

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERIA



**CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR CON EL GEN CrV1 PARA MODIFICACIÓN
GENÉTICA DE PLANTAS**

Por:

ANEL YUBISELA HERNÁNDEZ LARA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERIA

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

Por:

ANEL YUBISELA HERNÁNDEZ LARA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el comité de Asesoría:


Dr. Miguel Angel Pérez Rodríguez
Director principal


Dra. Sugey Ramona Sinagawa García
Director externo


Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Co-Asesor


Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Co-Asesor

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

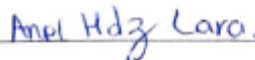
Septiembre 2023

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.



Anel Yubisela Hernández Lara

Autor principal

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 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 protección de cultivos agrícolas de alto valor. FOSEC SEP- INVESTIGACIÓN BÁSICA).

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por abrirme sus puertas brindándome la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

A mi asesor el Dr. Miguel Angel Pérez Rodríguez por brindarme un espacio para desarrollar mis habilidades profesionales y no dudar en transmitirme de su conocimiento e instruirme con paciencia para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio que colaboraron con la realización de este trabajo e hicieron de mi estancia una experiencia extraordinaria con sus risas y enseñanzas, especialmente a Francisco Hernández, Saul Cruz, Santiago Martínez, Diego parra, Sofia Ibarra, Isabella Huertas y Ulises Neri.

A mis seres queridos principalmente mis padres Fidencio Hernández y Yubisela Lara por brindarme los recursos para mi desarrollo académico; a mis hermanos Valeria y Mateo que han sido mi motivación para alcanzar mis metas; a mi mejor amiga Araceli Rivera y a mi amado Sergio Téllez por estar siempre para mí brindándome su apoyo incondicional en momentos de duda y dificultad durante la realización de este trabajo.

Dedicatoria

A mis padres, hermanos, amigos, profesores y demás personas que han sido parte fundamental de mi vida y que gracias a sus consejos y enseñanzas me he convertido en la persona que soy ahora.

Tabla de contenido

Tabla de contenido	II
Índice de figuras.....	V
Índice de tablas	VII
Resumen	VIII
I. Introducción.....	1
II. Objetivos	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III. Revisión de literatura.....	4
3.1. Parasitoides y polidnavirus.....	4
3.1.1. <i>Ciclo infeccioso de los polidnavirus</i>	6
3.1.2. <i>Productos génicos relevantes que expresan los polidnavirus</i>	7
3.1.3. <i>Gen CrVI y su acción en el hospedero</i>	9
3.2. Técnicas de modificación genética de plantas	10
3.2.1. <i>Transformación mediada por polietilenglicol (PEG)</i>	11
3.2.2. <i>Bombardeo de partículas</i>	11
3.2.3. <i>Transformación mediada por Agrobacterium</i>	11
3.3. El ciclo infeccioso de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
3.4. Vector de Transferencia pCAMBIA1301	15

IV. Materiales y métodos	18
4.1. Vectores.....	19
4.2. Transformación de <i>E.coli</i> Dh5 α con el vector pBSK-CrV1	19
4.3. Purificación del vector pBSK-CrV1	19
4.4. Diseño de cebadores <i>NcoI</i> -CrV1- <i>BstEII</i>	21
4.5. Amplificación de <i>NcoI</i> -CrV1- <i>BstEII</i>	22
4.6. Purificación del producto de PCR	23
4.7. Restricción del producto de PCR <i>NcoI</i> -CrV1- <i>BstEII</i>	24
4.8. Purificación del producto de restricción CrV1 con <i>NcoI</i> - <i>BstEII</i>	25
4.9. Transformación de <i>E. coli</i> Dh5 α con el vector pCAMBIA 1301.....	26
4.10. Purificación del vector pCAMBIA 1301	26
4.11. Restricción del vector pCAMBIA 1301 con <i>NcoI</i> - <i>BstEII</i>	27
4.12. Purificación del vector pCAMBIA 1301 con <i>NcoI</i> - <i>BstEII</i>	28
4.13. Ligación.....	29
4.14. Transformación de <i>E. coli</i> Dh5 α	30
4.15. Diseño de cebadores de verificación para la construcción.....	30
4.16. PCR de verificación	33
4.17. Secuenciación	35
4.18. Análisis de la secuencia	35
V. Resultados.....	36

5.1. Obtención de ADN	36
5.2. Digestión con enzimas	38
5.3. Ligación.....	41
5.4. PCR de comprobación	42
5.5. Secuenciación	45
VI. Discusión	47
VI. Conclusión	50
VII. Bibliografía.....	51

Índice de Figuras

Figura 1. Componentes celulares del sistema inmune en invertebrados, sus principales funciones y pasos generales del proceso de encapsulación en insectos (Strand, 2012).....	5
Figura 2. Ciclo de vida del parasitoide y el polidnavirus (Fath-Goodin & Webb, 2008).....	7
Figura 3. Productos génicos de PDV y su efecto en el hospedador (Ye et al., 2018).....	9
Figura 4. Proceso de infección de <i>A. tumefaciens</i> (Christie, 2009).	13
Figura 5. Estructura del plásmido TI (Clark et al., 2019).	14
Figura 6. Estructura de un vector binario y sus componentes (Komori et al., 2007).	16
Figura 7. Mapa del vector pCAMBIA1301 y sus componentes.....	17
Figura 8. Diagrama de procedimiento para la construcción del vector pCAMBIA1301-CrV1...18	
Figura 9. Diseño de cebadores NCOCRF y bsterR.....	21
Figura 10. Sitios de reconocimiento y corte de las enzimas de restricción <i>BstEII</i> (A) y <i>NcoI</i> (B).	21
Figura 11. Esquema de la construcción esperada que muestra la secuencia que amplifican los cebadores de comprobación.....	32
Figura 12. Sitio de hibridación de los cebadores diseñados para la verificación por secuenciación.	32
Figura 13. Esquema que muestra el producto de PCR de 954 pb <i>NcoI</i> -CrV1- <i>BstEII</i>	36
Figura 14. Electroforesis del vector pBSK-CrV1 extraído mediante lisis alcalina.	37
Figura 15. Electroforesis del amplicón <i>NcoI</i> -CrV1- <i>BstEII</i> y el vector pCAMBIA1301 extraído mediante lisis alcalina	37
Figura 16. Esquema del vector pCAMBIA 1301, que muestra el fragmento que escinden las enzimas de restricción <i>NcoI</i> y <i>BstEII</i>	39

