

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERIA



**CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR CON EL GEN CcV1 PARA MODIFICACIÓN
GENÉTICA DE PLANTAS**

Por:

VALERIANO CARRILLO CARRILO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERIA

Construcción de un vector con el gen CcV1 para modificación genética de plantas

Por:

VALERIANO CARRILLO CARRILLO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el comité de Asesoría:



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Director principal



Dra. Lihua Wei
Director externo



Dr. Valentín Robledo Torres
Co-Asesor



Dra. Iveth Dalila Antonio Carmona
Co-Asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERIA

Construcción de un vector con el gen CcV1 para modificación genética de plantas

Por:

VALERIANO CARRILLO CARRILLO

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por:


Dr. Pedro Pérez Rodríguez
Presidente


Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Secretario


Dra. Iveth Dalila Antonio Carmona
Sinodal


Dr. Valentín Robledo Torres
Sinodal




M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la división de ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2024

Derechos de autor y declaración de no plagio

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.



Valeriano Carrillo Carrillo

Autor principal

Agradecimientos

Al Consejo Nacional De Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento para la realización de este trabajo (proyecto A1-S44946: modificación genética de crucíferas con genes inmunosupresores de polidnavirus: ampliando el método tradicional transgénico para la protección de cultivos agrícolas de alto valor. FOSEC SEP-INVESTIGACION BÁSICA).

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por haber permitió realizar mis estudios y brindarme lo necesario para poder formarme profesionalmente.

A mi asesor el Dr. Miguel Ángel Perez Rodríguez por transmitirme parte de sus conocimientos, habilidades y orientarme profesionalmente, lo cual fue necesario porque gracias a eso pude terminar este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por aportar conocimientos, habilidades y experiencias agradables en mi instancia, especialmente a Araceli Rivera, Jazmín Solano, Mariel Sanches, Anel Hernández, Silvana García, Alhelí Solano, Angelica Alonso, Francisco Hernández, Gary Rodríguez, Saul Cruz, Hugo Méndez, Edgar Ramírez, Ángel Arguello, Bryan Rivera, Alejandro Alcocer y Zeus Guzmán; a la Dra. Flor Pacheco por transmitirme pacientemente su conocimiento y habilidades.

A mis seres queridos principalmente a mis padres Irma Carrillo y Artemio Carrillo por brindarme los recursos para mi desarrollo académico; a mis hermanos Josefa Carrillo, Basilia Carrillo, Regino Carrillo, Silvano Carrillo, María A. Carrillo y Jesús A. Carrillo por apoyarme y motivarme en el transcurso de la carrera; a mis amigos Esteban Salas, Luis Vivas, Dulce Contreras e Indalecio Prieto por brindarme apoyo y darme ánimos en los momentos difíciles.

Dedicatoria

Dedico este trabajo principalmente a mis padres, hermanos, amigos y profesores por las enseñanzas, experiencias compartidas que fueron fundamentales para ser una mejor persona.

Tabla de contenido

I.Introducción	1
II.Objetivos.....	3
III.Revisión de bibliografía.....	4
3.1 Polidnavirus	4
3.1.1 Avispas parasitoides himenópteras	4
3.1.2 Importancia de los polidnavirus en parasitación o parasitosis	6
3.1.3 El polidnavirus de <i>Cotesia congregata</i>	7
3.1.4 Productos génicos relevantes de los polidnavirus	9
3.1.5 La proteína CcV1 y mecanismo de acción	12
3.2 Modificación genética de plantas.....	13
3.2.1 Métodos para la modificación genética de plantas.....	13
3.2.2 Método de transformación basado en <i>Agrobacterium</i>	18
3.2.3 Vectores binarios	20
3.2.4 Vector pCAMBIA 1301	22
3.3 Modificación genética de vectores.....	24
3.3.1 Métodos para modificar vectores	24
3.3.2 Método de corte y pegado	26
IV.Materiales y métodos	29
4.1 Extracción del vector pBSK-CcV1	29

4.2	Transformación de <i>E. coli</i> Dh5 α con el vector pBSK-CcV1	29
4.3	Purificación del vector pBSK-CcV1.....	29
4.4	Amplificación del gen CcV1	30
4.5	Diseño de cebadores con adaptadores	31
4.6	Amplificación de <i>NCOI-CcV1-BstEII</i>	32
4.7	Purificación del producto de PCR.....	33
4.8	Restricción del producto de PCR <i>NcoI-CcV1-BstEII</i>	34
4.9	Purificación del producto <i>NcoI-CcV1-BstEII</i>	36
4.10	Extracción del vector pCAMBIA1301	37
4.11	Transformación de <i>E. coli</i> Dh5 α con el vector pCAMBIA1301	37
4.12	Purificación del vector pCAMBIA1301	37
4.13	Restricción del vector pCAMBIA1301 con las enzimas <i>NcoI- BstEII</i>	38
4.14	Purificación del vector <i>NcoI-pCAMBIA1301-BstEII</i>	40
4.15	Ligación	40
4.16	Transformación de <i>E. coli</i> Dh5 α	41
4.17	Selección de colonias por PCR.....	41
4.18	Secuenciación	43
4.19	Alineamiento de contigs de las secuencias.	44
V.	Resultados	45
5.1	Obtención de ADN.....	45

5.2	Digestión con las enzimas <i>NcoI</i> y <i>BstEII</i>	47
5.3	Ligación	49
5.4	PCR de comprobación	49
5.5	Secuenciación	52
VI.	Discusión.....	54
VII.	Conclusión	56
VIII.	Bibliografía.....	57

Índice de figuras

Figura 1. Sistema de infección de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Suzuki et al., 2009).....	20
Figura 2. Estructura básica de un vector binario, tomada de (Komori et al., 2007).....	22
Figura 3. Mapa del vector pCAMBIA1301 y sus componentes	24
Figura 4. Tipos de cortes escalonados tomada de (Castro, 2005).....	27
Figura 5. Electroforesis de la extracción mediante estuche comercial de Promega del vector pBSK-CcV1.....	46
Figura 6. PCR de prueba del gen CcV1 con los cebadores SNCOCV y BSTECC (carril 1), M: marcador de peso molecular 100 pb Axygen.....	46
Figura 7. Electroforesis del amplicón <i>NcoI</i> -CcV1- <i>BstEII</i> y el vector pCAMBIA1301 (carril 1 y 2 respectivamente).....	47
Figura 8. Electroforesis del pCAMBIA1301 y del producto de PCR <i>NcoI</i> -CcV1- <i>BstEII</i> , digeridos con <i>NcoI</i> y <i>BstEII</i> . Carril M: marcador de peso molecular de 1Kb de Axygen, carril 1 pCAMBIA1301 digerido con <i>NcoI</i> y <i>BstEII</i> , carril 2 <i>NcoI</i> -CcV1- <i>BstEII</i> digerido con <i>NcoI</i> y <i>BstEII</i>	48
Figura 9. Producto de purificación en gel de CcV1 y pCAMBIA1301 tratados con las enzimas de restricción <i>NcoI</i> y <i>BstEII</i> . El carril 1 corresponde a CcV1, el carril 2 pertenece a el vector pCAMBIA1301 y M representa el marcador de peso molecular 1Kb Axygen.....	49
Figura 10. Corrimiento electroforético de la PCR en colonia, utilizando los cebadores pbinNostF y pbinNostR.....	50

Figura 11. Purificación del AND plasmídico mediante el estuche comercial de Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega de la construcción de las 10 colonias seleccionadas.	51
Figura 12. PCR de las muestras 1, 2, 3 y 10 y de los controles negativos (pCAMBIA1301 nativo y agua). Las muestras del vector pCAMBIA1301-CcV1 se muestran en los carriles 1, 2, 3 y 5, mientras que los controles están en los carriles 5 y 6, carril M corresponde al marcador de peso molecular de 1kb de Axigen.	52
Figura 13. Alineamiento de las secuencias obtenidas y el constructo esperado.	53
Figura 14. Secuencia obtenida con el cebador pBinnost.	53
Figura 15. Secuencia obtenida con el cebador RseqCcV1.	53

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencia de los cebadores NCOCC y BSTCC.	31
Tabla 2. Componentes de la reacción de PCR del gen CcV1.....	31
Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR para amplificar el fragmento <i>NcoI</i> -CcV1- <i>BstEII</i>	32
Tabla 4. Programa de PCR para amplificar <i>NcoI</i> -CcV1- <i>BstEII</i>	33
Tabla 5. Mezcla de reacción general para la enzima <i>NcoI</i>	34
Tabla 6. Mezcla de reacción general para la enzima <i>BstEII</i>	35
Tabla 7. Componentes de la reacción de digestión de <i>NCOI</i> -CcV1- <i>BSTEII</i> usando la enzima <i>NcoI</i>	36
Tabla 8. Componentes de la reacción de digestión de <i>NCOI</i> -CcV1- <i>BSTEII</i> usando la enzima <i>BstEII</i>	36
Tabla 10. Componentes de la reacción de digestión del vector pCAMBIA1301 usando la enzima <i>BstEII</i>	40
Tabla 11. Componente de la ligación de CcV1 y pCAMBIA1301.	41
Tabla 12. Componentes de la PCR en colonia.....	42
Tabla 13. Programa de PCR de los cebadores pBinNostF y pBinNostR usados para verificar la construcción pCAMBIA-CcV1.	42
Tabla 14. Componentes de la reacción de PCR de comprobación.	43
Tabla 15. Secuencia de los cebadores Pbinnost y Rseq Ccv1.....	44

Resumen

Las avispas parasitarias son parásitos de otros insectos entre los que se encuentran los lepidópteros, a los cuales terminan por matar, puesto que se desarrollan de manera externa o internamente, estas avispas parasitarias trabajan en simbiosis con los polidnavirus (PDVs), virus que tienen un genoma de ADN circular polidisverso. Los polidnavirus son los responsables del éxito de la parasitación, ya que suprimen la respuesta inmune del huésped. Un ejemplo es el virus de *Cotesia congregata*, que parasita al lepidóptero *Manduca sexta*, el virus se encarga de suprimir la respuesta inmune de *M. sexta* lo que permite que *C. congregata* se desarrolle. En este trabajo se usó la proteína CcV1 del polidnavirus de *C. congregata* para clonarlo en el vector binario pCAMBIA1301, la metodología empleada fue mediante enzimas de restricción que nos permitió obtener el gen CcV1 y el vector pCAMBIA1301 con extremos compactibles y con la ayuda de la T4 DNA ligasa se clono el gen. El producto de la ligación se usó para transformar la cepa de *E. coli* Dh5 α , para verificar la construcción se realizó PCR en colonia con cebadores específicos para el gen y el vector para confirmar las colonias positivas, para tener mayor certeza se seleccionaron tres muestras y se mandaron a secuenciar con cebadores que tuvieran cobertura del gen CcV1, las secuencias obtenidas se analizaron y nos permitió corroborar que el gen se encuentra entre promotor CAMV 35S y el terminador NOS y de esta manera podemos concluir que la construcción es la correcta a la esperada y puede usarse para la transformación mediada por *Agrobacterium* para obtener una planta transgénica.

Palabras clave: polidnavirus, *Cotesia congregata*, vector binario, *Agrobacterium*, transgénico.

I. Introducción

En la actualidad la agricultura se está enfrentando varios retos entre los que se encuentran las plagas que causan pérdidas importantes a los productores, sin embargo, a la par se van desarrollando nuevas e implementando nuevas técnicas y tecnologías que ayudan a contrarrestar estos problemas, un ejemplo es la creación de plantas transgénicas que poseen un gen exógeno para agregar una nueva característica y esta puede ser conferir resistencia hacia una plaga, por mencionar un ejemplo.

Las avispas parasitoides son insectos que se encuentran generalmente en todos los ecosistemas, parasitan a otros insectos de manera interna o externamente (González-Moreno, 2020; Pickering & Sharkey, 1995). La manera en la que encuentran a sus presas es a través de metabolitos secundarios que las plantas liberan en las heridas, así como, por las secreciones salivales de las orugas (Godfray, 2007).

El éxito de las avispas parasitarias para poder parasitar y desarrollarse en las orugas huéspedes se debe a la simbiosis que han desarrollado con los polidnavirus (PDVs), estos virus presentan un genoma de ADN circular de doble cadena polidispersos de ahí su nombre (poli-ADN-virus) (Webb, 1998). Esta asociación ocurre principalmente en avispas parasitoides de las familias Braconidae e Ichneumonidae de donde derivan sus nombres, Bracovirus (BV) e Ichnovirus respectivamente (Dupuy et al., 2006). Los genes de los PDVs solo se expresan en el huésped parasitado y esto ocurre después de la oviposición de los huevos de la avispa parasitaria.

La avispa parasitaria *Cotesia congregata* presenta un polidnavirus que expresa la proteína CcV1 para suprimir y modular la respuesta inmune del huésped y de esta manera las larvas de *C. congregata* puedan desarrollarse hasta llegar a la etapa adulta (Rodríguez-Pérez

& Beckage, 2006), en el lepidóptero *Manduca sexta* la proteína CcV1 tiende a expresar dos horas posterior a la parasitación. Aprovechando este mecanismo de la proteína CcV1 se puede usar para ser expresado en plantas y hacerlas resistentes a lepidópteros.

La transformación de plantas puede ser de manera directa en donde se emplean métodos químicos y físicos y de manera indirecta en donde se emplea un sistema biológico, generalmente *Agrobacterium tumefaciens* (Bleotu et al., 2018). Para la transformación genética con *Agrobacterium* se necesita una cepa desarmada así como un vector binario en la mayoría de los casos, esto implica el uso de técnicas de biología molecular para poder construir el vector con el gen que se desea insertar y para poder hacerlo se dispone de técnicas para modificar vectores, algunas se basan en cortar con enzimas de restricción de tipo II y ligar con una ADN ligasa, mientras que otras suelen emplear sitios de recombinación por homología entre las bases.

II. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Construir un vector con el gen CcV1 para la modificación genética de plantas.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar la secuencia CcV1 bajo el promotor del vector pCAMBIA1301.
- Verificar la construcción pCAMBIA1301-CcV1.

III.Revisión de bibliografía

3.1 Polidnavirus

3.1.1 Avispas parasitoides himenópteras

Los parasitoides son insectos que atacan a otras especies de insectos, que finalmente matan a su huésped, ya sea por manipulación fisiológica e inducción de la detención del desarrollo del huésped o por consumo físico de sus tejidos (Beckage & Gelman, 2004). Los insectos parasitoides son más pequeños que su huésped y están especializados en la elección del huésped (Hoffmann & Frodsham, 1993). El parasitismo ocurre en al menos cinco órdenes de insectos, es decir, himenópteros, dípteros, coleópteros, lepidópteros y neurópteros (Eggleton & Belshaw, 1992). El orden Himenóptera contiene miles de especies de avispas parasitoides, las cuales contribuyen al control natural de las poblaciones de otros artrópodos al alimentarse sus larvas interna o externamente de sus hospederos (Ruiz-Cancino et al., 2011), este orden alberga alrededor de 50,000 especies parasitoides, a su vez se divide en dos subórdenes, Symfhyta y Apocrita, en el primero están las moscas sierra, mientras que en el segundo se encuentran las hormigas, abejas y avispas, dentro del suborden Apocrita se encuentra una subdivisión, Parasítica y Aculeata, es en la primera división en donde se encuentran las avispas parasitarias (Godfray, 1994). Las avispas parasitoides son insectos que se encuentran generalmente en todos los ecosistemas terrestres a excepción de los círculos polares (Pickering & Sharkey, 1995), estos parasitoides requieren en su ciclo de vida de otro insecto que usan como hospedero donde ovipositan sobre o dentro de su cuerpo (González-Moreno, 2020). Estos insectos parasitoides pueden alterar el ciclo de vida de la plaga (huésped) para que puedan llevar a cabo su desarrollo (Altieri & Nicholls, 1998; DeBach & Rosen, 1991).

