso de un domo el cual nos permitiera recrear las características necesarias para el crecimiento de las plantas.

A raíz de las condiciones necesarias para las plantas surge la decisión de utilizar un número limitado de plantas responde a la optimización de recursos experimentales. Al trabajar con un grupo más pequeño, se logró un manejo más eficiente de las condiciones de cultivo y tratamiento, manteniendo un seguimiento más cercano del crecimiento y las reacciones de cada planta a lo largo del experimento. Esto es consistente con los estudios previos mencionados en el marco teórico en los que la reducción de la muestra se ha compensado con una rigurosa homogeneización de las condiciones experimentales. La relevancia de los resultados obtenidos se apoya en la capacidad de estos diseños de detectar efectos significativos en las plantas modificadas, a pesar de contar con un número limitado de individuos. Esta aproximación permite obtener datos confiables y útiles para futuras investigaciones a mayor escala, sin comprometer la integridad del experimento

Como se puede observar en la figura no.9 se utilizó un kit de la marca Super Sprouter, el cual proporciona los objetos necesarios para tener condiciones de calor y luz reguladas. Debido a que las plantas de tabaco necesitan una temperatura de 28°C y que en las fechas en las cuales la experimentación se inició se tenían temperaturas máximas de 18-20°C se hizo uso del tapete generador de calor para aumentar la temperatura en el interior del domo para poder obtener un rango de 26-28 °C.

Debido a que el domo se encontraba dentro de un laboratorio se utilizó la lámpara fluorescente T5 del kit para poder proporcionar ciclos de luz como si las plantas se encontraran en el exterior recibiendo luz de sol; estos fueron controlados a través de un temporizador analógico de electricidad que permitió establecer el tiempo que la luz y el tapete se mantenían encendidos en un ciclo de 9:00 a 17:00 horas brindándole un ciclo completo de día a las plantas como si estas estuviesen en la intemperie.

Cuando las plantas alcanzaron un tamaño aproximado de 3.00 cm fue necesario trasladarlas del laboratorio al soporte de metal (Figura 13) ya que el espacio en el domo no era suficiente para todas las plantas. Este espacio brindó a las plantas la luz solar necesaria durante el día y viento que las ayudaba a resistir a las altas temperaturas que se tenían alrededor de los meses de marzo a mayo. En este espacio, las plantas tenían la temperatura y ciclos de luz necesarios para su crecimiento, por lo que únicamente se estuvo monitoreando la humedad durante el resto de la experimentación al ser la única condición variable.

Durante toda la experimentación el nivel de humedad en la tierra se estuvo monitoreando para que permaneciera en un rango de 5-8, ya que este garantizaba que la tierra tuviese un porcentaje de humedad medio alto para evitar que las raíces se pudrieran, pero sin intervenir en las necesidades de humedad para el crecimiento de las plantas. La humedad del suelo fue medida en base húmeda utilizando un medidor de suelo de tres vías (Figura no.10). Las lecturas obtenidas reflejan la proporción de agua contenida en el suelo en su estado natural, sin procesos de secado previo. Este enfoque fue seleccionado para capturar condiciones realistas del entorno en el que crecieron las plantas. Las mediciones de humedad reportadas en este estudio se basan en lecturas obtenidas directamente del suelo en su estado húmedo, sin tratamientos adicionales de secado. Esto asegura que los datos reflejan las condiciones experimentales reales y facilitan la interpretación de los efectos de la humedad en el crecimiento de las plantas de tabaco. El medidor también fue utilizado para realizar mediciones de pH del suelo, del cual no se obtuvieron variaciones, al mismo tiempo que diariamente nos permitía saber si las plantas necesitaban agua o no.

Durante la semana no. 8 las plantas se sometieron a la primera inyección con *Agrobacterium* con plásmido *RUBY*. Para cada planta se inyectaron dos hojas de la parte inferior de la planta. Como se puede observar en el Cuadro no.2, se inyectaron seis plantas

en total, de las cuales ninguna presentó la modificación genética esperada, esto lo podemos asociar a que la eficiencia de la infección de *Agrobacterium* y la integración del plásmido RUBY puede variar entre diferentes especies y variedades de plantas. Huang et al. (2021) mencionaron que las plantas de tabaco son utilizadas comúnmente por su facilidad para las modificaciones genéticas, sin embargo, algunas especies en particular presentan mayor porcentaje de aceptación de ADN para modificaciones genéticas, por lo que al utilizar *Nicotiana rustica* como planta de tabaco experimental puede no haber sido la mejor especie para la técnica de modificación genética utilizada.

Para poder realizar las inyecciones con *Agrobacterium* modificado este se sembró previamente en placas de agar LB RIF/SPEC, el cual, como indica su nombre, tiene *rifampicina* y *espectinomycin*, dos antibióticos que nos permiten asegurar que el microorganismo que crece en el agar conserva el plásmido con los genes de interés intacto. En consecuencia, se descarta por completo la posibilidad que durante las inyecciones el *Agrobacterium* ya no contara con el plásmido RUBY para la modificación genética.

A raíz de esto, es importante considerar el proceso de transformación al que la planta fue sometida, ya que podría no haber sido lo suficientemente efectivo para introducir el ADN. Comúnmente, se utilizan métodos más específicos, en los que se emplean directamente las células vegetales de la planta que se desea modificar. Estas células son transformadas mediante *Agrobacterium*, el cual ya contiene el plásmido con los genes de interés. Otro método utilizado es el exponer las hojas de la planta de forma directa durante un periodo de tiempo prolongado a un medio líquido que contiene las células de *Agrobacterium*. El método utilizado es poco invasivo y no tan directo como los descritos anteriormente, por lo que el porcentaje de modificación exitosa se reduce considerablemente.