Figura 17. Electroforesis del producto de PCR <i>NcoI</i> -CrV1- <i>BstEII</i> y pCAMBIA1301, digeridos con <i>NcoI</i> y <i>BstEII</i>	40
Figura 18. Producto de purificación en gel de CrV1 y pCAMBIA1301 tratados con las enzimas de restricción <i>NcoI</i> y <i>BstEII</i>	41
Figura 19. Clonas resultantes de la transformación genética de los productos de ligación	42
Figura 20. Corrimiento electroforético de la PCR en colonia, utilizando los cebadores pbinCamV y pbinNost	43
Figura 21. Purificación del constructo mediante lisis alcalina de las dos clonas seleccionadas. .	44
Figura 22. PCR utilizando los cebadores pbinCamV y pbinNost y el vector pBSK-CrV1 como sustrato.....	45
Figura 23. Alineamiento de las secuencias obtenidas y el constructo esperado.....	46
Figura 24. Secuencias obtenidas con los cebadores 62-84Pcamv y 265-45CR.	46
Figura 25. Secuencia obtenida con el cebador pbinNost.	46

Índice de tablas

Tabla 1 Composición de las soluciones del método de lisis alcalina para extracción de plásmidos	20
Tabla 2. Secuencia de los cebadores NCOCRF y bstcrR.....	21
Tabla 3. Programa de PCR para la amplificación <i>NcoI</i> -CrV1- <i>BstEII</i>	22
Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR para amplificar el fragmento <i>NcoI</i> -CrV1- <i>BstEII</i>	23
Tabla 5. Componentes de la reacción de digestión del producto de PCR CrV1 con <i>NcoI</i>	25
Tabla 6. Componentes de la reacción de digestión del producto de PCR CrV1 con <i>BstEII</i>	25
Tabla 7. Componentes de la reacción de digestión de pCAMBIA 1301 con <i>NcoI</i>	28
Tabla 8. Componentes de la reacción de digestión de pCAMBIA 1301 con <i>BstEII</i>	28
Tabla 9. Componentes de las reacciones de ligación	30
Tabla 10. Cebadores para verificación de la construcción pCAMBIA1301-CrV1	31
Tabla 11. Componentes de la reacción PCR en colonia.....	33
Tabla 12. Programa de PCR para la verificación de la construcción pCAMBIA1301-CrV1.....	34
Tabla 13. Componentes de la reacción de PCR de comprobación.	35

Resumen

Los polidnavirus son virus asociados a avispas parasitoides, los cuales permiten la supervivencia de la avispa dentro de su hospedador mediante la expresión de ciertos genes, algunos de los cuales se ha detectado que cuentan con actividad inmunosupresora. Por ello, los genes de polidnavirus han despertado el interés de los investigadores como una alternativa más amigable a los plaguicidas empleados en el sector agrícola. En el presente trabajo se construyó mediante el método tradicional con enzimas de restricción un vector para la transformación de plantas el cual, posee el gen inmunosupresor CrV1 del polidnavirus de *Cotesia rubecula*. El fragmento CrV1 se amplificó mediante PCR empleando cebadores específicos los cuales contenían adaptadores para las enzimas de restricción *NcoI* y *BstEII*, luego se purificó y se procedió a digerirlo con dichas enzimas. A la par, el vector pCAMBIA1301 se multiplicó en la cepa de *E.coli* DH5 α y se purificó para de igual manera ser digerido con las enzimas ya mencionadas. Se realizó la ligación del fragmento CrV1 y el vector pCAMBIA1301 digeridos y purificados empleando la enzima T4 ligasa, se realizó la transformación con los productos de ligación y se sembraron en placas de selección con kanamicina. Se obtuvieron 31 clones de los cuales se analizaron 22 mediante PCR en colonia para determinar la presencia del fragmento, obteniendo como resultado 13 colonias positivas. Una vez detectada la presencia del fragmento se seleccionaron las clones uno y dos para extraer las construcciones. Las construcciones se mandaron a secuenciar para tener mayor certeza tanto de la presencia como de la direccionalidad del fragmento CrV1. Los resultados de la secuenciación demostraron que en efecto la secuencia CrV1 se insertó en el sitio esperado bajo el promotor CaMV 35 y aguas arriba del terminador NOS.

Palabras clave: PDV, Ligación, CrV1, Vector, Secuenciación, Parasitoide.

I. Introducción

La agricultura es una de las actividades más importantes a nivel mundial, pues además de contribuir al crecimiento económico, es la principal fuente de alimentos. Sin embargo, el sector agrícola continuamente se enfrenta a una serie de problemas que van desde las malezas, fenómenos meteorológicos desfavorables y plagas; por consiguiente, se pone en riesgo la disponibilidad alimentaria y la generación de ingresos económicos.

Las plagas son uno de los mayores desafíos del sector agrícola, pues según la FAO, 2022 las pérdidas de los cultivos llegan a ser del 40%. Una plaga se puede definir como “Cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales” (NIMF n.º 05, 2010, citado por FAO 2012).

Para erradicar y controlar este problema, los agricultores emplean principalmente compuestos químicos conocidos como plaguicidas o pesticidas los cuales llegan a alcanzar una cantidad de tres mil millones de toneladas al año (Gomez, 2012). Por otra parte, su uso desmedido ha impactado gravemente en los ecosistemas, afectando la calidad del agua, aire y suelo; por lo tanto, esto incide de manera negativa en la salud humana. Debido a ello, se han buscado estrategias novedosas que ayuden a disminuir el uso de pesticidas.

La mariposa blanca de la col (*Pieris rapae*) es una plaga de importancia considerable en el Norte de América, japon, china, Australia y nueva Zelanda (Hely *et al.*, 1982). Esta plaga afecta principalmente a los cultivos de la familia de las crucíferas y de no ser controlada tiene como consecuencia la pérdida total del cultivo. En años anteriores se han estudiado los enemigos naturales de *Pieris rapae* y de otras plagas de importancia como método de control biológico, destacando los himenópteros parasitoides (Herlihy & Van Driesche, 2013) los cuales viven a

expensas de otro organismo (generalmente dentro de este) hasta completar su desarrollo ocasionando la muerte del hospedador (Godfray, 2001). Para sobrevivir dentro del hospedador, los parasitoides emplean una serie de estrategias entre las cuales destaca la asociación con virus pertenecientes a la familia de los polidnavirus (PDV) cuya expresión genética afecta varios aspectos del desarrollo fisiológico del hospedador teniendo aplicaciones en el ámbito biotecnológico, principalmente en el control de plagas (Gill *et al.*, 2006).

II. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Construir un vector con el gen CrV1 para la modificación genética de plantas.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar la secuencia CrV1 bajo el promotor del vector pCAMBIA1301.
- Verificar la construcción pCAMBIA1301-CrV1.

III. Revisión de literatura

3.1. Parasitoides y polidnavirus

Un parasitoide puede matar instantáneamente al hospedador una vez parasitado y se le designa como idiobionte; en caso contrario están los parasitoides koinobiontes los cuales pueden continuar desarrollándose por un tiempo dentro del hospedador hasta culminar con la muerte de este (Godfray, 2001; Kalyanasundaram & Kamala, 2016). Estos últimos, además de tener que superar las barreras físicas, tienen que superar el sistema inmune del hospedador el cual empieza a actuar una vez el parasitoide ha ingresado. Principalmente intervienen unas células análogas a los fagocitos de los vertebrados llamadas hemocitos (Figura 1), los cuales se encargan sobre todo de detectar la presencia de un cuerpo extraño para que luego sea encapsulado y finalmente melanizado para lograr su eliminación (Figura 1) (Godfray, 2001; Liu *et al.*, 2017; Strand, 2012).

Los parasitoides himenópteros en el estadio adulto son de vida libre y, durante su etapa larvaria se desarrollan a expensas de otro organismo al igual que los parásitos, sin embargo, el primero termina por matar a su hospedador; estos pueden ser endoparasitoides si se establecen dentro del hospedador o ectoparasitoides si se desarrollan fuera (Godfray, 2001).

Algunos parasitoides han adoptado una serie de mecanismos para protegerse del sistema inmune de su hospedador y evitar la muerte. Varios de ellos se defienden de forma pasiva depositando sus huevos en órganos distantes a las células inmunitarias o los encubren con ciertas proteínas que los permiten pasar desapercibidos ante el sistema inmune del hospedador (Asgari & Schmidt, 1994; Feddersen *et al.*, 1986); otros parasitoides se defienden de manera activa mediante la secreción de veneno (Mrinalini & Werren, 2017) y en un caso particular, las avispas

pertenecientes a las familias Ichneumonidae y Braconidae, durante la ovoposición inoculan virus denominados polidnavirus (Godfray, 2001).

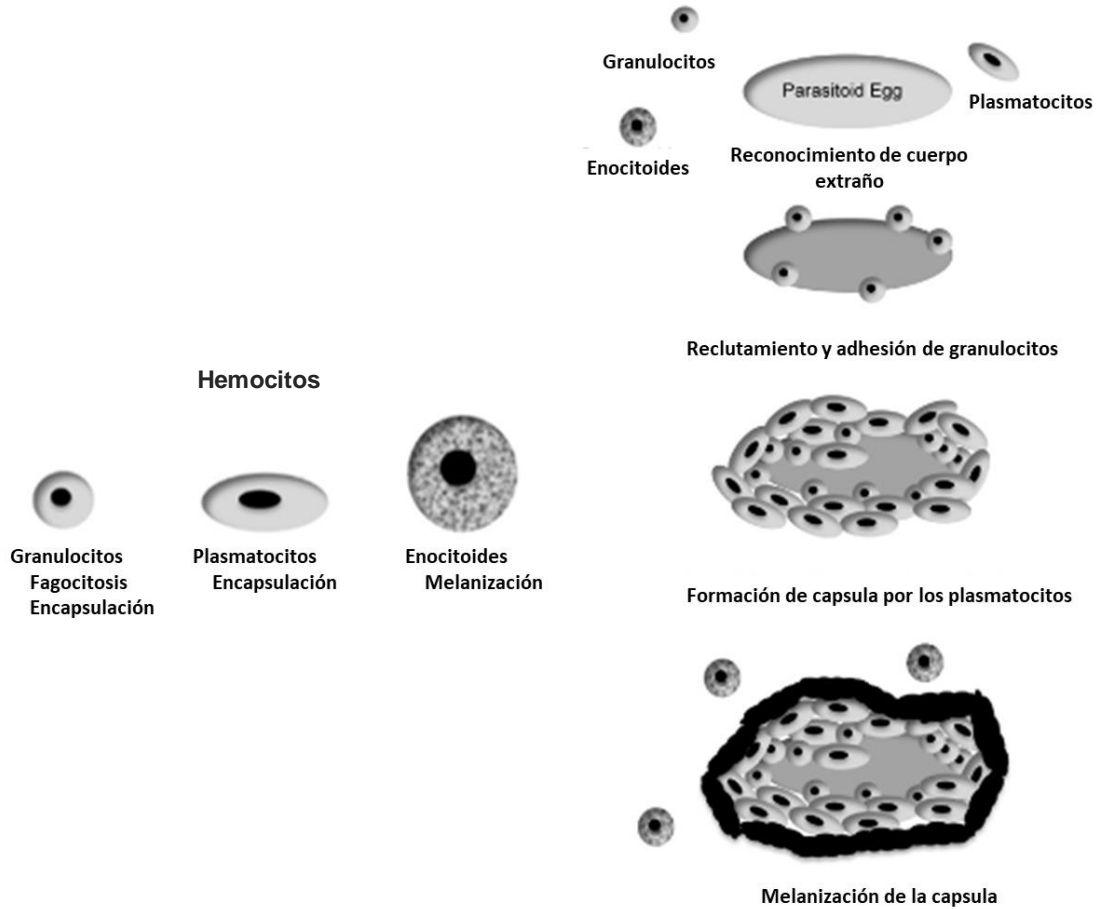


Figura 1. Componentes celulares del sistema inmune en invertebrados, sus principales funciones y pasos generales del proceso de encapsulación en insectos (Strand, 2012).

Los polidnavirus son virus asociados a avispas parasitoides, los cuales reciben su nombre debido a que presentan ADN polidiserso (Drezen *et al.*, 2003; Shelby & Webb, 1999). Se clasifican en bracovirus e ichnovirus (BV e IV, respectivamente) según sea la familia que lo porta y son genéticamente únicos para cada clase de avispa. Ellos son necesarios para asegurar la supervivencia del parasitoide puesto que interfieren con el sistema endocrino e inmune del

hospedador (Webb, 1998). Se encuentran en forma de provirus integrados en el genoma de su portador y únicamente se replican en las células del Calix donde se almacenan hasta ser inyectados durante la ovoposición (Strand, 2012; Webb, 1998).