La manera en la que estas avispas encuentran a sus presas, es por los metabolitos secundarios que las plantas liberan al ser atacadas por las orugas, de igual manera también son atraídas por los compuestos químicos que se liberan de las heces o por las secreciones salivales (Godfray, 2007). Una vez que localizan al huésped lo paralizan inyectando veneno para después depositar los huevos sobre la superficie del huésped (Wermelinger & Herrmann, 2015). Los parasitoides himenópteros por lo general suelen alimentarse de hemolinfa de los huéspedes y lo hacen de varias maneras, una de ellas es a través de la oviposición, lo pueden hacer antes o después de la oviposición, aunque hay parasitoides que solo pican al huésped con el ovopositor o con el aparato bucal con el único propósito de alimentarse (Jervis & Kidd, 1986). La alimentación de las larvas parasitarias está basada en el hospedador mientras que en estado adulto se alimentan de polen y néctar, o en algunos casos pueden actuar como depredadoras de otros insectos (Ives & Hochberg, 2000), la alimentación en insectos suele ser principalmente de la hemolinfa del huésped, aunque las avispas parasitarias generalmente buscan habitas donde hay gran número de huéspedes, así como de flores (Jervis et al., 1993). Las avispas parasitoides son de vida libre cuando son adultas, mientras que en estado larvario se desarrollan sobre o dentro del cuerpo de otro insecto, si las larvas se desarrollan alimentando dentro del huésped son endoparasitoides y si estas lo hacen de manera externa son ectoparasitoides, en ambos casos el huésped siempre muere (Godfray, 2007). Las larvas endoparasitoides son las que tienen un gran reto, ya que están dentro del huésped y tiene que enfrentarse al sistema inmune, por lo que esto representa un gran desafío, porque deben evadir la respuesta inmune, la cual está diseñada para reconocer, encerrar y, en última instancia asfixiar a dichos intrusos macroscópicos en capas de hemocitos melanizados y fusionados (Gupta, 1986).

3.1.2 Importancia de los polidnavirus en parasitación o parasitosis

Los polidnavirus son partículas parecidas a virus que se encuentran asociados de manera obligada con algunos Himenópteros (Turnbull & Webb, 2002). Estos virus se replican exclusivamente en los ovarios de la avispa hembra (Lavine & Beckage, 1995). El nombre que reciben hace referencia a sus genomas polidispersos únicos (poli-ADN-virus) (Webb, 1998). Tienen un genoma grande y complejo que alberga genes inmunosupresores que se expresan en el huésped y son esenciales para el parasitismo, el genoma viral está compuesto de múltiples círculos de ADN bicatenario, pueden presentarse de 20 a más de 100 segmentos y pueden tener un tamaño individual de 2 a más 30 kb (Bézier et al., 2009; Strand & Burke, 2020).

Las avispas parasitarias desarrollaron varias estrategias para contrarrestar el ataque del sistema inmune del huésped y así aumentar el éxito parasitario, la estrategia más exitosa es la domesticación de un bracovirus (BV), que más de 46,000 especies de avispas braconidas comparten, el beneficio de esta domesticación consiste en que las avispas usan a los BV como sistema de administración de genes de virulencia (Gauthier et al., 2021). Dichos genes son introducidos durante la oviposición, donde la avispa hembra produce partículas del virión y las inyecta en el huésped lepidóptero al momento de poner los huevos, posterior a esto, los genes del PDV son expresados para permitir la supervivencia de la larva parasitoide (Wei et al., 2023), la función principal de estos genes PDV es prevenir la encapsulación de los huevos del parasitoide por parte del sistema inmunológico del huésped (Edson et al., 1981). Los PDV infectan preferentemente los dos tejidos inmunes principales de los insectos (hemocitos y cuerpo graso). La mayoría de los genes en el de los PDVs se transcriben dentro de las 2 h posteriores a la infección. Tanto las avispas machos como las hembras llevan el genoma del

PDV en sus cromosomas, pero la escisión y el ciclo de replicación viral se limitan al ovario de la avispa hembra, específicamente en las células del cáliz ovárico (Beckage, 2008). La replicación de los PDV es detectada por primera vez en la última etapa de pupación, en las células del cáliz del tracto reproductivo femenino, cuando los tejidos del insecto se están desarrollando y sufriendo una morfogénesis al pasar de pupa al estado adulto (Webb, 1998).

Los PDV tienen un ciclo de vida que se lleva a cabo en dos huéspedes, el primero es donde los PDV se replican y esto ocurre específicamente en las células del cáliz de los ovarios de avispas parasitoides (Gundersen-Rindal et al., 2013). El paso patogénico ocurre en el segundo huésped y este empieza después de la oviposición cuando la avispa inyecta los huevos con un gran número de viriones en el huésped lepidóptero, estos viriones tendrán la función de invadir los tejidos del huésped, el cuerpo graso y penetrar en los hemocitos que se encuentran en circulación en la hemolinfa (Rodríguez-Pérez & Beckage, 2006; Schmidt et al., 2001), al mismo tiempo se expresan los genes de virulencia (Strand & Burke, 2014). Estos genes tienen dos principales funciones : 1) Inmunocomprometen al huésped, lo que evita que las crías de avispa mueran, y 2) alteran el crecimiento del huésped, lo que promueve el desarrollo de las crías de avispa y, a menudo, provoca la muerte del huésped (Beckage & Drezen, 2011). Una vez que la larva endoparásitoide se ha desarrollado completamente del huésped, este termina por morir y por lo tanto el ADN viral desaparece de las células del lepidóptero (Webb, 1998).

3.1.3 El polidnavirus de *Cotesia congregata*

Las especies de las avispas parasitoides que pertenecen a las familias Braconidae e Ichneumonidae del orden himenóptera, contienen polidnavirus (PDV) que inoculan en grandes cantidades dentro de su insecto huésped en el momento de la oviposición (Rodríguez-Pérez

& Beckage, 2006) y su vez, Polydnviridae se divide en dos géneros denominados Bracovirus (BV) e Ichnovirus (IV) de acuerdo a la familia de avispas parasitoides a las que estén asociadas. Los dos géneros de PDV se originaron a partir de virus distintos integrados en los respectivos genomas de la subfamilia de avispas, por ejemplo, las avispas braconidas con bracovirus se originaron a partir de la integración ancestral de un nudivirus en una avispa ancestral (Chevignon et al., 2018).

Cotesia congregata es una avispa braconida endoparasitoide gregario que parasita larvas de más de una docena de especies de las familias Sphingidae y Noctuidae (Ramos, 2017). Esta avispa causa distintas alteraciones fisiológicas negativas en el huésped, dichas alteraciones consisten en detener el desarrollo del huésped, anular la respuesta inmune e inducir la expresión de nuevas proteínas de hemolinfa que comienzan una vez que es parasitado (Beckage et al., 1987). Estos daños no son realizados solo por la avispa braconida endoparasitoide, sino que trabaja en conjunto con un bracovirus (BV), que es el responsable de dichos daños.

Durante la oviposición por *C. congregata*, las avispas hembras inyectan viriones de PDV en la hemolinfa de la larva huésped, después de una hora estos viriones con la nucleocápside desnuda se alinean en los poros nucleares (Beckage et al., 1994), cabe mencionar que en algunos casos la presencia del virus no es suficiente para inducir un estado de inmunosupresión en el huésped, sino que también debe estar presente el veneno de la avispa (Stoltz et al., 1988). La replicación de los PDV en *C. congregata* ocurre sólo dentro de los cálices de las avispas hembras adultas, específicamente en los núcleos de las células, los cuales están llenos de viriones, después la célula se rompe y los viriones son liberados en el lumen y esto trae como consecuencia que estén dispersos en el fluido del cáliz, estas

partículas de PDV son inyectadas en la oruga huésped en el momento de la oviposición. En primera instancia el PDV infecta los hemocitos e interfiere con su capacidad para participar en la encapsulación celular; como consecuencia de la infección, el insecto huésped está funcionalmente inmunosuprimido y la progenie de la avispa en desarrollo no es reconocida, encapsulada ni eliminada. *C. congregata* generalmente puede ovipositar entre 50 y 150 huevos en una sola larva del gusano de tabaco (Rodríguez-Pérez & Beckage, 2006; Washburn et al., 2000).

En larvas parasitadas de *Manduca sexta* por *C. congregata*, el PDV induce la muerte celular o apoptosis de los hemocitos, lo que indica que los PDVs modula los dos mecanismos de la respuesta inmune celular (Rodríguez-Pérez & Beckage, 2006). Se han identificado principalmente tres proteínas (EP1, EP2 y EP3), que se encuentran en la hemolinfa del huésped después de la parasitación y están presentes en la hemolinfa del huésped e intervienen con el sistema inmune, por ejemplo, la proteína EP1 se expresa después de 24 a 48 h después de la oviposición y se cree que esta proteína previene la encapsulación de los huevos (Harwood & Beckage, 1994; Savary et al., 1997).

3.1.4 Productos génicos relevantes de los polidnavirus

Los PDVs no muestran patogenicidad en los huéspedes primarios, aunque la transcripción de genes virales se puede detectar en algunas avispas, pero generalmente se encuentran en niveles muy bajos, estos genes son expresados una vez que los viriones ingresan al huésped y tienden a alterar diversos elementos de la inmunidad celular, en los que se puede destacar la inactivación de hemocitos, degradación del citoesqueleto y la interrupción de la adhesión (Glatz et al., 2004; Ye et al., 2018). A continuación, se describen algunas familias, así como genes importantes de los PDVs.

3.1.4.1 Familia de los motivos cisteína (*cys*)

Estos genes han sido detectados tanto en bracovirus como en ichnovirus (Gundersen-Rindal et al., 2013), tienen motivos *cys* variables, pero comparten varias estructuras conservadas, por ejemplo el gen *Mbcrp1* del bracovirus *Microplitis bicoloratus* (MbBV) contiene una secuencia codificante del dominio de tipo inhibidor de tripsina (TIL) rico en cisteína y la expresión de MbCRP1 recombinante inhibe la expresión de actina en células Hi5, por lo que la expresión de este gen está relacionado en diversas funciones como la alteración del citoesqueleto de actina (Luo & Pang, 2006). Otro ejemplo son las proteínas Cys VHv1.1 y Vhv1, en el icnovirus *Campoletis sonorensis* (CsIV) son expresadas en el cuerpo graso y secretados en la hemolinfa, donde se unen a la superficie de los hemocitos y están implicadas con la reducción de la respuesta de encapsulación del huésped (Wei et al., 2023).

3.1.4.2 Familia de genes centrales glicosilados (*Glc*)

Contiene principalmente los genes *glc1.8* que codifican una glicoproteína similar a la mucina de la superficie celular en MdBV (Wei et al., 2023), esta proteína se localiza en la superficie celular de los hemocitos infectados con MdBV y está involucrada en el bloqueo de la encapsulación, así como en la fagocitosis, esto sugiere que esta proteína también inhibe la adhesión celular al dificultar las interacciones receptor-ligando (M. Beck & Strand, 2005; Gundersen-Rindal et al., 2013).

3.1.4.3 Familia del factor de crecimiento epidérmico (*Egf*)

Esta familia incluye tres miembros (*Egf1.0*, *Egf1.5* y *Egf0.4*) son expresado por MdBV, de los cuales solo *Egf1.0* y *Egf1.5* se ha confirmado que están implicados en inhibir la melanización del plasma de dos huéspedes lepidópteros susceptibles (Lu et al., 2010),

(*Pseudoplusia includens* y *Helicoverpa zea*) y dos huéspedes lepidópteros no susceptibles (*Manduca sexta* y *Bombyx mori*) (Wei et al., 2023), además estas dos proteínas tienen implicaciones con la cascada de la fenol oxidasa (M. H. Beck & Strand, 2007). Mientras que la proteína Egf0.4 no presenta actividad antimelanización ni tampoco presenta alguna interacción con alguna proteinasa conocida de la cascada del fenol oxidasa (Lu et al., 2010).

3.1.4.4 Familia Ankyrin (Ank)

Estos genes se encuentran tanto en los bracovirus e ichnovirus, al parecer su expresión afecta a su vez la expresión del factor nuclear kappa-B, el cual está relacionado con la respuesta inmune de insectos y mamíferos. Se ha demostrado que las proteínas anquirinas tienen la capacidad de alterar la señalización de NF-kB en huéspedes lepidópteros, lo que conduce a cambios en la regulación de la apoptosis, la provocación de respuestas antivirales y la producción de péptidos antimicrobianos (Wei et al., 2023).

3.1.4.5 Proteína tirosina fosfatasa (PTP)

Esta familia de genes es particularmente de los bracovirus, los transcritos de estos genes se han detectado dos horas después de la parasitación. Los genes PTP interrumpen los ciclos de quinasas/fosfatasas mediante la desfosforilación de la proteína diana (Wei et al., 2023), esto conlleva a que varios procesos relacionados con el desarrollo e inmunidad del huésped se vean afectados, por ejemplo, algunos miembros de la familia PTP inactivan hemocitos del huésped (Ye et al., 2018), en *Spodoptera exigua* la expresión de CpBV-PTP provocó reducciones en la diseminación celular y las actividades de encapsulación (Ibrahim & Kim, 2008).

3.1.4.6 Genes *CrV1* (*C. rubecula*) y *CcV1* (*C. congregata*)

Son dos genes similares que codifican una proteína que se encuentra en los hemocitos, sin embargo, la glicoproteína del gen *crv1* expresada en *Pieris rapae* es la que mejor se ha caracterizado y parece estar implicada en la despolimerización del citoesqueleto de actina de los hemocitos, así como alterar la capacidad de propagación de los hemocitos en superficies extrañas (Wei et al., 2023), cabe mencionar que la expresión de este gen no dura más de 8 horas posterior a la parasitación. Mientras que el gen *ccv1* se expresa en el lepidóptero *Manduca sexta*, específicamente en el tejido adiposo y en los hemocitos, en un rango de 2 a 4 horas después de la parasitación (Le et al., 2003). Experimentos previamente realizados por Labropoulou et al., 2008, sugieren que *ccv1* interactúa con la hemolinfa e inhibe la función de los hemocitos en la respuesta inmune normal.