Las plantas fueron sometidas a una segunda inyección; como se puede observar en el Cuadro no.3, cuatro plantas fueron evaluadas en esta segunda prueba y únicamente la planta no.4 presentó una modificación genética en dos de las cuatro hojas inyectadas. Esto respalda la idea de que la técnica empleada no es la adecuada para las plantas que se utilizan ya que únicamente se logró transformar una planta.

De forma externa a la investigación con plantas de tabaco se llevó a cabo la experimentación con *Hydrangea*, comúnmente conocidas como hortensias. Esta planta

presentaba las mismas características generales en sus hojas, como el color verde y el grosor de estas. A diferencia de las plantas de tabaco las hojas de hortensias inyectadas presentaron una modificación genética exitosa dos días después de la inyección, pigmentando de color morado las hojas inyectadas (ver figuras no. 27 y 28 en anexos), sin embargo, esta planta presentó una muerte celular programada mucho más drástica que las plantas de tabaco, ya que en cuestión de 24 horas la planta expulsó por completo las hojas modificadas y de igual forma que en las plantas de tabaco la hortensia quedó con cicatrices en el tallo, de las cuales ya no brotaron hojas nuevas. Con esta experimentación se afianzó la idea de una resistencia a la modificación por medio de mecanismos de defensa en las plantas.

Durante la semana 15, la planta no. 4 comenzó a mostrar signos de resistencia a la modificación genética. Como se observa en el Cuadro no. 3, la hoja número 3 empezó a secarse desde el punto de inyección pasados los 7 días de la inyección, y dos semanas después, se secó por completo y fue descartada por la planta. La hoja no. 2 presentó síntomas similares dos semanas después de la inyección, secándose completamente en la semana 18. Estos síntomas sugieren que la resistencia de las plantas podría estar relacionada con mecanismos de defensa, como la reacción de hipersensibilidad o la inmunidad innata (PTI o ETI), lo que limita la infección de *Agrobacterium* y, por ende, impide la modificación genética. Este mecanismo de muerte en las hojas inyectadas se observó en todas las plantas que no lograron modificarse, por lo que podemos concluir que los mecanismos de defensa están asociados a la modificación genética fallida en todas las plantas.

El crecimiento de las plantas se evaluó con el objetivo de comparar las plantas modificadas con la planta control. En la planta control se obtuvo un crecimiento gradual y constante, iniciando con un tamaño de 1.2 cm hasta 3.68 en la semana 14 con una productividad general de 2.97 cm. Esto representa un aumento moderado pero típico en plantas sin modificaciones genéticas, ya que sigue un patrón de desarrollo predecible y controlado. A partir de la semana 15, cuando la planta control alcanza una altura de 3.71 cm, hasta la semana 23, donde obtuvo una altura de 4.05 cm, el aumento del tamaño del tallo se da de forma bastante reducida, con un crecimiento mínimo de 0.37 cm en 9 semanas. Esto nos indica que la planta control alcanzó una fase de crecimiento estabilizado, cercana a su capacidad de crecimiento máxima antes de la etapa de maduración previa a la floración.

Para las plantas sometidas a inyección con *Agrobacterium* se realizó una primera evaluación importante de crecimiento entre las semanas 1-14, antes de la segunda inyección con *Agrobacterium*.

Como se puede observar en la Figura no. 15, la planta no.1 inició con una altura de 2.30 cm. A partir de la semana 9, posterior a la primera inyección, esta presentó un crecimiento drástico pasando a 5.48 cm, la tasa de crecimiento se elevó de 5.50% a 138.26%, alcanzando 10.90 cm en la semana 14. Posterior a ser inyectada la planta logró identificar la presencia de la bacteria y como respuesta para combatir la filtración del *Agrobacterium* en su interior la planta obtuvo un crecimiento acelerado. Las dos hojas que fueron inyectadas comenzaron a secarse posterior a la semana 9 hasta que finalmente murieron. El resto de las hojas no presentaron ningún cambio. Comenzaron a brotar hojas nuevas en la parte superior de la planta, pero al nivel de las dos hojas que se inyectaron no se obtuvo nuevo crecimiento, dejando pequeñas cicatrices en el tallo en la parte donde se perdieron las hojas. A partir de la semana 15, posterior a la segunda inyección la tasa de crecimiento de la planta vuelve a acelerarse significativamente, volviendo a botar nuevamente las hojas inyectadas y continuando con su crecimiento vertical con nuevas hojas en la parte superior.

Similar a la planta no.1 la planta no. 4 experimentó un crecimiento drástico posterior a la primera inyección, este se puede observar en la Figura no.17, pasando de 1.48 cm a 6.66 cm en la semana 9 con una tasa de crecimiento del 190.83%, el patrón de crecimiento se acelera nuevamente posterior a la segunda modificación con una tasa de crecimiento de 27.48%, pasando de los 14.63 cm de la semana 14 a 28.01 cm en la semana 23 de experimentación. Como se mencionó anteriormente en esta planta se presentó la modificación genética con éxito en 2 de las 4 hojas inyectadas en la segunda ronda, sin embargo, las hojas que no se modificaron terminaron por secarse antes de caerse, provocando cicatrices en el tallo impidiendo la generación de nuevas hojas en la parte inferior de la planta. Alrededor de la semana 19 las dos hojas modificadas comenzaron a cambiar de coloración a un amarillo pálido, 2 semanas después ambas hojas se secaron y murieron, dejando nuevamente heridas en el tallo.