3.1.1. Ciclo infeccioso de los polidnavirus

Los PDV presentan un ciclo de vida inusual entre los virus, puesto que la replicación, empaquetamiento, transmisión y expresión son eventos que se distribuyen entre el parasitoide y el hospedador (Fath-Goodin & Webb, 2008).

Como ya se mencionó anteriormente, los polidnavirus se encuentran integrados en el genoma de la avispa de manera estable y por ello se transmiten verticalmente de generación en generación siguiendo las leyes mendelianas (Fath-Goodin & Webb, 2008; Volkoff *et al.*, 2002; Whitfield & Asgari, 2003). A partir de este ADN proviral los PDV comienzan a replicarse y empaquetarse únicamente en el tracto reproductivo femenino, específicamente en el núcleo de las células del cáliz y durante las últimas etapas del desarrollo de la avispa (Fath-Goodin & Webb, 2008; Gill *et al.*, 2006; Webb, 1998). Una vez que los virones se acumulan en las células, son liberados de forma continua al lumen del cáliz por gemación en el caso de los IV (Volkoff *et al.*, 1995) o lisis celular en los BV (de Buron & Beckage, 1992). Durante la ovoposición, los virones de PDV ingresan en el hospedador a la par de proteínas, veneno y huevecillos (beckage N, 1998; Fath-Goodin & Webb, 2008; Whitfield & Asgari, 2003). Dentro del hospedador acontece la expresión genética del PDV, la cual comienza desde las primeras horas de la parasitación (Beckage *et al.*, 1987; Fath-Goodin & Webb, 2008). Se ha encontrado que la expresión tiene lugar principalmente en los hemocitos y el tejido graso, sin embargo, también se puede llevar a cabo en células de otros tejidos como en la epidermis, intestino o el sistema nervioso (Beckage, 2008). Los productos génicos del PDV alteran la fisiología del hospedador asegurando la supervivencia del

parasitoide hasta completar su desarrollo y emerger como pupa (Figura 2) (Fath-Goodin & Webb, 2008).

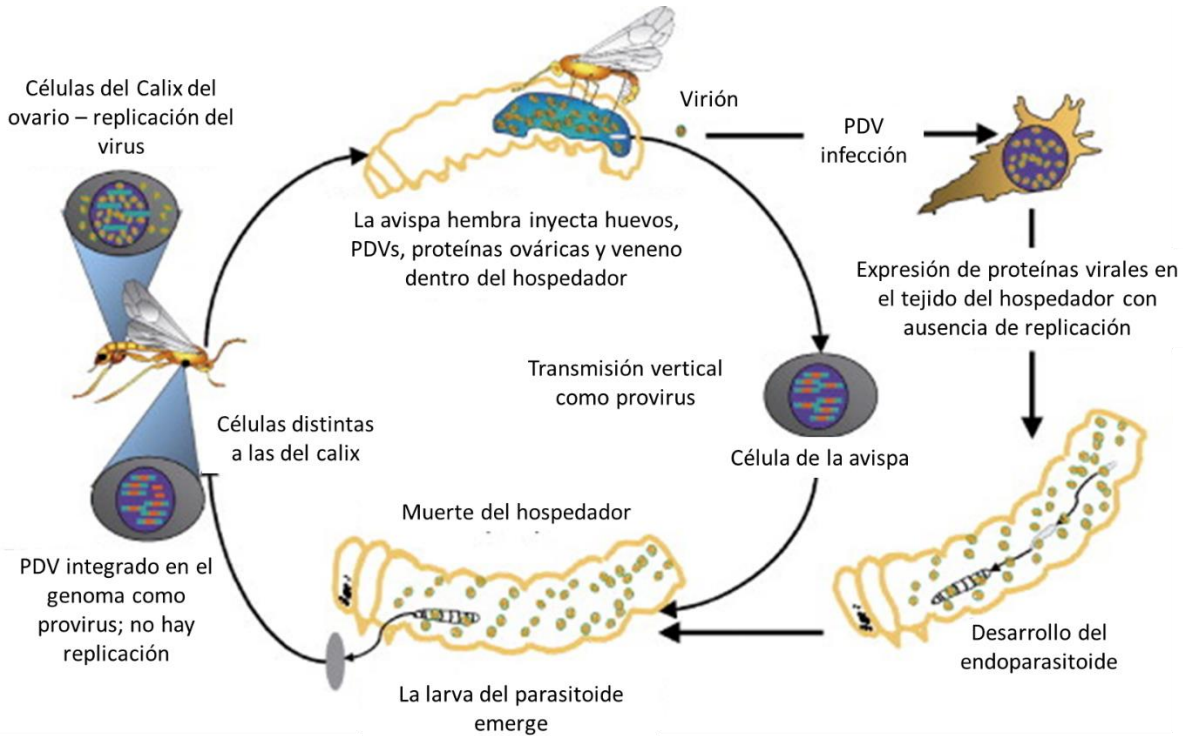


Figura 2. Ciclo de vida del parasitoide y el polidnavirus (Fath-Goodin & Webb, 2008).

3.1.2. Productos génicos relevantes que expresan los polidnavirus

Theilmann & Summers, 1988 clasificaron los genes de PDV en tres clases según su expresión; la clase I corresponde a los genes que se expresan únicamente en el parasitoide, clase II son los genes que se expresan únicamente en el hospedador y en la clase III se encuentran aquellos que se expresan en ambos. Los genes de la clase II que se expresan en insectos parasitados son los que resultan de mayor importancia ya que son los involucrados en las alteraciones fisiológicas del huésped que conllevan a la supervivencia del parasitoide (Webb, 1998).

La secuenciación del genoma de especies de IV y BV ha revelado la existencia de familias de multigenes, los cuales codifican productos que intervienen con varios procesos fisiológicos principalmente implicados en la defensa inmunológica (Figura 3) (Ye *et al.*, 2018).