3.1.5 La proteína *CcV1* y mecanismo de acción

La proteína *CcV1* es un polipéptido de 477 aminoácidos (aa) de largo, incluye una secuencia peptídica señal hidrofóbica N-terminal (aa 1-23) escindida en el proceso de secreción (Labropoulou et al., 2008). *CcV1* es un gen ortólogo de *CrV1* y se expresa en el lepidóptero *M. sexta* parasitada por *C. congregata* (Wei et al., 2023). Esta proteína está presente en el citoplasma de los hemocitos desde las 24 h posteriores a la parasitación hasta la aparición de las pupas de *Cotesia*. Sus funciones están implicadas en la disfuncionalidad de los hemocitos, lo que trae como consecuencia la reducción del número de hemocitos funcionales, también tiene efectos en su comportamiento provocando que tomen una forma redonda y no se extiendan, siendo la última configuración la más importante para permitir envolver el sustrato, que en este caso es el huevo del parasitoide, estos daños son irreversibles para los hemocitos y esto promueve exitosamente el desarrollo del parasitoide (Amaya et al.,

2005). También se ha planteado la hipótesis que actúa de manera similar a CrV1, de tal manera que interacciona directamente con los hemocitos a nivel de citoesqueleto, ya que desestabiliza la actina citoesquelética, así como la alteración de la integridad del citoesqueleto y estos cambios dan lugar a la inhibición de respuesta de los hemocitos hacia un agente extraño (Asgari & Schmidt, 2002; Labropoulou et al., 2008).

3.2 Modificación genética de plantas

3.2.1 Métodos para la modificación genética de plantas

La modificación genética consiste en la alteración del material genético (ADN) de un organismo de tal manera que se pueden agregar genes de otro organismo para conferirle características que no posee de manera natural, aunque la modificación también puede ser el silenciamiento, la sobreexpresión o la eliminación de un gen del mismo organismo. La modificación genética de plantas se remonta aproximadamente a 10.000 años con la práctica de la selección artificial y la cría selectiva (Abdul Aziz et al., 2022), cuando el ser humano comenzó a domesticar las primeras plantas para su consumo, antes de que se descubriera el ADN ya se realizaban cruces para producir híbridos con las características deseadas que el mismo hombre iba seleccionando de acuerdo a sus necesidades, esta modificación genética dependía únicamente de la experiencia acumulada de generaciones de agricultores y criadores de estas plantas cultivadas (Job, 2002). La principal desventaja de estas modificaciones eran las limitaciones de especies que se podían cruzar además de que el nuevo híbrido podía poseer otras características además de la deseada, era una modificación poco precisa porque no podías delimitar que genes querías modificar y cuáles no.

Con los nuevos avances en la biología molecular, así como la tecnología del ADN recombinante estas modificaciones se pueden hacer de una manera más precisa, ya que

puedes agregar genes de otros organismos como hongos, virus, bacterias y animales o también puedes quitar y/o alterar un gen específico sin necesidad de alterar otros genes (Rivera et al., 2012). Para la modificación genética de plantas se lleva a cabo un proceso complejo que va desde la identificación del gen de interés el cual expresara la característica deseada hasta la regeneración de la planta transformada a través del cultivo de tejidos y selección in vitro (Abdul Aziz et al., 2022; Diaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012).

Los métodos comunes para la transformación genética de plantas generalmente se dividen en transformación directa o indirecta, en la transformación directa se emplean a través de sistemas no biológicos, el cual incluye métodos químicos y físicos y la transformación indirecta se emplea sistemas biológicos, generalmente se usan bacterias (del género *Agrobacterium*), aunque también se han reportado transformación genética de plantas mediada por virus (Bleotu et al., 2018; Keshavareddy et al., 2018).

3.2.1.1 *Método de transformación mediada por vectores virales*

El principal uso que tienen estos vectores es para la producción de proteínas heterólogas a gran escala, se han empleado dos tipos de vectores virales, el de primera generación en donde los virus poseen todos sus componentes, pero la proteína de interés se introduce bajo la influencia de un promotor fuerte duplicado, generalmente el promotor subgenómico de la proteína de cubierta; los vectores virales de segunda generación son aquellos que se han desarmado y solo se les ha dejado las partes más importantes además de la inserción del gen de interés, estos vectores virales pueden ser empleados en la transfección de la planta, como una partícula viral madura o como copias del vector viral. Los ejemplos de virus más estudiados o en donde se tiene más avance son los Geminivirus y Caulimovirus, debido a que estos son virus de DNA y se pueden clonar directamente, una de las desventajas

es el tamaño del inserto para que este sea estable, además de que la planta puede presentar síntomas particulares de la enfermedad. Una de las ventajas destacables es el rango de hospedadores de infección además de que no se limitan solo a una célula, sino que se esparce a toda la planta (Diaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012; Gleba et al., 2007).

3.2.1.2 Transformación mediada por electroporación

La electroporación es una técnica que utiliza pulsos eléctricos para crear poros transitorios en la membrana celular, que promueven la entrega de moléculas biológicamente activas a las células, la célula es sometida impulsos eléctricos que van desde microsegundos a milisegundos, utilizando campos entre los 200 V/cm hasta los 600 V/cm. El DNA que se va a introducir en la célula, debe estar en la solución ya sea en un plásmido o de manera lineal. Una de las ventajas es que el método es más efectivo que los métodos químicos, además que es rápido y sencillo, sin embargo, posee desventajas, una de ellas es que se necesitan protoplastos (células sin pared celular) para que pueda tener permeabilidad la membrana plasmática, otra desventaja destacable es que las células pueden sufrir daños irreversibles en sus membranas debido a los impulsos eléctricos a los cuales se les somete (Diaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012; Krassowska & Filev, 2007).

3.2.1.3 Transformación mediada por biobalística

Esta técnica de transformación se basa en recubrir micropartículas con ADN para que sean disparadas, de tal manera que puedan penetrar las paredes y membranas celulares sin matarlas, las micropartículas deben ser químicamente inertes, así como tener afinidad de unión al ADN, pero también deben liberarlo una vez que se encuentra dentro de la célula. Generalmente las micropartículas están hechas de oro, tungsteno o platino y miden de 0.5 a

5 μm y son lanzadas o disparadas con una pistola genética (Bleotu et al., 2018; Diaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012).

Esta metodología se aplicó en un inicio para los cereales recalcitrantes, aunque la mayor aplicación de esta metodología está dirigida a la expresión genética transitoria y la inoculación de plantas con patógenos virales. Una de las desventajas es la baja eficiencia de transformación, ya que las micropartículas son disparadas aleatoriamente, además de ser una metodología muy costosa (Keshavareddy et al., 2018).

3.2.1.4 Método de transformación basado en sonicación

Este método se basa en hacer la membrana celular más permeable a través de ondas acústicas, esto se lleva a cabo en un medio acuoso, lo que permite la entrada de macromoléculas por ejemplo el ADN dentro de la célula (Rivera et al., 2012). La sonicación es un método novedoso para la transferencia de genes a protoplastos de plantas y células vegetales intactas, la muestra vegetal a transformar se sumerge en un tubo de microcentrífuga donde se encuentra el medio de sonicación, después se agrega el ADN plasmídico y se mezcla bien para que la muestra este lista para la sonicación, los pulsos de ultrasonido son proporcionados por maquinas ordinarias que normalmente se usan para homogenizar diversos tejidos, finalmente la muestra vegetal se transfiere a un medio de crecimiento nuevo. Esta metodología presenta varias ventajas entre las cuales podemos destacar que se puede aplicar en protoplastos, células en suspensión, así como en diferentes tejidos (Liu et al., 2006).

3.2.1.5 Método de transformación basado en compuestos químicos

Esta metodología se basa en el uso de compuestos químicos para inducir permeabilidad en las membranas, el principal requisito para poder transformar una célula

vegetal es que no tenga la pared celular (protoplasto) para poder manipularla fácilmente. Los compuestos químicos más usados son el Polietilenglicol (PEG), Fotostato de calcio y Poly-L-omotina, estas sustancias permiten la formación de poros transitorios en la membrana lo que permite la introducción de ADN dentro de la célula (Danilova, 2007; Diaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012).

Esta técnica de transformación es simple y puede adaptarse a varias especies de plantas y tejidos, fue la primera técnica alternativa para transformar gramíneas (Diaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012; Jaideep & Csaba, 1998).

3.2.1.6 Método de transformación basado en microinyección

Esta metodología es una de las más precisas para la introducción de ADN en las células animales y recientemente también se ha empleado en las células vegetales, se ha utilizado para transformar diversas especies de plantas como el tabaco, petunia, soya entre otras (Rivera et al., 2012), este método consiste en la introducción directa de ADN en la célula vegetal a través de una micropipeta de inyección de vidrio, en este método se puede conocer la cantidad de ADN a inyectar (Morikawa & Yamada, 1985), además de que la células diana pueden ser protoplastos, células con pared celular ya formada, suspensiones celulares o estructuras multicelulares como embriones cigóticos o no cigóticos (Gaba et al., 2008).

La técnica de microinyección es muy lenta, además requiere un micromanipulador costoso y procedimientos muy tediosos para inmovilizar las células con una pipeta de sujeción y una succión suave, también presenta una baja eficiencia de transformación comparada con la técnica de balística (Rivera et al., 2012).

3.2.2 Método de transformación basado en *Agrobacterium*

La interacción *Agrobacterium*-planta es un proceso complejo que se puede dividir en varios pasos funcionales. *Agrobacterium tumefaciens* que alberga el plásmido inductor de tumores (Ti) induce agallas en las raíces y coronas de numerosas especies de angiospermas principalmente dicotiledóneas y algunas gimnospermas (Hwang et al., 2017). El proceso de transformación genética mediada por *A. tumefaciens* reside en el plásmido Ti, concretamente, en la transferencia de una región del plásmido Ti desde la bacteria hasta su integración en el genoma nuclear de la planta; a este ADN transferido se le como ADN-T. Su procesamiento, así como su exportación desde la bacteria hasta la célula vegetal están regulados en gran parte por los genes de virulencia (*vir*) que son transportados por el plásmido Ti (Gelvin, 2003). El ADN-T esta flanqueado por dos bordes de 25 pb y una región altamente homóloga, esta secuencia será procesada por las proteínas *vir* (Yadav et al., 1982).

El proceso de transformación comienza cuando la planta libera compuestos fenólicos y azúcares al ambiente, estos compuestos son reconocidos directamente por la proteína transmembranal *VirA* que con ayuda del complejo *ChE*-azúcar ayudan a la activación de los genes *vir* (Doty et al., 1996; Shimoda et al., 1993), consecuentemente la proteína *VirA* es autofosforilada y posteriormente transfosforila la proteína *VirG* que aumentara el nivel de la transcripción de los genes *vir* mediante la interacción con secuencias de la caja *vir* que se encuentran aguas arriba del promotor *vir* (Gelvin, 2003; Jin et al., 1990).

Una vez que los genes virulencia se han expresado comienza la síntesis y la separación del ADN-T que es llevada a cabo por las proteínas *VirD1* (una helicasa) y *VirD2* (una endonucleasa) (Scheiffele et al., 1995), estas proteínas se unen tanto al borde derecho como al izquierdo para cortar la cadena inferior del ADN-T, dando como resultado una

molécula de ADN-T que permanecerá unido covalentemente al extremo 5' de la proteína VirD2 (Dürrenberger et al., 1989; Hwang et al., 2017). La proteína VirD2 ayuda al ADN-T a migrar desde la bacteria hasta la célula vegetal a través del transportador VirB (Suzuki et al., 2009). Dentro del citoplasma de la célula vegetal las proteínas VirE2 protegen el ADN-T unido a VirD2 para evitar que ADN-T monocatenario sea degradado (ver Figura 1) (Suzuki et al., 2009), esta asociación entre las proteínas VirD2 y VirE2 y el ADN-T se le conoce como complejo T y al mismo tiempo esta asociación guía al ADN-T para que pueda entrar al núcleo de la célula vegetal (Citovsky et al., 1992). El paso final de la transformación consiste en la integración del ADN-T en el genoma nuclear de la planta, se ha propuesto que las proteínas VirD2 y VirE2 participan indirectamente en la integración del ADN-T (Dafny-Yelin et al., 2009). Este proceso que ocurre de manera natural se ha usado para transformación genética de plantas, aunque en la actualidad la cepa se ha desarmado y solo se le ha dejado información genética que la bacteria necesita para llevar a cabo la transformación genética de la célula vegetal.

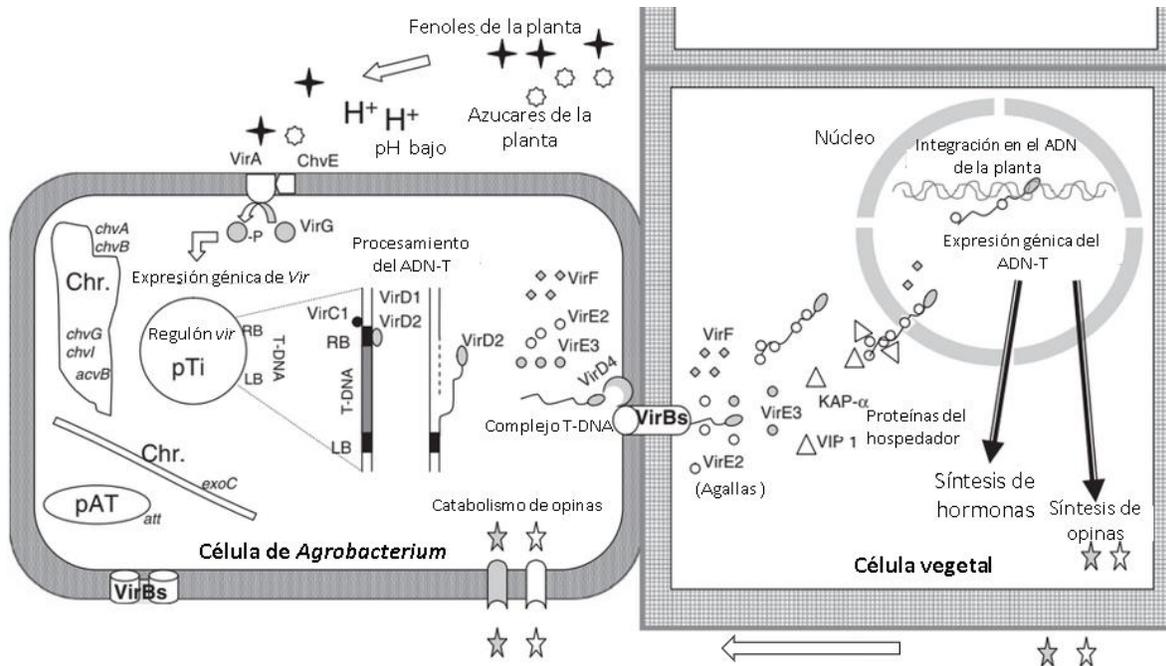


Figura 1. Sistema de infección de *Agrobacterium tumefaciens* (Suzuki et al., 2009).

3.2.3 Vectores binarios

Los plásmidos de *Agrobacterium* han sido explotados ampliamente para la entrega de ADN exógeno al genoma de la planta y tal vez es la metodología más usada en la actualidad. Se han desarrollado dos tipos de vectores, los cointegrados y los binarios. Los vectores binarios tienen varias ventajas sobre los cointegrados en las que se destacan que son más pequeños y por lo tanto son más estables en *E. coli*, además tienen una frecuencia de transferencia de 10,000 veces mayor de *E. coli* a *A. tumefaciens* que los vectores cointegrados (Gruber & Crosby, 1993).