En la Figura no.19 se puede observar el crecimiento de la planta no.6, esta presentó un crecimiento constante partiendo de 1.1 cm hasta los 8.55 cm en la semana 14. Como se

puede observar en Cuadro no.6 la planta no presentó una tasa de crecimiento tan abrupta como en el caso de las plantas 1 y 4, pues esta fue de 57.52%, sin embargo, esta sigue superando de forma significativa el crecimiento de la planta control. A partir de la semana 15 la planta sigue con el patrón de crecimiento sostenido, alcanzando en la semana 23 un tamaño de 16.30 cm. El crecimiento sigue siendo estable con ligeras variaciones en la tasa de crecimiento semanal, sin embargo, cabe resaltar que en esta planta de las 6 hojas inyectadas 4 no murieron, estas presentaron un ligero cambio en la coloración verde a uno amarillento, pero al pasar alrededor de 3 semanas las hojas volvieron a recuperar su coloración verde habitual.

En las plantas 1,4 y 6 se muestran signos de estrés que aceleraron el crecimiento de la planta, pues como se puede observar en la Figura 20, estas 3 plantas fueron las que mayor crecimiento tuvieron entre todas las plantas; el factor en común que poseen es la muerte de las hojas inyectadas y la inhabilitación del crecimiento de nuevas hojas cercanas al área donde se encontraban anteriormente las hojas que murieron. La muerte de las hojas se relaciona al mecanismo de inmunidad innata de la planta, en específico la inmunidad activada por PAMP (PTI), ya que esta tiene la capacidad de reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) de *Agrobacterium*, a partir de los cuales la planta fue capaz de activar una cascada de señalización generando una muerte celular programada para evitar el paso de los agentes patógeno al resto de la planta, dejando inhabilitado el crecimiento de nuevas células en el área por el paso cerrado de manera definitiva. Esto se puede observar en las cicatrices o callosidades que se generaron en el tallo, áreas en las cuales ninguna de las plantas volvió a presentar crecimiento de hojas nuevas, obligando a la planta a crecer de forma vertical para continuar con la producción del follaje.

Las plantas 2,3 y 5 presentan casos de crecimiento similares con el mismo desenlace. Como se puede observar en la figura no. 15 la planta no.2 presentó un crecimiento muy similar al de la planta control, sin embargo, en la semana 9 posterior a la primera inyección tuvo un aumento en la tasa de crecimiento del 50.23% alcanzando una altura de 3.23 cm, sin embargo, alrededor de la semana 11 la planta comenzó a secarse en cuestión de 2 días, muriendo por completo en el día 3 posterior a presentar los primeros indicios de decaimiento.

En el caso de la planta no.3, como se puede observar en la Figura no.16, posee un patrón de crecimiento más sostenido en comparación a la planta control, alcanzando una altura de 4.28 cm en la semana 9 aumentando significativamente su tasa de crecimiento a 73.98% llegando a una altura de 7.55 cm en la semana 13, sin embargo el crecimiento se frenó de forma abrupta con la aparición de signos de decaimiento en la planta, presentando el mismo comportamiento que la planta no.2 secándose por completo en un par de días y muriendo durante la semana 14.

En la Figura no. 18 podemos observar el crecimiento de la planta 5, esta presentó un comportamiento intermedio, pues tuvo un crecimiento rápido, pero no tan drástico como el de las plantas 1 y 4. Presentó una tasa de crecimiento de 107.08% en la semana 9, sin embargo después de ser expuesta a una segunda inyección la planta comenzó a presentar síntomas de decaimiento hasta morir completamente en la semana 19.

Las hojas inyectadas de las plantas 2,3 y 5 se secaron alrededor de dos semanas después inyectarlas, lo cual generó los picos de crecimiento, esto nos indica que las plantas detectaron el agente patógeno que se les fue administrado, sin embargo no tuvieron la capacidad para detener el paso y reproducción del *Agrobacterium* en su interior, orillando a una muerte rápida a la planta por el estrés recibido y la invasión a la que fue sometida que no pudo ser reducida en las hojas expuestas dejando que la bacteria ingresara a toda la planta matándola.

Aunque el objetivo de la modificación genética no era alterar el crecimiento, las plantas inyectadas con el plásmido RUBY mostraron una amplia variabilidad en su desarrollo, desde un crecimiento superior al control (plantas 1 y 4) hasta un crecimiento medio acelerado (planta 6). Esto sugiere que el impacto de la modificación genética no es uniforme y puede depender de factores individuales.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) el cual indica diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de las plantas tanto a lo largo de las semanas como entre las diferentes plantas analizadas. El efecto del tiempo (semanas) sobre el crecimiento muestra un valor F de 2.573 y un p-valor de 0.022, reforzando la conclusión que el crecimiento de las plantas varía significativamente a lo largo del tiempo, asociado a las inyecciones de *Agrobacterium* con el plásmido RUBY.

Por otro lado, la variabilidad significativa en el crecimiento entre las diferentes plantas ($F = 8.113$, $p < .001$) podría atribuirse a diferencias de adaptabilidad entre las plantas, la cantidad retenida de medio con *Agrobacterium* o condiciones ambientales localizadas. Este resultado subraya la importancia de considerar la variabilidad individual en estudios de crecimiento vegetal, lo que podría ser crucial para futuras investigaciones en mejora genética.

Estos hallazgos refuerzan la necesidad de explorar más a fondo las condiciones específicas y tratamientos aplicados a cada planta durante el período de estudio, así como de considerar la diversidad genética en futuros experimentos para comprender mejor las dinámicas de crecimiento en contextos controlados y naturales.

La prueba post-hoc de Scheffe fue aplicada para comparar los diferentes tratamientos de las plantas inyectadas con *Agrobacterium* con plásmido RUBY, en comparación a la planta control, con el objetivo de evaluar las diferencias en las tasas de crecimiento observadas a lo largo del tiempo. Esta prueba fue realizada en un nivel de significancia alfa de 0.05, lo que nos permite determinar cuáles grupos de plantas tienen medias de crecimiento estadísticamente similares entre sí dentro de los mismos subconjuntos y cuáles difieren significativamente entre diferentes subconjuntos.