Tanaka y colaboradores en el 2007 realizaron un análisis comparativo de genomas de IV el cual determinó la presencia de seis familias de genes las cuales corresponden a motivos de cisteína (cys) que se asocian principalmente a la supresión de la inmunidad celular como en el caso de la proteína VHv1.1 de *C. sonorensis* (X. Li & Webb, 1994); elemento repetido (rep) una de las familias más grandes de genes en PDV donde se encuentra la proteína TrFrep1 de *T. rostrata* (A. N. Volkoff *et al.*, 2002) ; innexina viral (inx) parecidas a las proteínas gap, actúan interrumpiendo la comunicación entre los hemocitos en el proceso de encapsulación (Kroemer & Webb, 2004); anquirina viral (ank) implicadas en la interrupción de señalización relacionada a factores de transcripción del hospedador (Thoetkiattikul *et al.*, 2005); N genes y las proteínas ricas en residuos polares (PRRP) de las cuales se cuenta aún con poca información sobre su función (Gill *et al.*, 2006).

En cuanto a BV, Espagne y colaboradores en el 2005, describieron la familia de genes de las cistatinas, los cuales se expresan durante el proceso de parasitismo dando como indicio su implicación en la protección del parasitoide, sin embargo, aún no se establece una función concreta para esta familia de genes. Una de las familias de genes más grandes en BV reportada en la literatura es la de la proteína tirosina fosfatasa (PTP) (Provost *et al.*, 2004) de las cuales se ha propuesto su papel en la desfosforilación de los residuos de tirosina causando una interrupción de la actividad fenol oxidasa (PO) implicada en los procesos de melanización (Beck & Strand, 2007; Gao *et al.*, 2022), tal es el caso de las proteínas Egf1.0 y Egf1.5 de *Microplitis demolitor* bracovirus (MdBV) (Beck & Strand, 2007; Lu *et al.*, 2010). Además, los ensayos realizados por Suderman y

colaboradores en 2008 en la línea celular Sf-21, determinaron que la PTP H2 de MdBV cuenta con actividad anti fagocítica e induce la apoptosis de células inmunológicas.

En las especies de BV *C. kariyai*, *C. ruficrus* y *C. rubecula* se ha descrito la presencia de genes con motivos de lectinas de los cuales se sugiere disminuyen las reacciones inmunológicas al competir con las proteínas de lectina del hospedador (Glatz *et al.*, 2003; Kroemer & Webb, 2004).

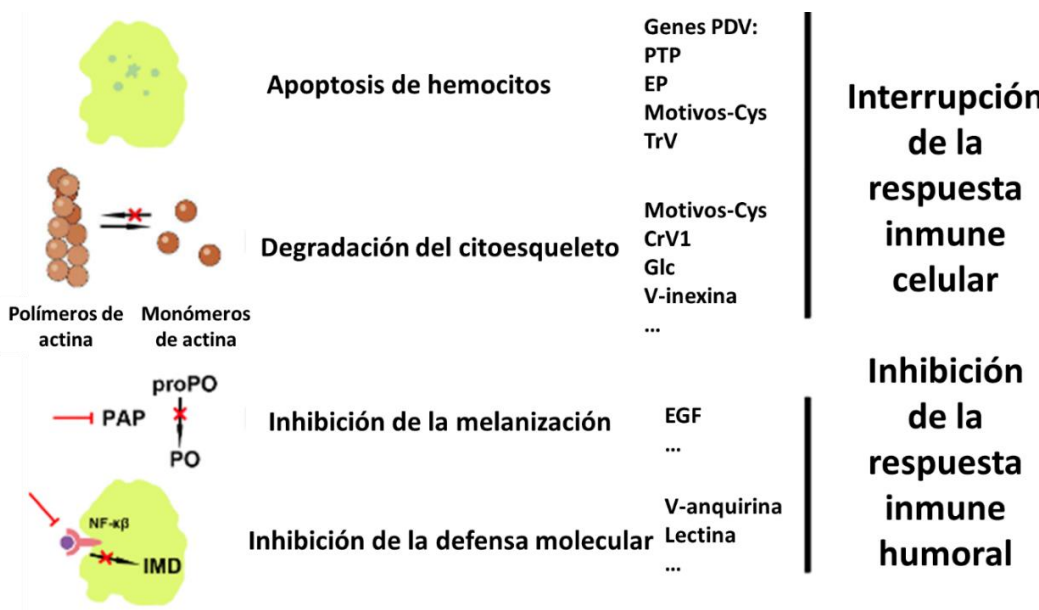


Figura 3. Productos genéticos de PDV y su efecto en el hospedador (Ye *et al.*, 2018).

3.1.3. Gen *CrV1* y su acción en el hospedero

Cotesia rubecula BV es un caso especial entre los polidnavirus, puesto que en el hospedador expresa únicamente cuatro productos genéticos los cuales se sabe están directamente relacionados con la disrupción de la actividad celular del sistema inmune del hospedador, aunque solamente el producto genético CrV1 se expresa dentro de los hemocitos (Asgari *et al.*, 1996).

En 1996 Asgari y colaboradores estudiaron los efectos del PDV producido por el bracónido *Cotesia rubecula* en los hemocitos del lepidóptero *Pieris rapae*. En el estudio se reportó la expresión de un transcrito denominado CrV1 (GenBank: U55279.1) con un marco de lectura de 912 pb el cual codifica para una glicoproteína de 304 aa; este se expresaba de manera transitoria en un rango de 4-8 h después de la parasitación, alcanzando un pico máximo de expresión a las seis horas. Además, se realizaron análisis estructurales a los hemocitos de larvas parasitadas, demostrando alteraciones en la estructura de los filamentos de actina seis horas después de la parasitación, lo cual al coincidir con el tiempo de expresión del transcrito dio como indicio la acción del gen en el hospedador.

En los estudios para comprobar el efecto de CrV1 en los hemocitos (Asgari *et al.*, 1997), se inyectó tal transcrito en larvas de *Pieris rapae* obteniendo como resultado el rompimiento de los filamentos de actina y la presencia de actina sin polimerizar lo cual impide las reacciones de actividad celular resultando en la inactivación de los hemocitos.

3.2. Técnicas de modificación genética de plantas

Los requerimientos alimentarios en el mundo demandan prácticas de mejoramiento vegetal, sin embargo, los métodos tradicionales conllevan tiempo y no son específicos en cuanto al rasgo que se desea modificar, por ello, se han desarrollado métodos de transformación genética los cuales han mejorado la precisión, velocidad, confiabilidad y alcance del mejoramiento genético (Mubeen *et al.*, 2016).