Un vector binario es una herramienta estándar en la transformación de plantas superiores mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, aunque el término se refiere literalmente a todo el sistema que consta de dos replicones, uno para el ADN-T y el otro para los genes de virulencia (Komari et al., 2006). Esto pudo desarrollarse gracias a que los genes de

virulencia los cuales participan en la transferencia del ADN-T podían colocarse en un replicón separado (Hoekema et al., 1983), por lo tanto, la combinación de una cepa "desarmada", que porta un plásmido Ti sin el ADN-T natural, y un ADN-T artificial dentro de un plásmido que puede replicarse tanto en *Escherichia coli* como en *A. tumefaciens* resultó completamente viable y funcional para la transformación de plantas (Komori et al., 2007), esto permitió la transformación exitosa de varias plantas, entre ellas los cereales con importancia comercial (Komari et al., 2006) .

Uno de los primeros vectores binarios fueron el pBin19 y pBin121, posteriormente surgieron otros a los cuales se les hicieron modificaciones con el fin de mejorarlos, del mismo modo un grupo de vectores también tuvieron auge, estos fueron el pPZP y el pCAMBIA que también son ampliamente usados para transformar plantas a través de *agrobacterium*. Estos vectores binarios proporcionan varias características destacables como tener varios sitios de clonación, alto número de copias en *E. coli*, un amplio conjunto de marcadores seleccionables para plantas, y una alta frecuencia de transformación de las plantas (Komori et al., 2007). En la Figura 2, se muestran la estructura básica de un vector binario. La ventaja de estos vectores es que se puede insertar el inserto de interés en el vector y manipularlo en *E. coli* como huésped favorito para la manipulación genética, después este vector se usa para transformar *Agrobacterium* en donde se mantienen como replicones autónomos y finalmente las células vegetales son transformadas con este vector binario y solo el ADN-T es incorporado en el genoma de la célula (An, 1987).

En los últimos 25 años tanto los vectores binarios como las cepas de *A. tumefaciens* se han vuelto más sofisticados y adecuados para fines especializados, también cabe destacar que la utilidad de los vectores binarios fue de gran ayuda porque ya no era necesario el uso

de otras tecnologías complejas para introducir un gen de interés en la región T, sino que ahora podía hacerse en el vector binario y esta construcción podía verificarse en *E. coli* (Lee & Gelvin, 2008).

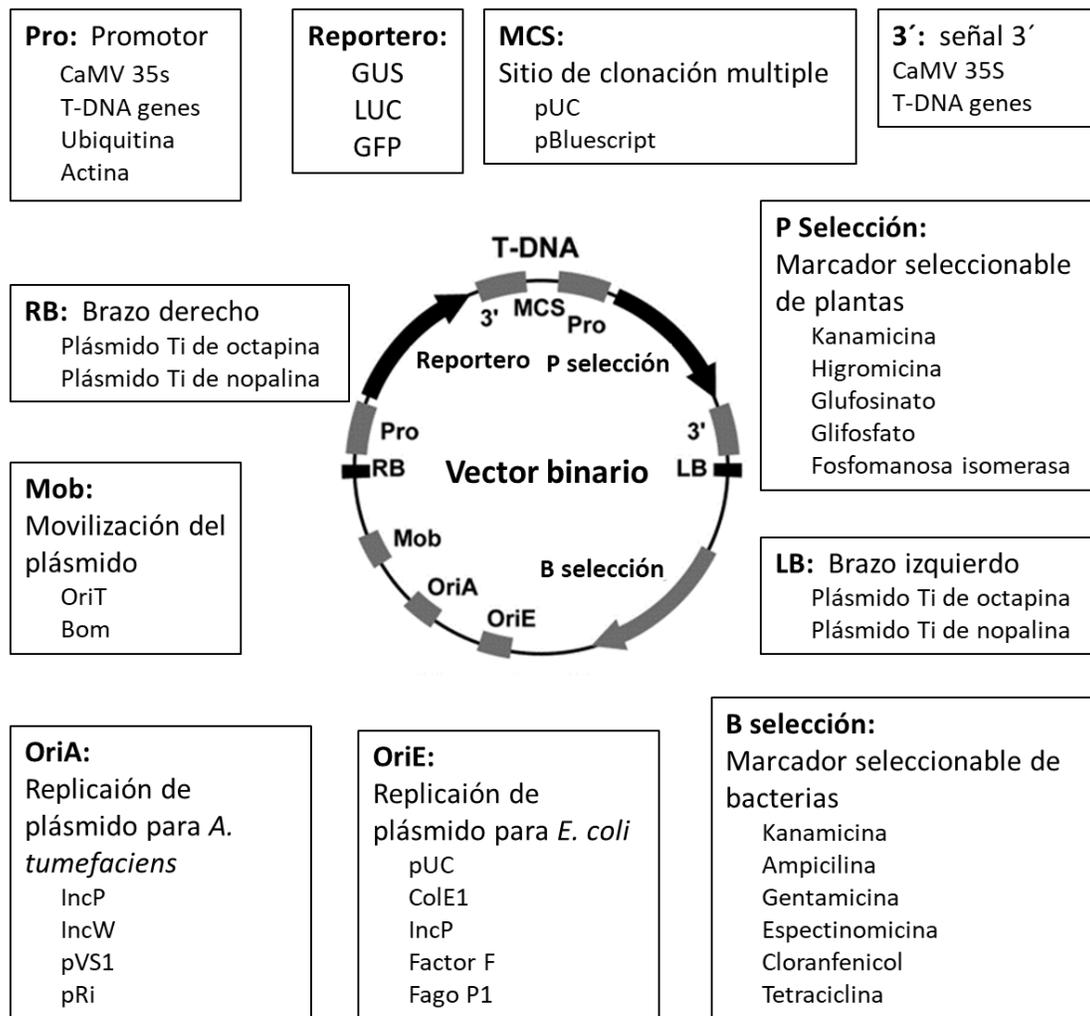


Figura 2. Estructura básica de un vector binario, tomada de (Komori et al., 2007).

3.2.4 Vector pCAMBIA 1301

Los vectores pCAMBIA derivan de los vectores pPZP, se han vuelto populares por su fácil manejo, estabilidad y la existencia de una variedad de genes indicadores y de selección (Leclercq et al., 2015). Además de poseer alto número de copias en *E. coli* y tener estabilidad

en *Agrobacterium*, también proporcionan una alta capacidad de clonación, una compatibilidad mejorada con las cepas de elección, y una alta frecuencia de transformación de las plantas (Komori et al., 2007).

El vector pCAMBIA1301 (Figura 3) fue construido en Australia por organizaciones sin fines de lucro, el vector binario posee el sitio de clonación múltiple pUC18, contiene dos orígenes de replicación, uno para *E. coli* (pBR322) y *Agrobacterium* (pVS1-REP), ambos son esenciales para mantener la estabilidad y el alto número de copias del vector en ambas bacterias (Choi et al., 2019). Contiene la higromicina como marcador de selección en plantas y la kanamicina para bacterias, además posee el gen reporte GUS que puede ser usado para crear fusiones transcripcionales con el gen de interés, aunque también puede ser sustituido por el gen de interés, aprovechando que está bajo la influencia del promotor CAM 35S y el terminador NOS (Andargie et al., 2016; Choi et al., 2019).

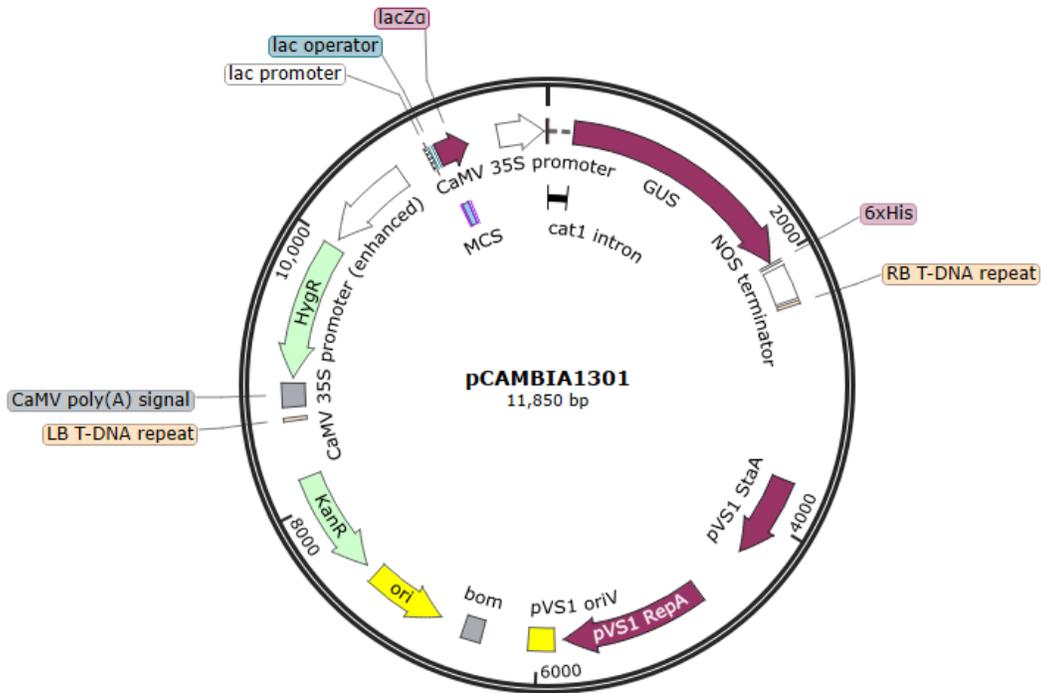


Figura 3. Mapa del vector pCambia1301 y sus componentes.

3.3 Modificación genética de vectores

3.3.1 Métodos para modificar vectores

En los últimos años se han desarrollado varias herramientas para ensamblar un gen de interés dentro de un vector, algunos se basaron en el método tradicional de ligación de fragmentos previamente cortados con enzimas de restricción, otros usaron mecanismos diferentes como la metodología de Gibson (Chao et al., 2015). Lo que se busca en cada método es mejorar la manipulación, propagación y expresión de fragmentos de ADN (Shetty et al., 2008). Estas nuevas estrategias de clonación se dividen en dos categorías principales 1) estrategias que se basan en técnicas de recombinación de ADN específicas de un sitio y 2) estrategias que no dependen de la especificidad de la secuencia, sino que se basa en técnicas de enlaces terminales del ADN. A continuación, se describen algunas de las estrategias.

3.3.1.1 *Golden Gate*

El principio de este método se basa en la capacidad de las enzimas de restricción tipo IIS para cortar fuera del sitio de reconocimiento y produce extremos cohesivos de cuatro nucleótidos arbitrarios (por ejemplo, *BsaI*) (Chao et al., 2015), de esta manera dos fragmentos de ADN flanqueado por sitios de restricción compatibles puedan ser digeridos y ligados sin ninguna dificultad en un mismo tubo de reacción (Bird et al., 2022; Engler & Marillonnet, 2014).

3.3.1.2 *Clonación de extensión de polimerasa circular (CPEC)*

Es un método de clonación de ADN circular simple, eficiente y económico, la reacción se lleva a cabo en un solo tubo y de un solo paso que normalmente dura de 5 a 10 minutos en completarse la clonación, esta técnica se basa en el mecanismo de extensión de la polimerasa para unir fragmentos de ADN superpuestos en forma circular bicatenaria (Quan & Tian, 2014), es ideal para una amplia variedad de aplicaciones, incluidas la clonación de biblioteca de genes, el ensamblaje multidireccional de vías genéticas entre otras aplicaciones más (Quan & Tian, 2009).

3.3.1.3 *Gibson*

Este método consiste en una exonucleasa, una ADN polimerasa de corrección de prueba de alta fidelidad, una ADN ligasa *Taq* y fragmentos de ADN lineales superpuestos, los cuales pueden ser creados por PCR o por digestión con enzimas de restricción, los extremos superpuestos son esenciales para que se lleve a cabo la clonación ya que proporciona las regiones homólogas que serán reconocidas por las enzimas y permitirán unir los fragmentos lineales para formar una molécula de ADN circular (Stewart Jr, 2016). La reacción empieza cuando la exonucleasa degrada los extremos 5' generando extremos

salientes complementarios monocatenarios que posteriormente serán unidos covalentemente por la fusión de la ADN polimerasa y la ADN ligasa *Taq*, esta reacción ocurre en un solo paso a una temperatura de 50°C y ocurre de manera *in vitro* (Chao et al., 2015).

3.3.1.4 Clonación independiente de ligación y secuencia (SLIC).

Este método se basa en el diseño de extremos adhesivos altamente específicos de 20 a 40 pb de homología mediante un diseño riguroso de cebadores y la posterior digestión de los extremos 3' por la ADN polimerasa T4, la cual en ausencia de dNTPs presenta actividad exonucleasa 3'-5' y esto ayuda a la formación de extremos pegajosos (Hill & Eaton-Rye, 2014). Posteriormente, la proteína RecA con ayuda del ATP son usados para facilitar la recombinación antes de usarse para transformar *E. coli* (Chao et al., 2015).

3.3.2 Método de corte y pegado

Durante varias décadas los biólogos moleculares han sobrepasado los límites de la naturaleza al hacer combinaciones a nivel ADN para modificar el material genético de organismos como virus, bacterias, plantas, entre otros más, todo se logró gracias a la tecnología del ADN recombinante, que tuvo sus inicios después del descubrimiento de la ADN ligasa y las endonucleasas de restricción (Gibson, 2011).

La ADN ligasa es una enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos cercanos de los grupos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato en el ADN bicatenario, esta enzima necesita de ATP o NAD y magnesio como cofactores (Tomkinson & Della-María, 2013), para poder formar los enlaces entre los extremos adyacentes de ADN con extremos escalonados o romos, pero la ligasa no puede formar enlaces en los ácidos nucleicos monocatenarios. La T4 ligasa es la enzima comúnmente más usada y se aisló de bacteriófago T4, de ahí su nombre. En la actualidad esta enzima se obtiene de manera recombinante

(Karcher, 1995). Generalmente el ADN que la ligasa une viene de ser cortado con enzimas de restricción de tipo II, estas enzimas tienen la capacidad de reconocer generalmente secuencias palindrómicas específicas de ADN bicatenario y cortarlo. Las enzimas de restricción realizan dos tipos de cortes, uno es el corte escalonado el cual se subdivide en dos, dependiendo si el extremo saliente es 5' o 3', como se muestra en la Figura 4a). El otro tipo de corte es el romo, este no genera extremos salientes, ver Figura 4b) (Castro, 2005).

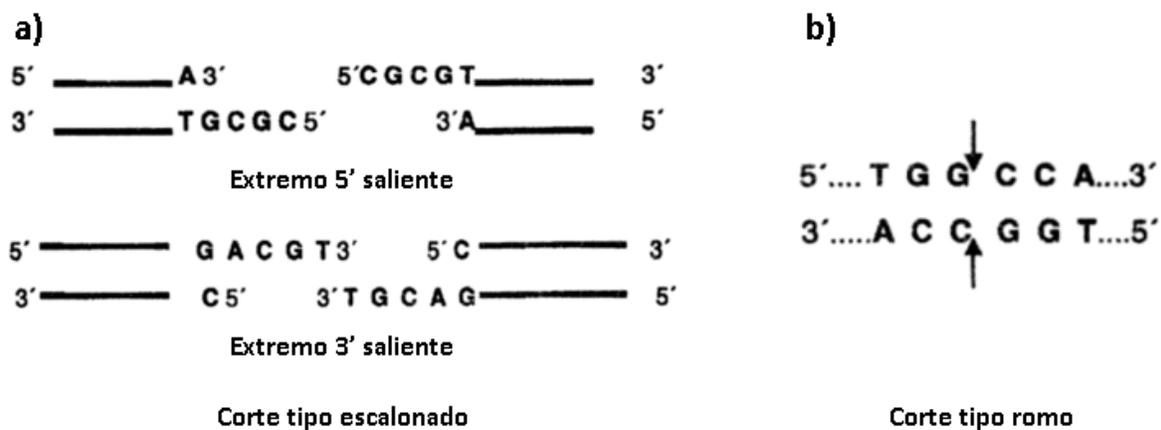


Figura 4. Tipos de cortes escalonados tomada de (Castro, 2005).