Las plantas se agruparon en dos subconjuntos principales. El primer subconjunto incluye las plantas 2, 0, 3, 5, 6 y 1, con medias de crecimiento que varían desde 1.96 hasta 8.50, indicando que estas variaciones no son estadísticamente significativas dentro de este grupo. El segundo subconjunto comprende las plantas 3, 5, 6, 1 y 4, con medias que van de 6.05 a 12.80, sugiriendo que estas plantas comparten características de crecimiento superior en comparación con las del primer subconjunto.

Dado que los tamaños de muestra varían entre las plantas, se ha utilizado la media armónica de 18.574 para ajustar el análisis. Esta variación en los tamaños de muestra puede influir en la precisión de las estimaciones de las medias y afectar la comparabilidad de los resultados entre los grupos. Además, los valores de significancia de .091 y .071 para los subconjuntos indican que las diferencias entre los subconjuntos son marginalmente significativas, mostrando una tendencia de diferenciación en el crecimiento entre los grupos pero sin alcanzar un nivel de confianza tradicionalmente aceptado ($p < .05$).

Este análisis destaca la variabilidad en el crecimiento entre las plantas estudiadas, especialmente la Planta 4, que muestra un crecimiento significativamente más alto comparado con otras plantas. Esto podría sugerir una mayor eficacia en la modificación genética o una mejor adaptabilidad a las condiciones experimentales. La cercanía de los valores de significancia al límite convencional de .05 sugiere que se requiere un análisis más detenido o un diseño experimental ajustado para realizar comparaciones más robustas, subrayando la importancia de considerar tanto la variabilidad biológica como las limitaciones metodológicas al interpretar experimentos de modificación genética.

IX. CONCLUSIONES

- Se recreó un ambiente controlado adecuado para el crecimiento de las plantas de tabaco, con luz, humedad y temperatura manteniendo un rango de temperatura entre 26°C y 28°C, una humedad relativa del 60% al 70%, y una exposición a la luz de 8 horas diarias. Estas condiciones permitieron un crecimiento sostenido y saludable en la planta control y en la mayoría de las plantas modificadas durante el tiempo de evaluación.
- La modificación genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido RUBY no fue completamente exitosa en todas las plantas de tabaco experimentales. Como se puede observar en el cuadro no. 3 una de las seis plantas mostró modificaciones en dos hojas, lo que sugiere que la técnica utilizada no fue suficientemente efectiva para la especie de tabaco *Nicotiana rustica*. Este resultado indica la necesidad de ajustar el método de transformación o considerar especies de tabaco más adecuadas para este tipo de modificaciones genéticas.
- Las plantas sometidas a la inyección de *Agrobacterium* mostraron un crecimiento acelerado, con una gran variabilidad en las tasas de crecimiento de hasta el 190.83% (planta 4) inducida por la inyección. Sin embargo, este crecimiento estuvo acompañado por la muerte celular programada de las hojas inyectadas, lo que indica que las plantas activaron mecanismos de defensa como la inmunidad innata (PTI), reconociendo a *Agrobacterium* como un patógeno.
- Se observó un patrón de resistencia en las plantas a la modificación genética, lo cual está relacionado con la activación de mecanismos de defensa como la reacción de hipersensibilidad o la inmunidad innata. Estos mecanismos limitaron la capacidad de *Agrobacterium* para infectar exitosamente las plantas, lo que resultó en la muerte de hojas y como se puede observar en la figura 29 la formación de cicatrices en el tallo que impidieron el crecimiento de nuevas hojas.
- En comparación con las plantas no modificadas, las plantas sometidas a inyecciones mostraron un crecimiento más acelerado, pero menos estable, con un rendimiento general para la planta 1 de 16.77 cm, para la planta 4 de 26.53 cm y para la planta 6 de 15.19 cm. La planta control siguió un patrón de crecimiento más predecible y estable, con un rendimiento general de 2.97 cm.

X. RECOMENDACIONES

- Optimizar el protocolo de transformación genética mediante la selección de especies más susceptibles a la modificación genética con *Agrobacterium* o el uso de métodos alternativos, como la biobalística o la exposición al medio de transformación
- Es importante desarrollar estrategias para mitigar el estrés fisiológico en las plantas durante el proceso de transformación genética. Esto podría incluir la implementación de técnicas que reduzcan la activación de los mecanismos de defensa de las plantas, como el uso de agentes químicos que inhiban la respuesta de hipersensibilidad.
- Evaluar otros métodos de modificación genética, como la transformación directa de células vegetales o la infiltración prolongada en medios líquidos con *Agrobacterium*, para aumentar la tasa de éxito de la transformación genética en las plantas experimentales.
- Evaluar con análisis vectorial la relación del estrés generado como posible efecto secundario de la exposición a *Agrobacterium* de forma directa en plantas para determinar si este método realmente representa una ventaja a nivel industrial.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Arias, L. Y. G., Daza, S. G., & Zarrantes, V. N. (2004). Generación de un banco de constructos génicos. *Ciencia En Desarrollo*.
<https://doi.org/10.19053/01217488.v9.n2.2018.3861>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). *CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes*. *Science*, *315*(5819), 1709-1712.
<https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Bayer. (2022, April 12). Qué es la tecnología *Crispr*. Bayer.
<https://www.bayer.com/es/es/blog/espana-que-es-la-tecnologia-crispr>
- Bisang, R., Campi, M., & Cesa, V. (2017). Biotecnología y desarrollo. En *Comisión Económica Para América Latina y el Caribe (CEPAL)*.
https://www.cepal.org/sites/default/files/publication/files/3650/S2009064_es.pdf
- Brookes, G. (2022). *Farm income and production impacts from the use of genetically modified (GM) crop technology 1996-2020*. *GM Crops & Food*, *13*(1), 171-195.
<https://doi.org/10.1080/21645698.2022.2105626>
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). *Making and Using Transgenic Organisms*. En *Elsevier eBooks* (pp. 253-271). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800511-8.00012-5>
- Claveria, E., & Ramon, J. (2012). Traducción comentada de “*Genetically Modified Organisms (GMOs): Transgenic Crops and Recombinant DNA Technology*”. En *RECERCAT (Dipòsit de la Recerca de Catalunya)*.
https://repositori.upf.edu/bitstream/10230/20301/1/TFG_Espinet%20Josep%20R.pdf