La transformación genética implica la introducción del material genético de interés a la célula, su posterior integración en el genoma de la planta y la selección y regeneración de las

células transformadas (Altpeter *et al.*, 2016). Los principales métodos empleados en plantas se describen a continuación.

3.2.1. Transformación mediada por polietilenglicol (PEG)

Es un método directo en el cual se transforman protoplastos vegetales estando en una solución de PEG con el material genético de interés (Danilova, 2007). Los protoplastos son células despojadas de pared celular por métodos mecánicos o enzimáticos (Raven *et al.*, 1992), lo cual facilita el ingreso de las moléculas a la célula. El polietilen-glicol (PEG) es un polímero que permeabiliza las membranas de manera reversible, permitiendo el paso a moléculas que van desde plásmidos hasta cromosomas completos (Desai *et al.*, 2016).

3.2.2. Bombardeo de partículas

También conocido como biolística o pistola de genes, es un método que emplea moléculas de oro o tungsteno de 0.5 μ m las cuales se recubren con el material genético que se desea ingresar a la planta ya sea en forma de vector o como casete de expresión lineal (Keshavareddy *et al.*, 2018; Mubeen *et al.*, 2016). Empleando helio comprimido, las partículas se disparan a los tejidos de la planta atravesando la pared celular entregando así el material genético (Mubeen *et al.*, 2016).

3.2.3. Transformación mediada por *Agrobacterium*

Es el método mayormente preferido para la transformación genética de plantas el cual, se basa en el mecanismo natural de infección de *Agrobacterium tumefaciens* la cual transfiere un segmento ADN directamente al núcleo de las células que infecta (Danilova, 2007; Mubeen *et al.*, 2016).

A. tumefaciens es una bacteria gram negativa que infecta a plantas, principalmente dicotiledóneas (Haelterman, 2019), provocando la aparición de tumores o agallas en la base de los tallos y raíces a partir de heridas lo cual se conoce como enfermedad de la agalla de la corona (Arguedas, 2009).

3.3. El ciclo infeccioso de *Agrobacterium tumefaciens*

Para que *A. tumefaciens* infecte a la planta es necesario la presencia de heridas las cuales liberan compuestos fenólicos que inducen el movimiento de la bacteria hacia la planta mediante el proceso de quimiotaxis (Ramsey *et al.*, 2009). Una vez en contacto con el hospedador, *Agrobacterium* comienza a generar fibras de celulosa y proteínas que le permiten fijarse a la superficie celular del huésped (Christie, 2009). Además, la presencia de compuestos fenólicos, principalmente la acetosiringona así como un pH bajo y la presencia de azúcares induce la activación del sistema de virulencia lo cual conlleva toda una cascada de señalizaciones (Figura 4) (Anand & Mysore, 2006; Tiwari *et al.*, 2022).

Después de que se activan los genes virulentos, el complejo proteico VirD1-VirD2 escinde del ADN de transferencia una cadena monocatenaria llamada hebra T (Abu-Arish *et al.*, 2004). En el extremo 5' de la hebra T se asocia la proteína VirD2 y junto a otras proteínas de virulencia se transfiere a la célula vegetal mediante el sistema de secreción tipo 4 (T4SS) compuesto por VirD4 y 11 proteínas VirB (Y. G. Li & Christie, 2018; Tiwari *et al.*, 2022). Una vez dentro de la célula del hospedador, el resto de la cadena T se recubre en su totalidad por la proteína VirE2 formando el complejo T el cual permite el tránsito de la hebra a través del citoplasma hasta llegar al núcleo (Citovsky *et al.*, 1992; Tiwari *et al.*, 2022).

Para ingresar al núcleo, la hebra T es desprovista de las proteínas Vir asociadas debido a la acción de VirF y la proteína del hospedador VBF (Tzfira *et al.*, 2004; Zaltsman *et al.*, 2010). Finalmente, el ADN se integra en el núcleo con ayuda de proteínas del hospedador mediante un tipo de recombinación y comienza la expresión de los genes tanto de los causantes de la formación de tumores como de aquellos que conducen a la síntesis de opinas que servirán de alimento para *Agrobacterium* (Christie, 2009).

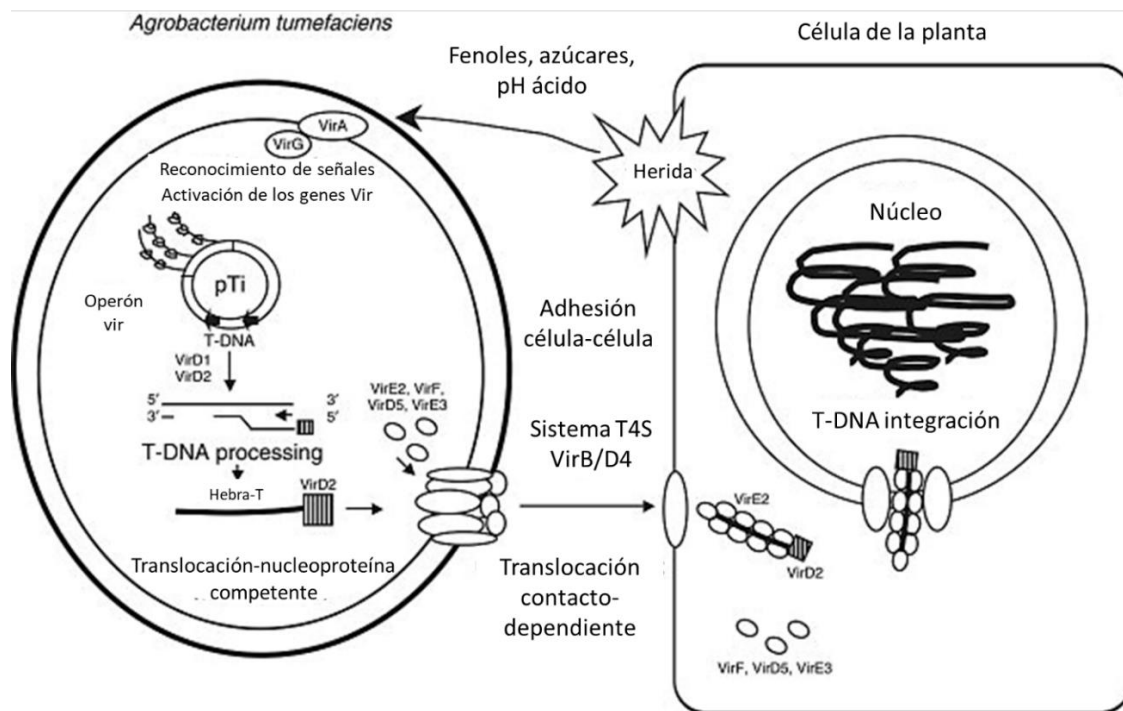


Figura 4. Proceso de infección de *A. tumefaciens* (Christie, 2009).