Tanto las enzimas de restricción tipo II, así como la ADN ligasa han permitido el desarrollo de una técnica de clonación estándar que se ha explotado por varias décadas en biología molecular (Chao et al., 2015). Para poder llevar a cabo una reacción de ligación primero se debe seleccionar el ADN que tenga los sitios restrictivos puede ser ADN genómico o proveniente de una PCR, después se realiza el corte para generar los extremos compatibles, posteriormente se purifica y cuantifica la muestra y finalmente se hace la ligación, el producto resultante puede ser usado para una transformación (Cost, 2007). Una de las ventajas de este método es la comprobación en cada uno de los pasos, sin embargo, una de las desventajas es que solo se puede insertar un gen a la vez y debe ser más pequeño en relación con el vector.

IV. Materiales y métodos

4.1 Extracción del vector pBSK-CcV1

4.2 Transformación de *E. coli* Dh5 α con el vector pBSK-CcV1

Para la transformación se utilizó la cepa de *E. coli* Dh5 α quimio-competente y se utilizó el método de choque térmico, el cual consiste de los siguientes pasos: primero se agregaron 1 μ L del vector pBSK-CcV1 y 100 μ L de células calcio-competentes en un tubo de 1.5 mL. Se colocó en hielo durante 30 minutos, posteriormente se incubó a 42° C por 30 segundos, nuevamente se colocó en el hielo por 5 minutos, una vez realizado el choque térmico se procedió a agregar 1 mL de medio LB (Luria Broth) y se dejó incubar por dos horas a 37° C a 200 rpm (revoluciones por minuto). Transcurridas las dos horas se procedió a sembrar las células transformadas en cajas Petri con medio agar-LB , suplementado con ampicilina (50 mg/mL). Una vez terminada la siembra las placas se dejaron creciendo 12 horas a 37° C.

4.3 Purificación del vector pBSK-CcV1

Una vez realizada la transformación se obtuvieron colonias, de estas colonias solo se tomó una y se sembró en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina (50 mg/mL) y se dejó creciendo 12 horas a 37° C a 200 rpm. Transcurrido el paso anterior se procedió a hacer la extracción de ADN plasmídico con el estuche comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega, el cual primero consistió en centrifugar 5 mL del cultivo bacteriano a 4,000 rpm por 5 minutos para luego descartar el sobrenadante y agregar 250 μ L de la solución de resuspensión, con ayuda de un agitador tipo vortex se resuspendió la pastilla formada, la mezcla fue transferida a un microtubo de 1.5 mL en donde se le agregaron 250 μ L de la solución de lisis, se mezcló por inversión por 4 veces y se dejó incubando a

temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de añadieron 10 μL de la solución de proteasas alcalinas, nuevamente se mezcló por inversión 4 veces y se incubo a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente fueron añadidos 350 μL de la solución de neutralización y se mezcló cuatro veces por inversión, inmediatamente se sometió a una centrifugación a 14,000 rpm por 10 minutos, después se transfirió un volumen de 850 μL de la fase acuosa a la columna previamente ensamblada en un tubo de recolección y se centrifugo a 14,000 rpm por 1 minuto, después se decantó lo del tubo de recolección y se realizaron dos lavados con la solución de lavado de columna (diluida con etanol al 95 %), en el primer lavado se añadieron 750 μL y se centrifugo a 14,000 rpm por un minuto a temperatura ambiente, mientras que en el segundo lavado se añadieron 250 μL de la misma solución y se centrifugo a 14,000 rpm por dos minutos a temperatura ambiente, una vez realizados los dos lavados se tomó la columna y se ensambló en un microtubo de 1.5 mL y se agregaron 80 μL de agua libre de nucleasas, esto se centrifugo a 14,000 rpm por un minuto a temperatura ambiente, después la columna fue desechada y el ADN plasmídico resuspendido en el microtubo se usó para hacer una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %, a un voltaje constante de 80 Volts y se visualizó en un fotodocumentador AxygenTM para verificar la extracción.

4.4 Amplificación del gen CcV1

Se realizo una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para verificar que el gen CcV1 estuviera presente en el vector pBSK-CcV1, los cebadores utilizados fueron NCOCC y BSTCC ver Tabla 1, se utilizó el estuche comercial Gotaq green master mix de Promega se usó un termociclador Axygen® MaxyGene II, en la Tabla 2 se muestran los componentes de la reacción, mientras que en la Tabla 4 se muestra el programa de la reacción.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores NCOCC y BSTCC.

Nombre	Secuencia	Tm
NCOCC	5' AttCcatggATGCCACCAACAAACGACTT 3'	64° C
BSTCC	5'ATTGGTCACCCTAAGAAATTGATGAGAAATGAGTT 3'	61° C

Tabla 2. Componentes de la reacción de PCR del gen CcV1.

Componentes	Volumen
Agua MQ	4.5 µL
pBSK-CcV1	1 µL
Primer 1 (10 µM)	1 µL
Primer 2 (10 µM)	1 µL
Gotaq green master mix	12.5 µL
Volumen final	25 µL

4.5 Diseño de cebadores con adaptadores

El diseño de los cebadores con adaptadores para amplificar el gen CcV1 fue con ayuda del software SnapGene.

Los cebadores NCOCC y BSTCC se diseñaron para que únicamente amplifiquen el gen CcV1, además, se les añadieron los sitios restrictivos para las enzimas *NcoI* y *BstEII* en los extremos 5'.

4.6 Amplificación de *NCOI-CcV1-BSTEII*

El gen CcV1 fue amplificado mediante una reacción en cadena de la polimerasa de alta fidelidad, en donde los cebadores NCOCC y BSTCC fueron añadidos en la reacción y el tubo de la reacción se metió en un termociclador Axygen® MaxyGene II.

El tubo de la reacción de PCR contenía ambos cebadores (directo e inverso), el vector pBSK-CcV1, dNTPs y la enzima de 50X Advantage-HF 2 Polymerase Mix, todo esto se llevó a un volumen final de 50 μ L ver Tabla 3. El programa de la PCR se muestra en la Tabla 4.

Los productos resultantes de la PCR fueron verificados mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % a un voltaje constante de 80 V y se visualizó en un fotodocumentador Axygen™.

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR para amplificar el fragmento *NcoI-Ccv1-BstEII*.

Componentes	Volumen
H ₂ O grado-PCR	6 μ L
10X HF 2 PCR Buffer	5 μ L
pBSK-CcV1	1 μ L
Primer 1 (10 μ M)	1 μ L
Primer 2 (10 μ M)	1 μ L
10X HF 2 dNTP Mix	5 μ L
50X Advantage-HF 2 Polymerase Mix	1 μ L
Volumen final	20 μL

Tabla 4. Programa de PCR para amplificar *NcoI*-CcV1-*Bst*II.

Pasos	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94	30 s	
Alineamiento	62	30 s	30 ciclos
Extensión	72	30 s	
Extensión	72	10 min	1 ciclo

4.7 Purificación del producto de PCR

El producto de PCR obtenido se purificó usando el estuche comercial Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System de Promega, para lo cual primero se añadió un volumen igual al producto de PCR de la solución de membrane binding, esto se mezcló con ayuda de un mezclador tipo vortex, posteriormente la mezcla fue transferida a una columna previamente ensamblada en un tubo de recolección y se dejó incubar a temperatura ambiente por un minuto, después fue centrifugado a 14,000 rpm por 1 minuto, se decantó lo del tubo de recolección y se realizaron dos lavados con membrane wash solution (diluida con etanol al 95 %), en el primer lavado se añadieron 700 µL y se centrifugó a 14,000 rpm por un minuto, mientras que en el segundo lavado se añadieron 500 µL de la misma solución y se centrifugó a 14,000 rpm por un minutos a temperatura ambiente, al final de los lavados se realizó una centrifugación extra con el objetivo de evaporar el etanol, una vez realizados los dos lavados se tomó la columna y se ensambló en un microtubo de 1.5 mL y se agregaron 100 µL de agua libre de nucleasas, esto se centrifugó a 14,000 rpm por un minuto, después la columna fue desechada y el ADN resuspendido en el microtubo se usó para hacer una electroforesis en un

gel de agarosa al 0.8 % y se visualizó en un fotodocumentador Axygen™ para verificar la extracción.

4.8 Restricción del producto de PCR *NcoI*-CcV1-*BstEII*

El gen CcV1 previamente amplificado fue cortado con la enzima *NcoI* (C[^]CATGG) del estuche comercial Takara (especificaciones ver Tabla 5), esta fue la primera enzima usada para generar el fragmento *NcoI*-CcV1-*BstEII*. La reacción de digestión fue incubada a 37° C por una hora, en la Tabla 7 se muestran los componentes de la reacción.

Tabla 5. Mezcla de reacción general para la enzima *NcoI*.

Componentes	Volumen
<i>NcoI</i>	1 µL
Buffer 10X K	2 µL
BSA 0.1 %	2 µL
Sustrato de ADN	≤ 1 µg
Agua purificada estéril	Aforar hasta 20 µL
Temperatura de reacción	37° C
Tiempo de incubación	1 hora

El producto de la digestión se purificó por columnas usando el estuche comercial Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System de Promega, siguiendo los pasos descritos anteriormente y fue visualizado mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % a un voltaje constante de 80 V.

Una vez que se visualizó se procedió a realizar el siguiente corte con la enzima *BstEII* (G[^]GTNACC) del estuche comercial Thermoscientific especificaciones ver Tabla 6. La reacción se dejó incubando a 37° C durante 16 horas, en la Tabla 8 se describen a detalle los componentes de la reacción.

Tabla 6. Mezcla de reacción general para la enzima *BstEII*.

Componente	Volumen
<i>BstEII</i>	0.5-2 µL
Buffer 10X 0	2 µL
DNA (0.5-1 µg/µL)	1 µL
Agua libre de nucleasas	16 µL
Temperatura de incubación	37° C
Tiempo de incubación	1-16 horas

El producto de la digestión con la enzima *BstEII* fue visualizado mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % a un voltaje constante de 80 V.

Tabla 7. Componentes de la reacción de digestión de *NCOI-CcV1-BSTEII* usando la enzima *NcoI*.

Componentes	Volumen
ADN	9 μ L
10X buffer	2 μ L
<i>NcoI</i>	1 μ L
Agua libre de nucleasas	8 μ
Volumen final	20 μL

Tabla 8. Componentes de la reacción de digestión de *NCOI-CcV1-BSTEII* usando la enzima *BstEII*.

Componentes	Volumen
ADN	12 μ L
10X Buffer	2 μ L
<i>BstEII</i>	1 μ L
Agua libre de nucleasas	5 μ L
Volumen final	20 μL

4.9 Purificación del producto *NcoI-CcV1-BstEII*

Realizados los dos cortes con ambas enzimas, el producto fue purificado por columnas usando el estuche comercial Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System de

Promega, siguiendo los pasos descritos anteriormente y fue visualizado mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % a un voltaje constante de 80 V.

4.10 Extracción del vector pCAMBIA1301

4.11 Transformación de *E. coli* Dh5 α con el vector pCAMBIA1301

Para la transformación se utilizó la cepa de *E. coli* Dh5 α quimio-competente. La cual fue transformada con el método de choque térmico, el cual consiste de los siguientes pasos: primero se agregaron 1 μ L del vector pCAMBIA1301 y 100 μ L de células calcio-competentes en un tubo de 1.5 mL. Se colocó en hielo durante 30 minutos, posteriormente se incubó a 42° C por 30 segundos, nuevamente se colocó en el hielo por 5 minutos, una vez realizado el choque térmico se procedió a agregar 1 mL de medio LB y se dejó incubar por dos horas a 37° C a 200 rpm (revoluciones por minuto). Transcurridas las dos horas se procedió a sembrar las células transformadas en cajas Petri con medio LB más agar, dicho medio contenía kanamicina (50 mg/mL). Una vez terminada la siembra las placas se dejaron creciendo toda la noche a 37° C.

4.12 Purificación del vector pCAMBIA1301

Una vez realizada la transformación se obtuvieron colonias, de estas colonias se tomó una y se sembró en 5 mL de medio LB líquido con kanamicina (50 mg/mL) y se dejó creciendo 12 horas a 37° C a 200 rpm. Transcurrido el paso anterior se procedió a hacer la extracción de ADN plasmídico con el estuche comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega, el cual primero consistió en centrifugar 5 mL del cultivo bacteriano a 4,000 rpm por 5 minutos para luego descartar el sobrenadante y agregar 250 μ L de la solución de resuspensión, con ayuda de un vortex se resuspendió la pastilla formada, la mezcla fue transferida a un microtubo de 1.5 mL en donde se le agregaron 250 μ L de la

solución de lisis, se mezcló por inversión 4 veces y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de añadieron 10 μL de la solución de proteasas alcalinas, nuevamente se mezcló por inversión 4 veces y se incubo a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente fueron añadidos 350 μL de la solución de neutralización y se mezcló cuatro veces por inversión, inmediatamente se sometió a una centrifugación a 14,000 rpm por 10 minutos, después se transfirió un volumen de 850 μL de la fase acuosa a la columna previamente ensamblada en un tubo de recolección y se centrifugo a 14,000 rpm por 1 minuto, después se decantó el tubo de recolección y se realizaron dos lavados con la solución de lavado de columna (diluida etanol al 95 %), en el primer lavado se añadieron 750 μL y se centrifugo a 14,000 rpm por un minuto a temperatura ambiente, mientras que en el segundo lavado se añadieron 250 μL de la misma solución y se centrifugo a 14,000 rpm por dos minutos a temperatura ambiente, una vez realizados los dos lavados se tomó la columna y se ensambló en un microtubo de 1.5 mL y se agregaron 80 μL de agua libre de nucleasas, esto se centrifugo a 14,000 rpm por un minuto a temperatura ambiente, después la columna fue desechada y el ADN plasmídico resuspendido en el microtubo se usó para hacer una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % a un voltaje constante de 80 V y se visualizó en un fotodocumentador AxygenTM para verificar la extracción .

4.13 Restricción del vector pCAMBIA1301 con las enzimas *NcoI*- *BstEII*

De la misma manera que el gen CcV1, el vector pCAMBIA1301 fue primero digerido con la enzima *NcoI* (C[^]CATGG) del estuche comercial Takara (especificaciones ver Tabla 5). La reacción de digestión fue incubada a 37° C por una hora, en la Tabla 9 se muestran los componentes de la reacción.

El producto de la digestión se purificó por columnas usando el estuche comercial Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System de Promega, siguiendo los pasos descritos anteriormente y fue visualizado mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % a un voltaje constante de 80 V.