- Coll, J. B., Rodrigo, G. N., García, B. S., & Tamés, R. S. (2019). *Fisiología vegetal*. Comercial Grupo ANAYA, S.A.
- De Miguel Beriaín, Í., & Armaza, E. J. A. (2017). Un análisis ético de las nuevas tecnologías de edición genética: el CRISPR-Cas9 a debate. *Anales De La Cátedra Francisco Suárez*, 52, 179–200. <https://doi.org/10.30827/acfs.v52i0.6555>
- EPPO Global Database. (2019). *Agrobacterium tumefaciens (AGRBTU)[Overview]*. <https://gd.eppo.int/taxon/AGRBTU>
- Farthing, E. (2019). *What is genetic engineering?* <https://www.yourgenome.org/theme/what-is-genetic-engineering/#:~:text=Genetic%20engineering%20refers%20to%20the,a%20whole%20region%20of%20DNA.>
- GAN-NIK. (2021). *Fichas de plagas y enfermedades AGROBACTERIUM TUMEFACIENS, (Smith & Townsend, 1907) Conn, 1942.*
- Garrigues, F. (2023, 6 noviembre). *CRISPR: ¿Qué es y cómo funciona?* Genotipia. <https://genotipia.com/crispr-cas/>
- Genth, H., & Just, I. (2015). *Large clostridial glycosylating toxins modifying small GTPases*. In Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800188-2.00016-1>
- He, Y., Zhang, T., Sun, H., Zhan, H., & Zhao, Y. (2020). A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. *Horticulture Research*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00390-1>
- Huang, T., Armstrong, B., Schindele, P., & Puchta, H. (2021). Efficient gene targeting in *Nicotiana tabacum* using CRISPR/SaCas9 and temperature tolerant LbCas12a. *Plant Biotechnology Journal*, 19(7), 1314-1324. <https://doi.org/10.1111/pbi.13546>

- Hussain, B., Lucas, S. J., & Budak, H. (2018). CRISPR/Cas9 in plants: at play in the genome and at work for crop improvement. *Briefings in Functional Genomics*.
<https://doi.org/10.1093/bfpg/ely016>
- Lanas, F., & Serón, P. (2017). Rol del tabaquismo en el riesgo cardiovascular global. *Revista Médica Clínica las Condes*, 23(6), 699-705. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(12\)70371-1](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70371-1)
- Li, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., & Wei, J. (2017). *Application of CRISPR/Cas9 in plant biology*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(3), 292–302.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.01.002>
- Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS Journal*, 281(23), 5186-5193. <https://doi.org/10.1111/febs.13110>
- Ministerio de Agricultura, ganadería y Alimentación [MAGA]. (2022). *Informe de daños ocasionados por las depresiones tropicales ETA e IOTA y análisis de las principales variaciones de precios en mercados mayoristas*.
<https://precios.maga.gob.gt/archivos/resumenfinal-etaiota.pdf>
- Molecular Devices. (2018). *Edición génica (CRISPR/Cas9)*.
<https://es.moleculardevices.com/applications/gene-editing-with-crispr-engineering#:~:text=Los%20sistemas%20CRISPR%2DCas9%20tienen,cadena%20en%20el%20sitio%20objetivo>.
- Morimoto, Y. (2023, 10 octubre). *Part:BBa K4729703 - parts.igem.org*.
https://parts.igem.org/Part:BBa_K4729703
- National Human Genome Research Institute. (2024). *ADN recombinante (rADN)*.
Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-recombinante>

- NIH. (2019). Diccionario de cáncer del NCI. Cancer.gov.
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/crispr-cas9>
- NIH. (2022). *GMO (organismo modificado genéticamente)*. Genome.gov.
[https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Genetically-Modified-Organism#:~:text=Un%20GMO%20\(1a%20abreviatura%20de,alterar%20las%20caracter%20del%20organismo.](https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Genetically-Modified-Organism#:~:text=Un%20GMO%20(1a%20abreviatura%20de,alterar%20las%20caracter%20del%20organismo.)
- Pugnaire, F., & Valladares, F. (2017). Ecological significance of inherent variation in relative growth rate and its components. CRC Press.
- Roda, A., Pasini, P., Mirasoli, M., Michelini, E., & Guardigli, M. (2014). Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends In Biotechnology*, 22(6), 295-303. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.03.011>
- Rollwage, L., Maiß, E., Menzel, W., Hossain, R., & Varrelmann, M. (2023). Beet mosaic virus expression of a betalain transcription factor allows visual virus tracking in *Beta vulgaris*. *Molecular Plant Pathology*, 24(10), 1319–1329.
<https://doi.org/10.1111/mpp.13372>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2016). *Tabaco*.
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/832805/tabaco.pdf>
- Sunnadeniya, R., Bean, A., Brown, M. L., Akhavan, N., Hatlestad, G. J., González, A. L., Symonds, V. V., & Lloyd, A. C. (2016). *Tyrosine Hydroxylation in Betalain Pigment Biosynthesis Is Performed by Cytochrome P450 Enzymes in Beets (Beta vulgaris)*. *PLOS ONE*, 11(2), e0149417.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149417>