3.3.1. El plásmido Ti

Durante el estudio de la patología de la agalla de la corona, se descubrió que en los tumores no había presencia del patógeno, sin embargo, todas aquellas cepas de la bacteria que causaban la enfermedad presentaban un plásmido que era inexistente en las cepas avirulentas. Por tanto, se

llegó a la conclusión de que el plásmido era el desencadenante del efecto tumorigénico en la planta, por lo que se le denominó plásmido inductor de tumores Ti (Pratiwi & Surya, 2020).

El plásmido inductor de tumores está compuesto principalmente por la región vir que codifica los genes virulentos, el sitio ori para el mantenimiento y replicación del plásmido, el segmento involucrado con el metabolismo de opinas (Gordon & Christie, 2014) y una región flanqueada por secuencias repetidas de 25 pb la cual se denomina T-DNA (Figura 5) (Pratiwi & Surya, 2020) ya que es el segmento que se transfiere y se integra en el ADN nuclear de las células de la planta gracias a la expresión de los genes de virulencia de la región vir (Hwang *et al.*, 2017).

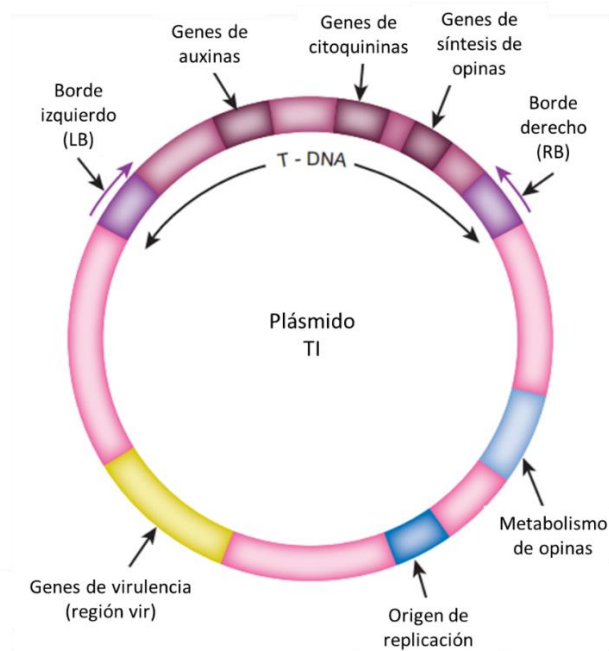


Figura 5. Estructura del plásmido TI (Clark *et al.*, 2019).

El T-DNA alberga la información para la síntesis de auxinas y citocinas, así como de opinas. Las auxinas y citocinas son fitohormonas que naturalmente participan en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Su *et al.*, 2011), entonces, al producirse en exceso, ocasionan un desbalance de la concentración óptima en la planta dando como resultado un crecimiento celular

descontrolado que causa la formación de los tumores (Escobar & Dandekar, 2003). Las opinas son tanto aminoácidos como azúcares derivados del fosfato los cuales varían dependiendo de la cepa ya que sirven como alimento para *A. tumefaciens* (Gordon & Christie, 2014).

El descubrimiento de la capacidad de *A. tumefaciens* para transferir material genético a las plantas resultó de gran interés para la ingeniería genética, llevando así al desarrollo de una tecnología para la obtención de plantas transgénicas que se basa en el proceso que ocurre de forma natural. Para ello se eliminaron los genes pertenecientes a las fitohormonas y opinas dentro de la región del T-DNA, permitiendo así la sustitución de esta región por alguna secuencia de interés (Pratiwi & Surya, 2020). Después, lo que se hizo fue colocar la región de virulencia y del T-DNA en vectores separados obteniendo así un sistema binario (Figura 6) (Lee & Gelvin, 2008) .

3.4. Vector de Transferencia pCAMBIA1301

La línea de vectores pCAMBIA se construyó a partir de la estructura del vector pPZP. Son vectores con un tamaño entre 7 y 12 kb, presentan alto número de copias en *E. coli* y poseen alta estabilidad en *Agrobacterium* debido a la presencia del replicón pVS1.

El vector pCAMBIA 1301 (GenBank: AF234297.1) mostrado en la Figura 7 es un vector binario que se emplea para la transformación de plantas. Posee el polilinker pUC18-*lacZ*α y los marcadores de selección de la higromicina (HygR) para plantas y el de resistencia a la kanamicina (KanR) para bacterias. Además, posee el gen reportero de la glucuronidasa (GUS) comprendido entre el promotor constitutivo fuerte CaMV 35S y el terminador NOS. El gen reportero se puede emplear para para crear fusiones o bien puede ser sustituido por el gen de interés (*Legacy pCAMBIA Vectors – Cambia, s/f*).