Una vez que se visualizó se procedió a realizar el siguiente corte con la enzima *BstEII* (G[^]GTNACC) del estuche comercial Thermoscientific especificaciones ver Tabla 6. La reacción se dejó incubando a 37° C durante 16 horas, en la Tabla 10 se describen a detalle los componentes de la reacción.

Tabla 9. Componentes de la reacción de digestión del vector pCAMBIA1301 usando la enzima *NcoI*.

Componentes	Volumen
ADN	15 µL
10 x Buffer	2 µL
<i>NcoI</i>	1 µL
Agua MQ	2 µL
Volumen final	20 µL

Tabla 10. Componentes de la reacción de digestión del vector pCAMBIA1301 usando la enzima *BstEII*.

Componentes	Volumen
ADN	15 μ L
10X Buffer	2 μ L
<i>BstEII</i>	1 μ L
Agua MQ	2 μ L
Volumen final	20 μL

4.14 Purificación del vector *NcoI*-pCAMBIA1301-*BstEII*

El vector digerido con ambas enzimas fue purificado por columnas usando el estuche comercial Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System de Promega, siguiendo los pasos descritos anteriormente y fue visualizado mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % a un voltaje constante de 80 V.

4.15 Ligación

Para poder ligar el gen CcV1 y el vector pCAMBIA1301, ambos fragmentos digeridos con las mismas enzimas, se usó la T4 ADN ligasa de Promega. Se realizaron tres experimentos tomando en cuenta la relación molar de inserto-vector, las reacciones de ligación se dejaron incubando a 4° C toda la noche, en la Tabla 11 se muestran los tres experimentos más a detalle.

Tabla 11. Componente de la ligación de CcV1 y pCAMBIA1301.

Relación	1:1 (Exp. A)	1:3 (Exp. B)	3:1 (Exp. C)
Vector	1 μ L	1 μ L	3 μ L
Inserto	1 μ L	3 μ L	1 μ L
Buffer 10x	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Ligasa	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Agua MQ	6 μ L	4 μ L	4 μ L
Volumen final	10μl	10μl	10μl

4.16 Transformación de *E. coli* Dh5a

Se realizaron tres transformaciones de acuerdo las tres reacciones de ligación, también se agregó agua (control negativo) y el vector pCAMBIA1301 (control positivo). Las transformaciones se realizaron usando el método de choque térmico descrito anteriormente. La única modificación fue que se usó todo el volumen de la ligación (10 μ L) para transformar las células quimio-competentes.

Las células fueron sembradas en cajas Petri con medio LB más agar, dicho medio contenía kanamicina (50 mg/mL). Una vez terminada la siembra las placas se dejaron creciendo toda la noche a 37° C.

4.17 Selección de colonias por PCR

De las colonias obtenidas se seleccionaron 40 colonias del experimento B para realizar una PCR y verificar la construcción, se usó el estuche comercial Gotaq green master

mix de Promega, los cebadores usados fueron pBinNostF y pBinNostR Tabla 12, el programa usado fue el que se muestra en la Tabla 13.

Tabla 12. Componentes de la PCR en colonia.

Componentes	Volumen
H ₂ O	2 µL
ADN	1 µL
Primer 1 (10 µM)	1 µL
Primer 2 (10 µM)	1 µL
2x Go taq Master mix	5 µL
Volumen final	10 µl

Tabla 13. Programa de PCR de los cebadores pBinNostF y pBinNostR usados para verificar la construcción pCAMBIA-CcV1.

Pasos	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94	30 s	
Alineamiento	51	30 s	30 ciclos
Extensión	72	45 s	
Extensión	72	10 min	1 ciclo

De las colonias que resultaron positivas se seleccionaron 10, y fueron sembradas en 5 mL de medio LB con kanamicina (50 mg/mL) y se dejaron creciendo 12 horas a 37° C. Obtenido el crecimiento bacteriano, se procedió a extraer el vector usando el estuche comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega, posteriormente se realizó otra PCR con los vectores purificados usando los cebadores pBinF y pBinR, solo fueron tomadas las muestras 1, 2, 3 y 10 más el vector pCAMBIA1303 y agua MQ como controles negativos, se usó el estuche comercial Gotaq green master mix de Promega, los componentes de la reacción se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Componentes de la reacción de PCR de comprobación.

Componentes	Volumen
H ₂ O	2 µL
ADN	1 µL
Primer 1 (10 µM)	1 µL
Primer 2 (10 µM)	1 µL
2x Go taq Master mix	5 µL
Volumen final	10 µl

4.18 Secuenciación

Solo se seleccionaron las muestras 1, 2, y 3 y se prepararon para mandar a secuenciar al Laboratorio de Servicios Genómicos del LANGEBIO empleando los cebadores Pbinnost y Rseqccv.

4.19 Alineamiento de contigs de las secuencias.

Con ayuda del programa SnapGene se analizaron las secuencias amplificadas en la secuenciación con los cebadores Pbinnost y RseqCcv1, (Tabla 15) mediante los alineamientos contigs, para poder determinar si la dirección de la secuencia insertada era la correcta, así como si estaba entre el promotor CAMV 35S y el terminador NOS.

Tabla 15. Secuencia de los cebadores Pbinnost y RseqCcv1.

Nombre	Secuencia	Tm
RseqCcv1	5' CGATCGATCCAGGTCGACCG 3'	61° C
Pbinnost	5'GTTAATTATTACATGCTTAACG 3'	51° C

V. Resultados

5.1 Obtención de ADN

La extracción con el estuche comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega, permitió la purificación del vector pBSK-CcV1 ver Figura 5, mientras que la PCR del gen CcV1 utilizando los cebadores SNCOCCV y BSTECC y al vector pBSK-CcV1 como DNA permitió la amplificación del gen, lo que demuestra que la construcción pBSK-CcV1 está bien hecha, ver Figura 6.

Mientras que la PCR con los mismos cebadores, pero con los adaptadores para los sitios restrictivos para las enzimas de restricción *NcoI* y *BstEII* amplificó el gen más los sitios restrictivos, esto nos demuestra que el diseño de los cebadores fue correcto para amplificar el gen CcV1, se puede ver en la Figura 7, en donde la banda corresponde al tamaño esperado (1261 pb).

Para la extracción del vector pCAMBIA1301, también se logró extraer utilizando el estuche Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega, mediante una electroforesis se corroboró, en donde la banda del carril 2 nos permite ver el producto de la purificación (Figura 7).

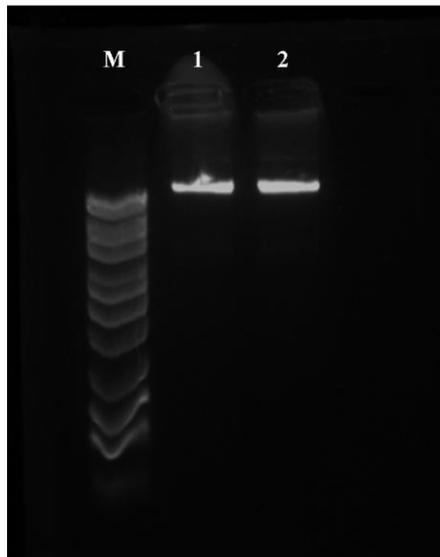


Figura 5. Electroforesis de la extracción mediante el estuche comercial de Promega del vector pBSK-CcV1.

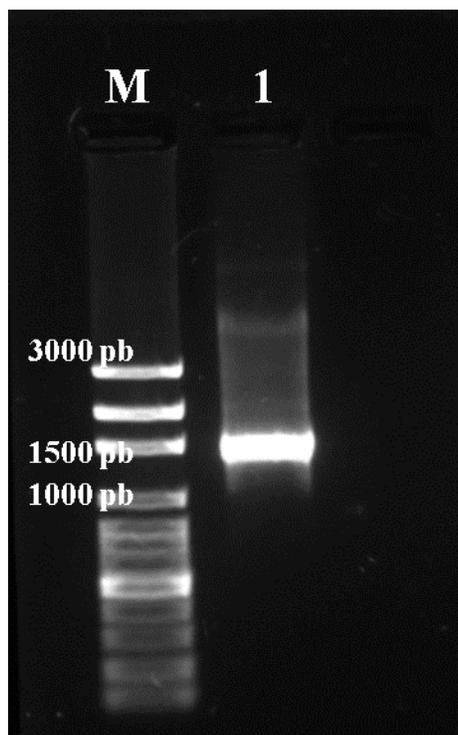


Figura 6. PCR de prueba del gen CcV1 con los cebadores SNCOCCV y BSTECC (carril 1), M: marcador de peso molecular 100 pb Axygen.

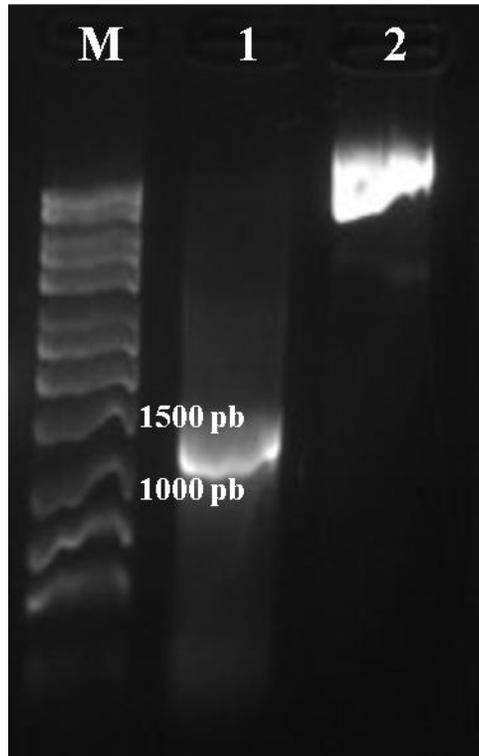


Figura 7. Electroforesis del amplicón *NcoI*-CcV1-*BstEII* y el vector pCAMBIA1301 (carril 1 y 2 respectivamente).

5.2 Digestión con las enzimas *NcoI* y *BstEII*

Los dos fragmentos fueron digeridos con las enzimas *NcoI* y *BstEII* dejando extremos pegajosos complementarios ya que se cortaron con las mismas enzimas, en el caso del vector pCAMBIA1301 se usaron estas dos enzimas porque delimitan al gen GUS y al His tag affinity, esta digestión deja un espacio entre el promotor CAMV 35S y el terminador NOS, es aquí donde se va a introducir el gen CcV1.

Las bandas obtenidas corresponden al tamaño esperado, en la Figura 8 se muestra la electroforesis de los dos fragmentos, en el carril 1 se muestra la banda que representa al vector pCAMBIA1301 cortado y tiene un tamaño de 9789 pb, el vector ya no cuenta con el fragmento GUS-His tag que tiene un tamaño de 2023 pb. En el carril 2 se muestra el gen

CcV1 cortado, el tamaño es de 1261 pb y es el esperado. Ambos fragmentos fueron purificados por columnas después de realizar los dos cortes, en la Figura 9 se muestran los productos purificados del gen CcV1 y del vector pCAMBIA1301.

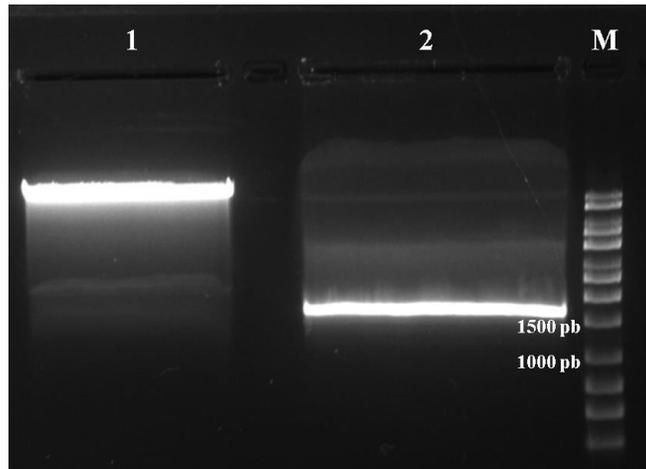


Figura 8. Electroforesis del pCAMBIA1301 y del producto de PCR *NcoI*-CcV1-*BstEII*, digeridos con *NcoI* y *BstEII*. Carril M: marcador de peso molecular de 1Kb de Axygen, carril 1 pCAMBIA1301 digerido con *NcoI* y *BstEII*, carril 2 *NcoI*-CcV1-*BstEII* digerido con *NcoI* y *BstEII*.

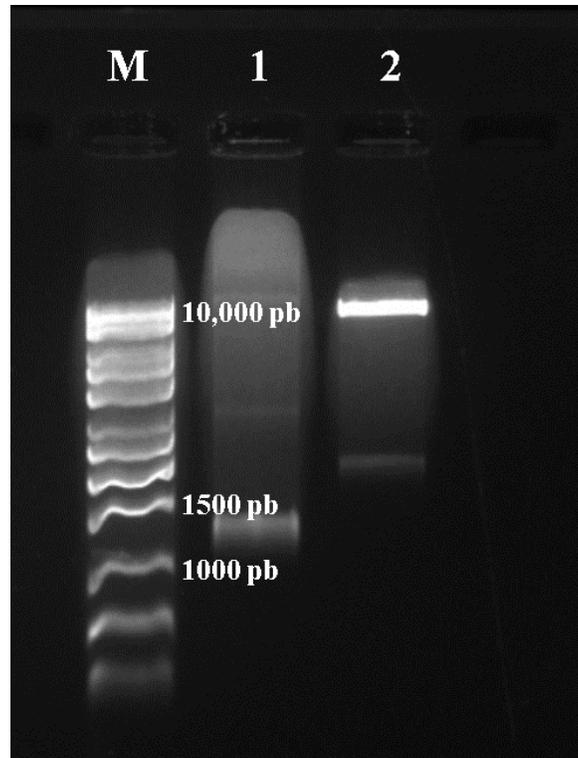


Figura 9. Producto de purificación en gel de CcV1 y pCAMBIA1301 tratados con las enzimas de restricción *NcoI* y *BstEII*. El carril 1 corresponde a CcV1, el carril 2 pertenece a el vector pCAMBIA1301 y M representa el marcador de peso molecular 1Kb Axygen.

5.3 Ligación

Los 10 μ L de las reacciones de ligación fueron usados para transformar la cepa de *E. coli* Dh5 α , por choque térmico, posteriormente se puso a crecer en cajas Petri con medio selectivo. En la ligación se realizaron tres experimentos y todos se usaron para transformar a *E. coli*. Se obtuvieron muchas colonias en los tres experimentos.

5.4 PCR de comprobación

Una vez que se obtuvieron las colonias se procedió a realizar una comprobación de las colonias mediante PCR en colonia, fueron seleccionadas 40 colonias y se usaron

cebadores que flanquean una parte del promotor CAMV 35S y del terminador NOS, esto con el objetivo de poder seleccionar las colonias positivas que poseen el gen CcV1.

En la Figura 10 se muestra la electroforesis de 38 muestras y en todas se puede observar la banda esperada que es del gen CcV1 más el promotor CAMV 35S y el terminador NOS.