- Tabara, M., Matsumoto, A., Kibayashi, Y., Takeda, A., & Motomura, K. (2024). Straightforward and affordable agroinfiltration with RUBY accelerates RNA silencing research. *Plant Molecular Biology*, 114(3).
<https://doi.org/10.1007/s11103-024-01463-8>
- Thole, V., Worland, B., Snape, J. W., & Vain, P. (2007). The pCLEAN Dual Binary Vector System for Agrobacterium-Mediated Plant Transformation. *Plant Physiology*, 145(4), 1211–1219. <https://doi.org/10.1104/pp.107.108563>
- Timoneda, A., Yunusov, T. S., Quan, C., Gavrin, A., Brockington, S. F., & Schornack, S. (2021). MycoRed: Betalain pigments enable in vivo real-time visualisation of arbuscular mycorrhizal colonisation. *PLOS Biology*, 19(7), e3001326.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001326>

XII. ANEXOS

A. BALANCE DE MASA Y ENERGÍA

Cálculo no.1 Balance de masa planta no.4

$$\begin{aligned}M_{entrada} &= M_{salida} \\M_{planta\ inicial} + M_{tierra} + M_{medio\ de\ inyección} + M_{agua} \\&= M_{final\ planta} + M_{pérdidas} + M_{tierra} + M_{agua\ retenida} + M_{agua\ perdida} \\0.0005\ kg\ planta\ de\ tabaco + 1\ kg\ tierra + 0.004\ kg\ de\ medio + 9\ kg\ de\ agua \\&= 0.1377\ kg\ de\ planta + 1\ kg\ tierra + 0.9\ kg\ agua\ retenida \\&+ 8.1\ kg\ agua\ perdida\end{aligned}$$

El balance utiliza una suposición del peso de 0.5 g/cm debido a que por la naturaleza de la experimentación la planta no podía ser pesada en solitaria, además de ciertas pérdidas de masa que no pudieron ser medidas ni tomadas en cuenta con ningún tipo de estimación. El balance de masa presentado es de la planta no.4 ya que esta fue la que tuvo mayor crecimiento durante la experimentación.

Cálculo no.2 balance de energía

$$\begin{aligned}E_{total} &= E_{luz\ artificial} + E_{tapete} + E_{solar} \\E_{total} &= 1.44\ MJ + 9.504\ MJ + 1.296\ MJ = 12.24\ MJ\end{aligned}$$

B. DATOS ORIGINALES

Cuadro no.6 Crecimiento de la planta control evaluado semanalmente

Centímetros \pm 0.005

Semana	Tamaño Tallo cm
0	1.2
1	1.22
2	1.45
3	1.86
4	2.21
5	2.47
6	2.61
7	2.83
8	3.12
9	3.24
10	3.36
11	3.45
12	3.57
13	3.65
14	3.68
15	3.71
16	3.76
17	3.82
18	3.85
19	3.89
20	3.93
21	3.95
22	3.98
23	4.05
24	4.13
25	4.17

Cuadro no.7 Crecimiento de las plantas inyectadas evaluado semanalmente

Centímetros \pm 0.005

Semana	Planta control Tamaño Tallo cm	Planta 1 Tamaño Tallo cm	Planta 2 Tamaño Tallo cm	Planta 3 Tamaño Tallo cm	Planta 4 Tamaño Tallo cm	Planta 5 Tamaño Tallo cm	Planta 6 Tamaño Tallo cm
0	1.20	1.23	1.18	1.35	1.48	1.15	1.11
1	1.22	1.34	1.28	1.46	1.56	1.29	1.19
2	1.45	1.41	1.36	1.58	1.67	1.38	1.32
3	1.86	1.57	1.43	1.71	1.77	1.56	1.48
4	2.21	1.70	1.65	1.83	1.84	1.69	1.63
5	2.47	1.91	1.74	1.96	1.99	1.88	1.78
6	2.61	2.05	1.86	2.17	2.08	2.01	1.97
7	2.83	2.18	2.01	2.35	2.15	2.15	2.14
8	3.12	2.30	2.15	2.46	2.29	2.26	2.26
9	3.24	5.48	3.23	4.28	6.66	4.68	3.56
10	3.36	6.68	3.68	5.94	8.76	6.02	4.87
11	3.45	7.98	-----	6.32	9.61	7.73	5.68
12	3.57	8.43	-----	7.06	10.58	8.07	6.79
13	3.65	9.62	-----	7.55	13.24	9.63	7.83
14	3.68	10.90	-----	-----	14.63	10.23	8.55
15	3.71	11.87	-----	-----	18.65	11.69	10.25
16	3.76	12.98	-----	-----	22.18	12.87	11.36
17	3.82	13.91	-----	-----	24.54	13.66	12.57
18	3.85	15.09	-----	-----	25.71	14.95	12.71
19	3.89	15.97	-----	-----	26.25	0.00	13.83
20	3.93	16.62	-----	-----	26.84	-----	14.45
21	3.95	17.05	-----	-----	27.21	-----	15.08
22	3.98	17.63	-----	-----	27.56	-----	15.94
23	4.05	18.00	-----	-----	28.01	-----	16.30

Cuadro no. 8 Productividad semanal del crecimiento de las plantas utilizadas en la experimentación

Centímetros \pm 0.071

Productividad (cm/semana)							
Semana	Planta control	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5	Planta 6
0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1	0.11	0.1	1.28	0.11	0.08	0.14	0.08
2	0.07	0.08	1.36	0.12	0.11	0.09	0.13
3	0.16	0.07	1.43	0.13	0.1	0.18	0.16
4	0.13	0.22	1.65	0.12	0.07	0.13	0.15
5	0.21	0.09	1.74	0.13	0.15	0.19	0.15
6	0.14	0.12	1.86	0.21	0.09	0.13	0.19
7	0.13	0.15	2.01	0.18	0.07	0.14	0.17
8	0.12	0.14	2.15	0.11	0.14	0.11	0.12
9	3.18	1.08	3.23	1.82	4.37	2.42	1.30
10	1.2	0.45	3.68	1.66	2.1	1.34	1.31
11	1.3	-----	-----	0.38	0.85	1.71	0.81
12	0.45	-----	-----	0.74	0.97	0.34	1.11
13	1.19	-----	-----	0.49	2.66	1.56	1.04
14	1.28	-----	-----	-----	1.39	0.6	0.72
15	0.97	-----	-----	-----	4.02	1.46	1.70
16	1.11	-----	-----	-----	3.53	1.18	1.11
17	0.93	-----	-----	-----	2.36	0.79	1.21
18	1.18	-----	-----	-----	1.17	1.29	0.14
19	0.88	-----	-----	-----	0.54	-----	1.12
20	0.65	-----	-----	-----	0.59	-----	0.62
21	0.43	-----	-----	-----	0.37	-----	0.63
22	0.58	-----	-----	-----	0.35	-----	0.86
23	0.37	-----	-----	-----	0.45	-----	0.36