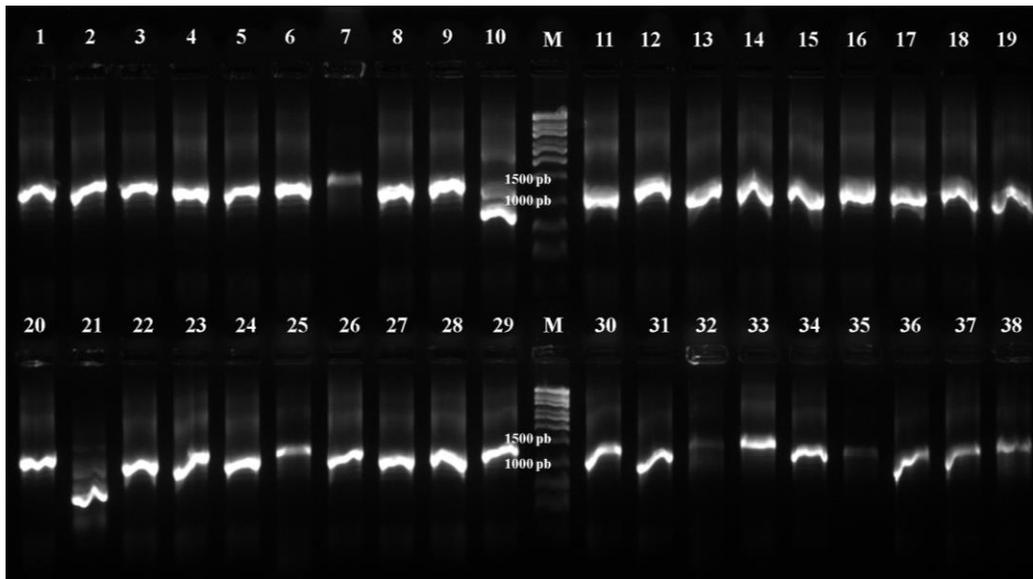


Figura 10. Corrimiento electroforético de la PCR en colonia, utilizando los cebadores pbinNostF y pbinNostR.

Se realizó otra verificación con otros cebadores para tener mayor certeza de que la construcción estuviera bien hecha, de las 38 muestras que se observan en la Figura 10, se seleccionaron 10 colonias para hacer la extracción del ADN plasmídico Figura 11, solo las muestras 1, 2, 3 y 10 fueron seleccionadas para realizar otra PCR, se agregó el vector pCAMBIA1301 nativo y el agua como controles negativos, en la Figura 12 se muestran las bandas correspondientes a las colonias positivas, también se observa que ambos controles

son negativos, para el caso de vector pCAMBIA1301 nativo no cuenta con los sitios de hibridación de los cebadores, por lo tanto no amplifico la PCR.

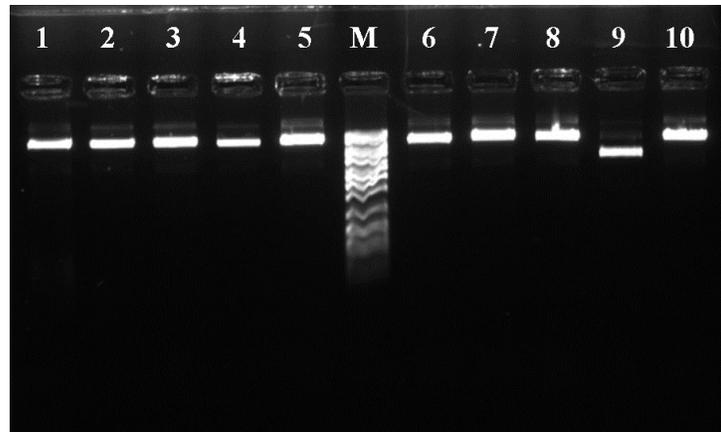


Figura 11. Purificación del AND plasmídico mediante el estuche comercial de Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega de la construcción de las 10 colonias seleccionadas.

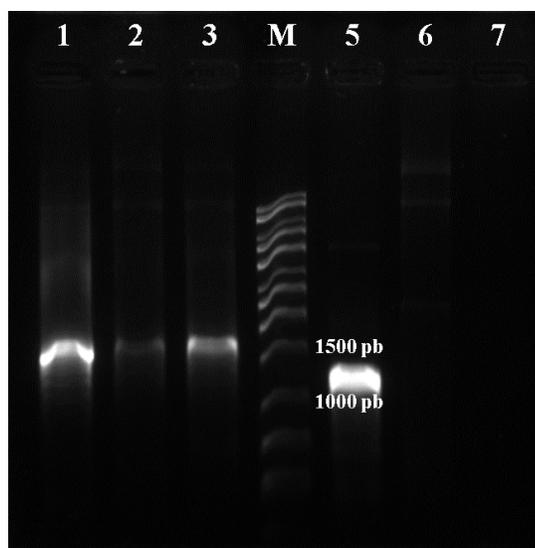


Figura 12. PCR con los cebadores pBinF y pBinR de las muestras 1, 2, 3 y 10 y de los controles negativos (pCAMBIA1301 nativo y agua). Las muestras del vector pCAMBIA1301-CcV1 se muestran en los carriles 1, 2, 3 y 5, mientras que los controles están en los carriles 5 y 6, M corresponde al marcador de peso molecular de 1kb de Axigen.

5.5 Secuenciación

Se obtuvieron las secuencias que corresponden a cada cebador del gen CcV1, en la Figura 13 se observa que las secuencias generadas cubren la mayor parte de la secuencia del gen. El cebador pBinnost muestra la cobertura del gen en la parte del final, abarcando el sitio de corte para la enzima *BstEII* (Figura 14), mientras que el cebador RseqCcV1 tiene una cobertura del sitio restrictivo para la enzima *NcoI* que está en el inicio del gen CcV1 Figura 15. Esto nos demuestra que el gen CcV1 se insertó de manera correcta en el vector pCAMBIA1301.

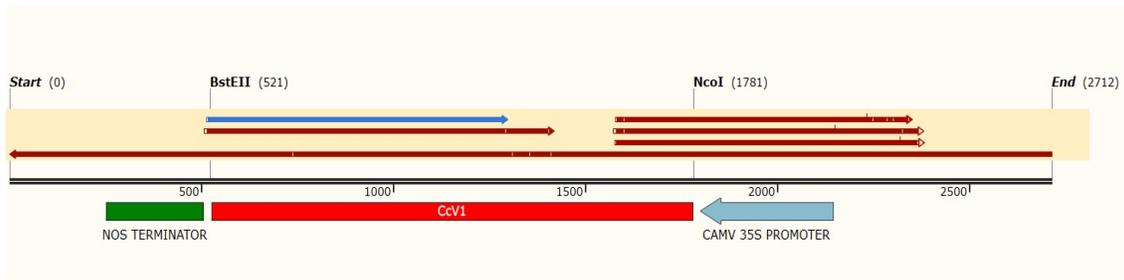


Figura 13. Alineamiento de las secuencias obtenidas y el constructo esperado.



Figura 14. Secuencia obtenida con el cebador pBinnost.

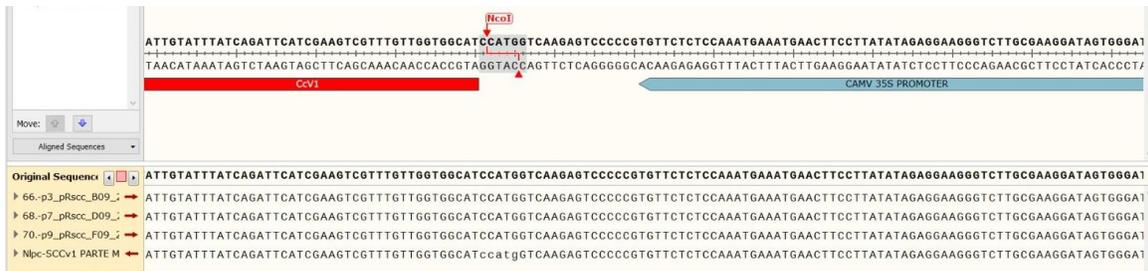


Figura 15. Secuencia obtenida con el cebador RseqCcV1.

VI. Discusión

En este trabajo se logró la inserción del gen CcV1 en el vector pCAMBIA1301, el cual es un vector binario para plantas, el gen CcV1 proviene de *Cotesia congregata* y tiene la función inmunosupresora en lepidópteros. La metodología empleada fue a través de enzimas de restricción y una ADN ligasa, este método es uno de los más empleados, a pesar de ser muy laborioso ya que implica de muchos pasos, pero una de las ventajas es poder hacer la comprobación de cada paso para poder monitorear cada experimento y de esta manera tomar una decisión si continuar con el siguiente experimento.

Cada vez que se realizó PCR, purificación de ADN o se hizo corte con enzimas se verifico mediante una electroforesis en gel de agarosa, en donde se analizaron parámetros como la calidad y concentración del ADN, además que la banda correspondiera al fragmento esperado, esto permitió decidir si era conveniente seguir con los pasos posteriores hasta la construcción del vector pCAMBIA1301-CcV1.

La construcción obtenida se comprobó mediante PCR con cebadores específicos que se hibridan en el vector, pero que al momento de hacer la amplificación nos permite corroborar si se encuentra el gen CcV1, el tamaño de la banda esperado corresponde a 1270 pb, mientras que, si en el vector no se insertó el gen CcV1, se espera observar una banda de 2023 pb que corresponde al gen GUS.

La direccionalidad del gen insertado fue corroborada mediante PCR, en donde los cebadores usados fueron diseñados para amplificar los extremos del gen que corresponden a una parte del promotor CAMV 35 S y al terminador NOS, de esta manera se puede verificar la direccionalidad del gen, estos cebadores se usaron para mandar a secuenciar las muestras

y poder hacer un análisis de secuencias y verificar que el marco de lectura del gen no este modificado.

Para obtener una mayor cobertura del gen CcV1, se diseñaron cebadores que se hibridan en los extremos y en la parte intermedia del gen y también fueron usados para la secuenciación y poder tener una mayor certeza de la secuencia de todo el gen, además de poder encontrar alguna mutación que pudiera tener un efecto negativo para el gen. Los cebadores usados incluyen desde el promotor hasta el terminador lo que nos permite corroborar que el gen está insertado bajo la influencia del promotor CAMV 35 S y el terminador NOS, el promotor es constitutivo lo que permite la expresión de genes en varias especies de plantas dicotiledóneas (Benfe y & Chua, 1990; Kay et al., 1987).

Esta construcción puede emplearse para la transformación genética de plantas usando *Agrobacterium*. Esta construcción posee el gen CcV1 que tiene la función inmunosupresora en lepidópteros, por lo tanto, puede usarse para la transformación genética de otras plantas que son afectadas por plagas de lepidópteros.

VII. Conclusión

Se logro la obtención del gen CcV1 mediante la amplificación por PCR, en donde se le agregaron los sitios de reconocimiento para las enzimas *NcoI* y *BstEII*, posteriormente se purifico y se ligó con el vector pCAMBIA1301 bajo la influencia del promotor CAMV 35 S y el terminador NOS. La construcción fue verificada mediante PCR en colonia en donde los cebadores usados fueron diseñados para hibridar en el vector, para corroborar la construcción se diseñaron cebadores que permitieran ver la orientación del gen y que nos permitió verificar que el gen esta insertado en la orientación correcta. Esta construcción se puede usar para la transformación genética de plantas basado en el método por *Agrobacterium*, aunque se debe evaluar la eficiencia de la expresión del gen en otras especies.

VIII. Bibliografia

- Abdul Aziz, M., Brini, F., Rouached, H., & Masmoudi, K. (2022). Genetically engineered crops for sustainably enhanced food production systems. *Frontiers in Plant Science*, *13*.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1027828>
- Altieri, M. A., & Nicholls, C. I. (1998). Biological control in agroecosystems through management of entomophagous insects. *Critical Issues in Pest Management*. Commonwealth Publishers, New Delhi, 67–86.
- Amaya, K. E., Asgari, S., Jung, R., Hongskula, M., & Beckage, N. E. (2005). Parasitization of *Manduca sexta* larvae by the parasitoid wasp *Cotesia congregata* induces an impaired host immune response. *Journal of Insect Physiology*, *51*(5), 505–512.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.11.019>
- An, G. (1987). [17] Binary ti vectors for plant transformation and promoter analysis. In *Methods in Enzymology* (Vol. 153, pp. 292–305). Academic Press.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)53060-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)53060-9)
- Andargie, M., Yang, C., & Li, J. (2016). Generation of β -glucuronidase reporter-tagged strain to monitor *Ustilaginoidea virens* infection in rice. *Journal of Microbiological Methods*, *131*, 148–155. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.014>
- Asgari, S., & Schmidt, O. (2002). A coiled-coil region of an insect immune suppressor protein is involved in binding and uptake by hemocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *32*(5), 497–504. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00127-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00127-8)

- Beck, M. H., & Strand, M. R. (2007). A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(49), 19267–19272. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708056104>
- Beck, M., & Strand, M. R. (2005). Glc1.8 from *Microplitis demolitor* Bracovirus Induces a Loss of Adhesion and Phagocytosis in Insect High Five and S2 Cells. *Journal of Virology*, *79*(3), 1861–1870. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.3.1861-1870.2005>
- Beckage, N. E. (2008). Parasitoid polydnaviruses and insect immunity. *Insect Immunology*, 243–270.
- Beckage, N. E., & Drezen, J.-M. (2011). *Parasitoid viruses: symbionts and pathogens*. Academic Press.
- Beckage, N. E., & Gelman, D. B. (2004). Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *Annual Reviews in Entomology*, *49*(1), 299–330.
- Beckage, N. E., Tan, F. F., Schleifer, K. W., Lane, R. D., & Cherubin, L. L. (1994). Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *26*(2–3), 165–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/arch.940260209>
- Beckage, N. E., Templeton, T. J., Nielsen, B. D., Cook, D. I., & Stoltz, D. B. (1987). Parasitism-induced hemolymph polypeptides in *Manduca sexta* (L.) larvae parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata* (Say). *Insect Biochemistry*, *17*(3), 439–455. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-1790\(87\)90005-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-1790(87)90005-9)

- Benfey, P. N., & Chua, N.-H. (1990). The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science*, *250*(4983), 959–966. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.959>
- Bézier, A., Annaheim, M., Herbinière, J., Wetterwald, C., Gyapay, G., Bernard-Samain, S., Wincker, P., Roditi, I., Heller, M., & Belghazi, M. (2009). Polydnviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus. *Science*, *323*(5916), 926–930.
- Bird, J. E., Marles-Wright, J., & Giachino, A. (2022). A User’s Guide to Golden Gate Cloning Methods and Standards. *ACS Synthetic Biology*, *11*(11), 3551–3563. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00355>
- Bleotu, C., Matei, L., Dragu, L. D., Grigorescu, L., Diaconu, C. C., & Anton, G. (2018). Chapter 15 - Methods for Plant Genetic Modification. In A. M. Holban & A. M. Grumezescu (Eds.), *Genetically Engineered Foods* (pp. 385–401). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811519-0.00015-7>
- Castro, J. E. (2005). *Manual de técnicas básicas de biología molecular* (Vol. 7). UADY.
- Chao, R., Yuan, Y., & Zhao, H. (2015). Recent advances in DNA assembly technologies. *FEMS Yeast Research*, *15*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12171>
- Chevignon, G., Periquet, G., Gyapay, G., Vega-Czarny, N., Musset, K., Drezen, J.-M., & Huguet, E. (2018). *Cotesia congregata* Bracovirus Circles Encoding *PTP* and Ankyrin Genes Integrate into the DNA of Parasitized *Manduca sexta* Hemocytes. *Journal of Virology*, *92*(15), 10.1128/jvi.00438-18. <https://doi.org/10.1128/jvi.00438-18>

- Choi, S.-Y., Ro, H., & Yi, H. (2019). The First Step in Cloning. In S.-Y. Choi, H. Ro, & H. Yi (Eds.), *DNA Cloning: A Hands-on Approach* (pp. 29–66). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1662-6_3
- Citovsky, V., Zupan, J., Warnick, D., & Zambryski, P. (1992). Nuclear Localization of *Agrobacterium* VirE2 Protein in Plant Cells. *Science*, *256*(5065), 1802–1805. <https://doi.org/10.1126/science.1615325>
- Cost, G. J. (2007). Enzymatic ligation assisted by nucleases: simultaneous ligation and digestion promote the ordered assembly of DNA. *Nature Protocols*, *2*(9), 2198–2202. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.325>
- Dafny-Yelin, M., Tovkach, A., & Tzfira, T. (2009). Integration of *Agrobacterium* T-DNA in Plant Cells. In *Plant Cell Monographs* (Vol. 14, pp. 1–30). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7089_2008_28
- Danilova, S. A. (2007). The technologies for genetic transformation of cereals. *Russian Journal of Plant Physiology*, *54*(5), 569–581. <https://doi.org/10.1134/S1021443707050019>
- DeBach, P., & Rosen, D. (1991). *Biological control by natural enemies*. CUP Archive.
- Diaz Granados, C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos y usos agrícolas de la ingeniería genética aplicada al cultivo del arroz. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *XIV*, 179–195. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77625401018>
- Doty, S. L., Yu, M. C., Lundin, J. I., Heath, J. D., & Nester, E. W. (1996). Mutational analysis of the input domain of the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, *178*(4), 961–970. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.961-970.1996>

- Dupuy, C., Huguet, E., & Drezen, J.-M. (2006). Unfolding the evolutionary story of polydnviruses. *Virus Research*, 117(1), 81–89.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.001>
- Dürrenberger, F., Crameri, A., Hohn, B., & Koukolíková-Nicola, Z. (1989). Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(23), 9154–9158. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9154>
- Edson, K. M., Vinson, S. B., Stoltz, D. B., & Summers, M. D. (1981). Virus in a parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in the parasitoid's host. *Science*, 211(4482), 582–583.
- Eggleton, P., & Belshaw, R. (1992). Insect parasitoids: an evolutionary overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 337(1279), 1–20.
- Engler, C., & Marillonnet, S. (2014). Golden Gate Cloning. In S. Valla & R. Lale (Eds.), *DNA Cloning and Assembly Methods* (pp. 119–131). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_9
- Gaba, V., Kathiravan, K., Amutha, S., Singer, S., Xiaodi, X., & Ananthkrishnan, G. (2008). The Uses Of Ultrasound In Plant Tissue Culture. In S. D. Gupta & Y. Ibaraki (Eds.), *Plant Tissue Culture Engineering* (pp. 417–426). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_22
- Gauthier, J., Boulain, H., van Vugt, J. J. F. A., Baudry, L., Persyn, E., Aury, J.-M., Noel, B., Bretaudeau, A., Legeai, F., Warris, S., Chebbi, M. A., Dubreuil, G., Duvic, B., Kremer,

- N., Gayral, P., Musset, K., Josse, T., Bigot, D., Bressac, C., ... Drezen, J.-M. (2021). Chromosomal scale assembly of parasitic wasp genome reveals symbiotic virus colonization. *Communications Biology*, 4(1), 104. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01623-8>
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium* -Transformación vegetal mediada: la biología detrás de la herramienta “Gene-Jockeying.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37. <https://doi.org/10.1128/mnbr.67.1.16-37.2003>
- Gibson, D. G. (2011). Chapter fifteen - Enzymatic Assembly of Overlapping DNA Fragments. In C. Voigt (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 498, pp. 349–361). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2>
- Glatz, R. V, Asgari, S., & Schmidt, O. (2004). Evolution of polydnviruses as insect immune suppressors. *Trends in Microbiology*, 12(12), 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.10.004>
- Gleba, Y., Klimyuk, V., & Marillonnet, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 134–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.002>
- Godfray, H. C. J. (1994). *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology* (Vol. 67). Princeton University Press.
- Godfray, H. C. J. (2007). Parasitoids. In S. A. Levin (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity* (pp. 1–13). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-226865-2/00218-2>
- González-Moreno, A. (2020). Avispas parasitoides: ¿seres perversos o aliados desconocidos? *Bioagrocencias*, 12(2).

- Gruber, M. Y., & Crosby, W. L. (1993). Vectors for plant transformation. *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, 89–119.
- Gundersen-Rindal, D., Dupuy, C., Huguet, E., & Drezen, J.-M. (2013). Parasitoid polydnnaviruses: evolution, pathology and applications: Dedicated to the memory of Nancy E. Beckage. *Biocontrol Science and Technology*, 23(1), 1–61.
- Gupta, A. P. (1986). *Hemocytic and Humoral Immunity in Insects*. Wiley, New York.
- Harwood, S. H., & Beckage, N. E. (1994). Purification and characterization of an early-expressed polydnnavirus-induced protein from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24(7), 685–698. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)90056-6)
- Hill, R. E., & Eaton-Rye, J. J. (2014). Plasmid Construction by SLIC or Sequence and Ligation-Independent Cloning. In S. Valla & R. Lale (Eds.), *DNA Cloning and Assembly Methods* (pp. 25–36). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_2
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., & Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303(5913), 179–180. <https://doi.org/10.1038/303179a0>
- Hoffmann, M. P., & Frodsham, A. (1993). *Natural enemies of vegetable insect pests*.
- Hwang, H.-H., Yu, M., & Lai, E.-M. (2017). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: Biology and Applications. *The Arabidopsis Book*, 2017(15). <https://doi.org/10.1199/tab.0186>

- Ibrahim, A. M. A., & Kim, Y. (2008). Transient expression of protein tyrosine phosphatases encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus inhibits insect cellular immune responses. *Naturwissenschaften*, *95*(1), 25–32. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0290-7>
- Ives, A. R., & Hochberg, M. E. (2000). Conclusions: debating parasitoid population biology over the next twenty years. *Parasitoid Population Biology*, 278–303.
- Jaideep, M., & Csaba, K. (1998). PEG-Mediated Protoplast Transformation with Naked DNA. In J. Martinez-Zapater José M. and Salinas (Ed.), *Arabidopsis Protocols* (pp. 267–276). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-391-0:267>
- Jervis, M. A., & Kidd, N. A. C. (1986). Host-feeding strategies in hymenopteran parasitoids. *Biological Reviews*, *61*(4), 395–434.
- Jervis, M. A., Kidd, N. A. C., Fitton, M. G., Huddleston, T., & Dawah, H. A. (1993). Flower-visiting by hymenopteran parasitoids. *Journal of Natural History*, *27*(1), 67–105.
- Jin, S. G., Prusti, R. K., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G., & Nester, E. W. (1990). Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *Journal of Bacteriology*, *172*(9), 4945–4950. <https://doi.org/10.1128/jb.172.9.4945-4950.1990>
- Job, D. (2002). Plant biotechnology in agriculture. *Biochimie*, *84*(11), 1105–1110. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)00013-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)00013-5)
- Karcher, S. J. (1995). RECOMBINANT DNA CLONING. In S. J. KARCHER (Ed.), *Molecular Biology* (pp. 45–134). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012397720-5.50036-0>

- Kay, R., Chan, A., Daly, M., & McPherson, J. (1987). Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science*, *236*(4806), 1299–1302. <https://doi.org/10.1126/science.236.4806.1299>
- Keshavareddy, G., Kumar, A. R. V, & Ramu, V. S. (2018). Methods of plant transformation- a review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, *7*(7), 2656–2668.
- Komari, T., Takakura, Y., Ueki, J., Kato, N., Ishida, Y., & Hiei, Y. (2006). Binary Vectors and Super-binary Vectors. In K. Wang (Ed.), *Agrobacterium Protocols* (pp. 15–42). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:15>
- Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J., & Komari, T. (2007). Current Status of Binary Vectors and Superbinary Vectors. *Plant Physiology*, *145*(4), 1155–1160. <https://doi.org/10.1104/pp.107.105734>
- Krassowska, W., & Filev, P. D. (2007). Modeling Electroporation in a Single Cell. *Biophysical Journal*, *92*(2), 404–417. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.094235>
- Labropoulou, V., Douris, V., Stefanou, D., Magrioti, C., Swevers, L., & Iatrou, K. (2008). Endoparasitoid wasp bracovirus-mediated inhibition of hemolin function and lepidopteran host immunosuppression. *Cellular Microbiology*, *10*(10), 2118–2128.
- Lavine, M. D., & Beckage, N. E. (1995). Polydnviruses: potent mediators of host insect immune dysfunction. *Parasitology Today*, *11*(10), 368–378. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-4758\(95\)80005-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-4758(95)80005-0)
- Le, N. T., Asgari, S., Amaya, K., Tan, F. F., & Beckage, N. E. (2003). Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnvirus in host larvae of the tobacco hornworm,

- Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, 49(5), 533–543.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00052-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00052-0)
- Leclercq, J., Szabolcs, T., Martin, F., & Montoro, P. (2015). Development of a new pCAMBIA binary vector using Gateway® technology. *Plasmid*, 81, 50–54.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.07.003>
- Lee, L.-Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325–332. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113001>
- Liu, Y., Yang, H., & Sakanishi, A. (2006). Ultrasound: Mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. *Biotechnology Advances*, 24(1), 1–16.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.04.002>
- Lu, Z., Beck, M. H., & Strand, M. R. (2010). Egfl.5 is a second phenoloxidase cascade inhibitor encoded by *Microplitis demolitor* bracovirus. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(7), 497–505.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.04.009>
- Luo, K.-J., & Pang, Y. (2006). Disruption Effect of *Microplitis bicoloratus* Polydnavirus EGF-like Protein, MbCRP, on Actin Cytoskeleton in Lepidopteran Insect Hemocytes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(8), 577–585. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00195.x>
- Morikawa, H., & Yamada, Y. (1985). Capillary Microinjection into Protoplasts and Intranuclear Localization of Injected Materials. *Plant and Cell Physiology*, 26(2), 229–236. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076901>

- Pickering, J., & Sharkey, M. J. (1995). *Diversity and Trophic Interactions of Parasitic Wasps (Hymenoptera: Ichneumonoidea) in Tropical Lowland Forests*.
- Quan, J., & Tian, J. (2009). Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways. *PLOS ONE*, 4(7), e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
- Quan, J., & Tian, J. (2014). Circular Polymerase Extension Cloning. In S. Valla & R. Lale (Eds.), *DNA Cloning and Assembly Methods* (pp. 103–117). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_8
- Ramos, Y. J. A. (2017). Parasitismo gregario de *Cotesia congregata* (Say)(Hymenoptera: Braconidae) en dos nuevos hospederos. *Revista Biodiversidad Neotropical*, 7(1), 48–51.
- Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, 9(3), 308–345. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plrev.2012.06.002>
- Rodríguez-Pérez, M. A., & Beckage, N. E. (2006). Estrategias co-evolutivas de la interacción entre parasitoides y polidnavirus. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(1), 31–43.
- Ruiz-Cancino, E., Coronado-Blanco, J. M., Rafaelevich-Kasparyan, D., & Ivanovich-Khalaim, A. (2011). La diversidad de avispa parasitoides en Tamaulipas: Familia Ichneumonidae. *CienciaUAT*, 6(1), 14–17.
- Savary, S., Beckage, N., Tan, F., Periquet, G., & Drezen, J.-M. (1997). Excision of the polydnavirus chromosomal integrated EP1 sequence of the parasitoid wasp *Cotesia*

congregata (Braconidae, Microgastinae) at potential recombinase binding sites. *Journal of General Virology*, 78(12), 3125–3134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-12-3125>

Scheiffele, P., Pansegrau, W., & Lanka, E. (1995). Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA Processing: PURIFIED PROTEINS VirD1 AND VirD2 CATALYZE SITE- AND STRAND-SPECIFIC CLEAVAGE OF SUPERHELICAL T-BORDER DNA IN VITRO(*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1269–1276. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.270.3.1269>

Schmidt, O., Theopold, U., & Strand, M. (2001). Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays*, 23(4), 344–351.

Shetty, R. P., Endy, D., & Knight, T. F. (2008). Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of Biological Engineering*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-2-5>

Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Aoki, S., & Machida, Y. (1993). Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26552–26558. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)74348-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)74348-8)

Stewart Jr, C. N. (2016). *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques, and applications*. John Wiley & Sons.

Stoltz, D. B., Guzo, D., Belland, E. R., Lucarotti, C. J., & MacKinnon, E. A. (1988). Venom Promotes Uncoating in vitro and Persistence in vivo of DNA from a Braconid

- Polydnavirus. *Journal of General Virology*, 69(4), 903–907.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-4-903>
- Strand, M. R., & Burke, G. R. (2014). Polydnaviruses: nature’s genetic engineers. *Annual Review of Virology*, 1, 333–354.
- Strand, M. R., & Burke, G. R. (2020). Polydnaviruses: Evolution and Function. *Current Issues in Molecular Biology*, 34, 163–182. <https://doi.org/10.21775/cimb.034.163>
- Suzuki, K., Tanaka, K., Yamamoto, S., Kiyokawa, K., Moriguchi, K., & Yoshida, K. (2009). Ti and Ri Plasmids. In E. Schwartz (Ed.), *Microbial Megaplasmids* (pp. 133–147). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85467-8_6
- Tomkinson, A. E., & Della-Maria, J. A. (2013). DNA Ligases: Mechanism and Functions. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* (Second Edition, pp. 28–32). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00303-0>
- Turnbull, M., & Webb, B. (2002). Perspectives on polydnavirus origins and evolution. In *Advances in Virus Research* (Vol. 58, pp. 203–254). Academic Press.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(02\)58006-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-3527(02)58006-4)
- Washburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan, F. F., Beckage, N. E., & Volkman, L. E. (2000). Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Insect Physiology*, 46(2), 179–190.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00115-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00115-8)

- Webb, B. A. (1998). Polydnavirus biology, genome structure, and evolution. In *The insect viruses* (pp. 105–139). Springer.
- Wei, L., Pérez-Rodríguez, M. Á., Robledo-Torres, V., & Montalvo-Arredondo, J. I. (2023). Polydnaviruses: Evolution and Applications. In *Microbial Biodiversity, Biotechnology and Ecosystem Sustainability* (pp. 427–447). Springer.
- Wermelinger, B., & Herrmann, M. (2015). *Chapter 7-Natural Enemies of Bark Beetles: Predators, Parasitoids, Pathogens, and Nematodes.*
- Yadav, N. S., Vanderleyden, J., Bennett, D. R., Barnes, W. M., & Chilton, M.-D. (1982). Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(20), 6322–6326. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.20.6322>
- Ye, X., Shi, M., Huang, J., & Chen, X. (2018). Parasitoid polydnaviruses and immune interaction with secondary hosts. *Developmental & Comparative Immunology*, 83, 124–129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.007>