C. CÁLCULOS DE MUESTRA

Cálculo no.3 Tasa de crecimiento

$$\frac{\text{Valor final} - \text{valor inicial}}{\text{valor inicial}} = \frac{1.34 - 1.23}{1.23} * 100\% = 8.94\%$$

Este cálculo fue utilizado para calcular la tasa de crecimiento de forma semanal para las plantas para poder determinar de forma directa el desarrollo de la planta utilizada en la experimentación utilizando la ecuación no.1 del marco teórico.

Cálculo no.4 Rendimiento general

$$\text{Crecimiento}_{final} - \text{Crecimiento}_{inicial} = 18 - 1.23 \text{ cm} = 16.77 \text{ cm}$$

Empleando la ecuación no. 2 se encontró la diferencia entre el tamaño final y el tamaño inicial de todas las plantas y poder utilizarlo para calcular la productividad media del crecimiento de las plantas

Cálculo no.3 Productividad media

$$\frac{\text{Crecimiento}_{final} - \text{Crecimiento}_{inicial}}{t_2 - t_1} = \frac{RG}{23 - 0} = \frac{16.77 \text{ cm}}{23 \text{ semanas}} = 0.73 \frac{\text{cm}}{\text{semana}}$$

Utilizando la ecuación no.3 se calculó el promedio del crecimiento del taño durante las 23 semanas de experimentación para todas las plantas.

D. DATOS DE PLACA

Cuadro no.9 Placa luz fluorescente T5

Parámetro	Especificación
Marca	SuperSprout
Modelo	EDJT5-117L-NAO
Corriente	0.28 A (directa)
Voltaje	110/130 V
Frecuencia	60 Hz

Cuadro no. 10 Placa incubadora de laboratorio

Parámetro	Especificación
Marca	Lab-LINE instruments
Corriente	500 A (directa)
Voltaje	120 V
Potencia	0.6 kW
Frecuencia	50/60 Hz

E. FOTOGRAFÍAS

Figura no. 21 Placa no.1 *Agrobacterium* con plásmido *RUBY* en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala

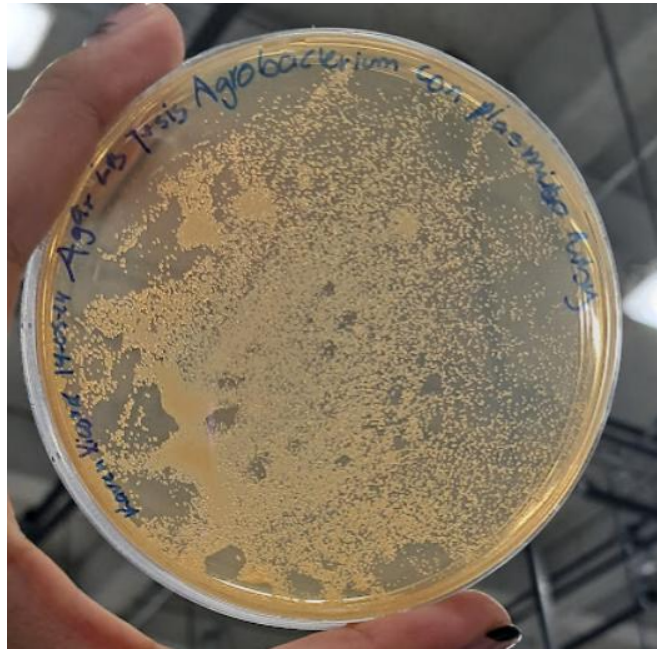


Figura no. 22 Placa no.2 *Agrobacterium* con plásmido *RUBY* en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala

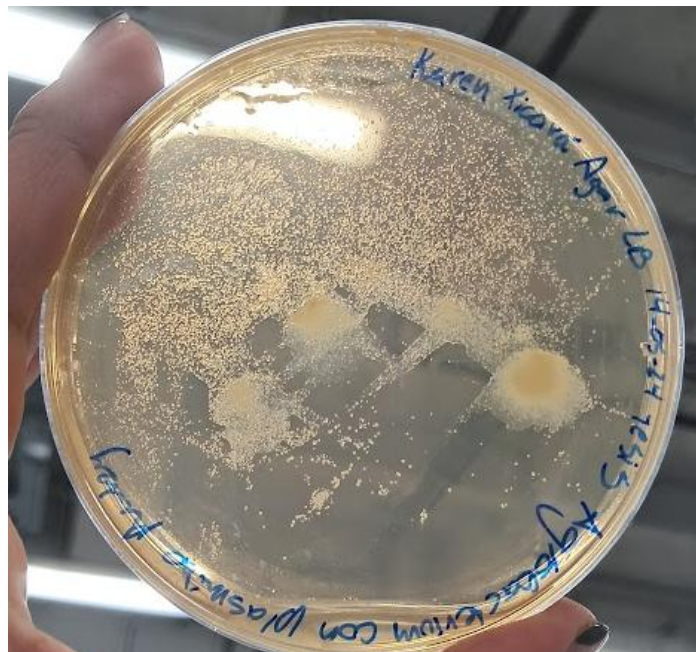


Figura no. 23 Plantas de tabaco creciendo dentro del domo del Kit Super Sprouter en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala



Figura no. 24 Plantas de tabaco en etapa de adaptación al nuevo ambiente en el interior del Laboratorio Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala



Figura no. 25 Planta de tabaco posterior a la inyección con *Agrobacterium* con plásmido *RUBY* en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala

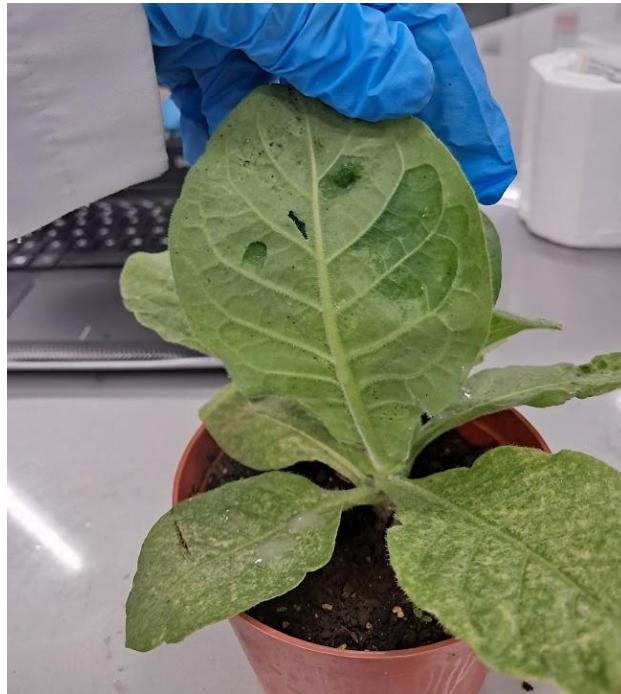


Figura no. 26 *Agrobacterium* con plásmido *RUBY* sembrado en placas de agar LB RIFF/Espec para corroboración de modificación vigente en el interior del Laboratorio de Química y biotecnología industrial aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala

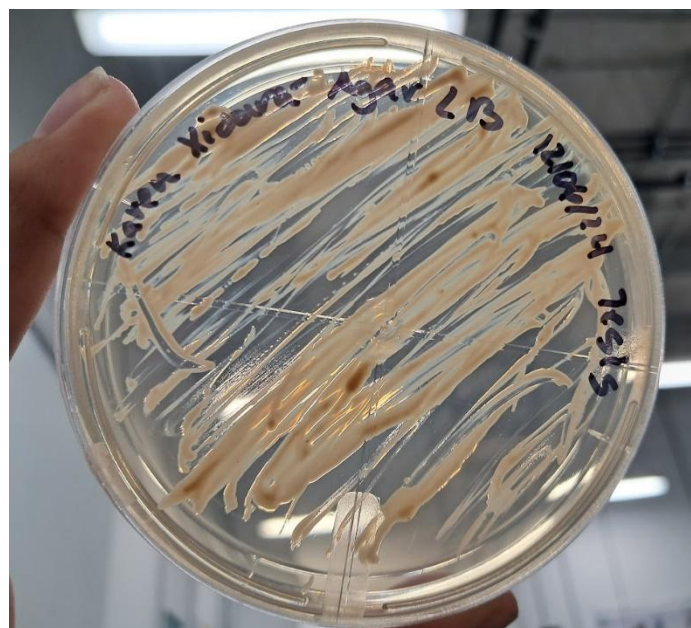


Figura no. 27 Hoja de hortensia modificada genéticamente en el interior del Laboratorio de Operaciones Unitarias



Figura no. 28 Hoja 2 de hortensia modificada genéticamente en el interior del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala



Figura no. 29 Incubadora de laboratorio en el interior del Laboratorio de procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala



Figura no. 30 Tallos dañados de las plantas de tabaco



XIII. GLOSARIO

ADN recombinante. Molécula de ADN formada artificialmente al combinar secuencias de ADN de diferentes organismos, utilizada en biotecnología para modificar genes o introducir nuevos rasgos en organismos.

Agrobacterium. Género de bacterias que se utiliza comúnmente en la ingeniería genética de plantas debido a su capacidad natural para transferir ADN a las células vegetales.

ARN guía. Molécula de ARN utilizada en la tecnología CRISPR-Cas9 para dirigir la enzima Cas9 hacia una secuencia específica del ADN, facilitando la edición del genoma.

CRISPR Cas 9. Herramienta de edición genética que permite cortar el ADN en lugares específicos, lo que facilita la inserción o eliminación de genes de manera precisa.

Gen RUBY. Gen identificado en las plantas que regula la producción de antocianinas, compuestos que aportan color rojo o púrpura a ciertos órganos vegetales.

Genes reporteros. Genes que se introducen en organismos para monitorear la actividad genética o celular, ya que su expresión genera una señal detectable, como la fluorescencia o coloración.

GMOs (Organismos Genéticamente Modificados). Organismos cuyo material genético ha sido alterado mediante ingeniería genética para obtener características específicas.

Plásmido. Pequeña molécula de ADN circular que puede replicarse de forma independiente del ADN cromosómico y que se utiliza frecuentemente como vector en ingeniería genética.

Tasa de crecimiento. Velocidad a la que un organismo, célula o población incrementa su tamaño o número de individuos, normalmente medida en un período determinado de tiempo.

Transgénesis vegetal. Proceso de introducción de genes de un organismo a otro en plantas, con el fin de modificar sus características genéticas, creando plantas transgénicas.

Vector: En biotecnología, un vehículo molecular, como un plásmido o un virus, que se utiliza para transferir material genético a un organismo receptor.