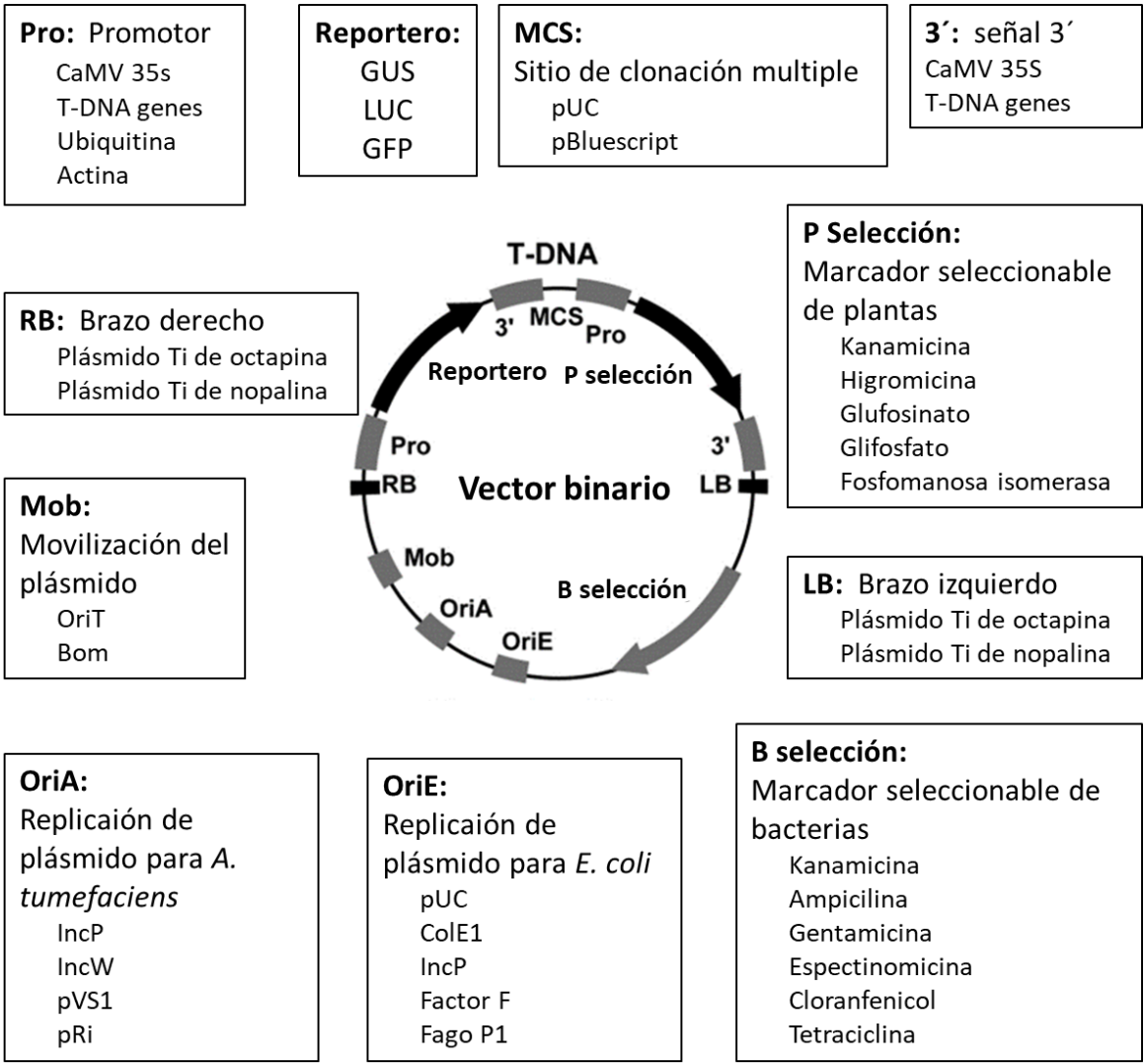


Figura 6. Estructura de un vector binario y sus componentes (Komori *et al.*, 2007).

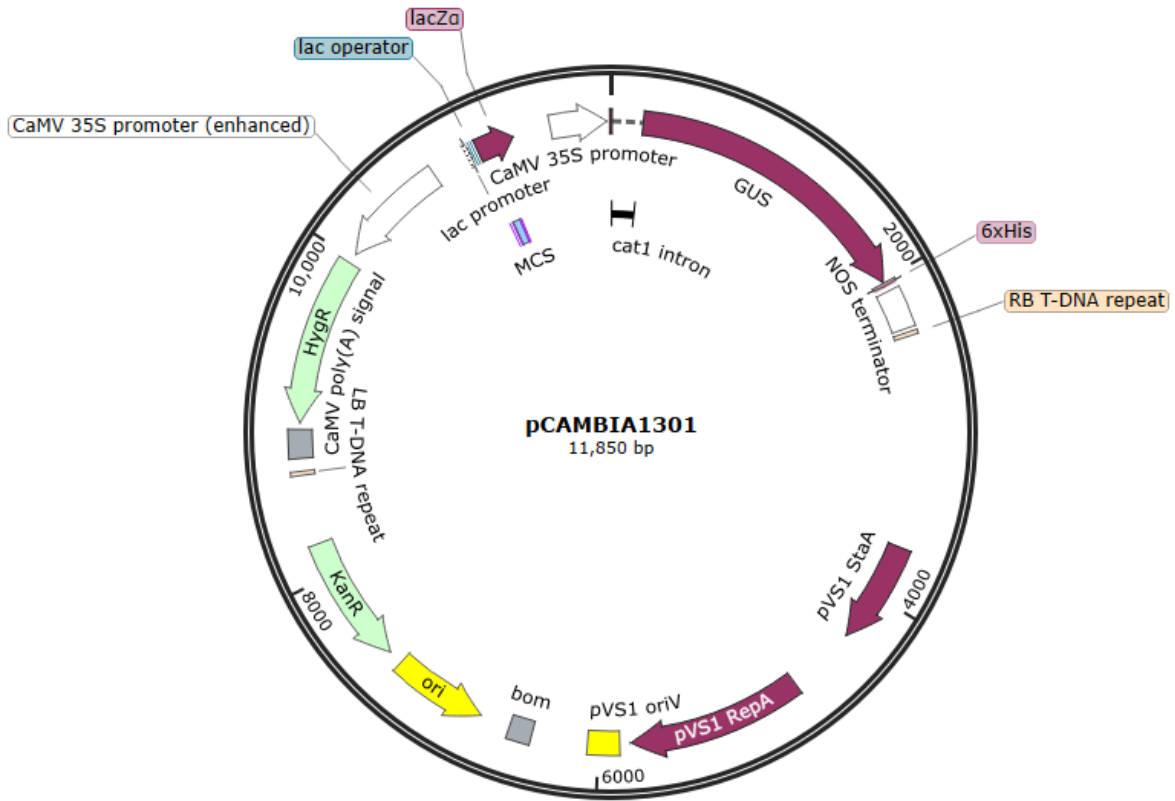


Figura 7. Mapa del vector pCambia1301 y sus componentes.

IV. Materiales y métodos

En el presente trabajo se llevaron a cabo una serie de procedimientos para la obtención y manipulación del material genético requerido para el ensamblaje del gen CrV1 del polidnavirus *C. rubecula* en el vector pCAMBIA1301. El proceso general empleado para la obtención y verificación de la construcción se presenta en el diagrama de la Figura 8.

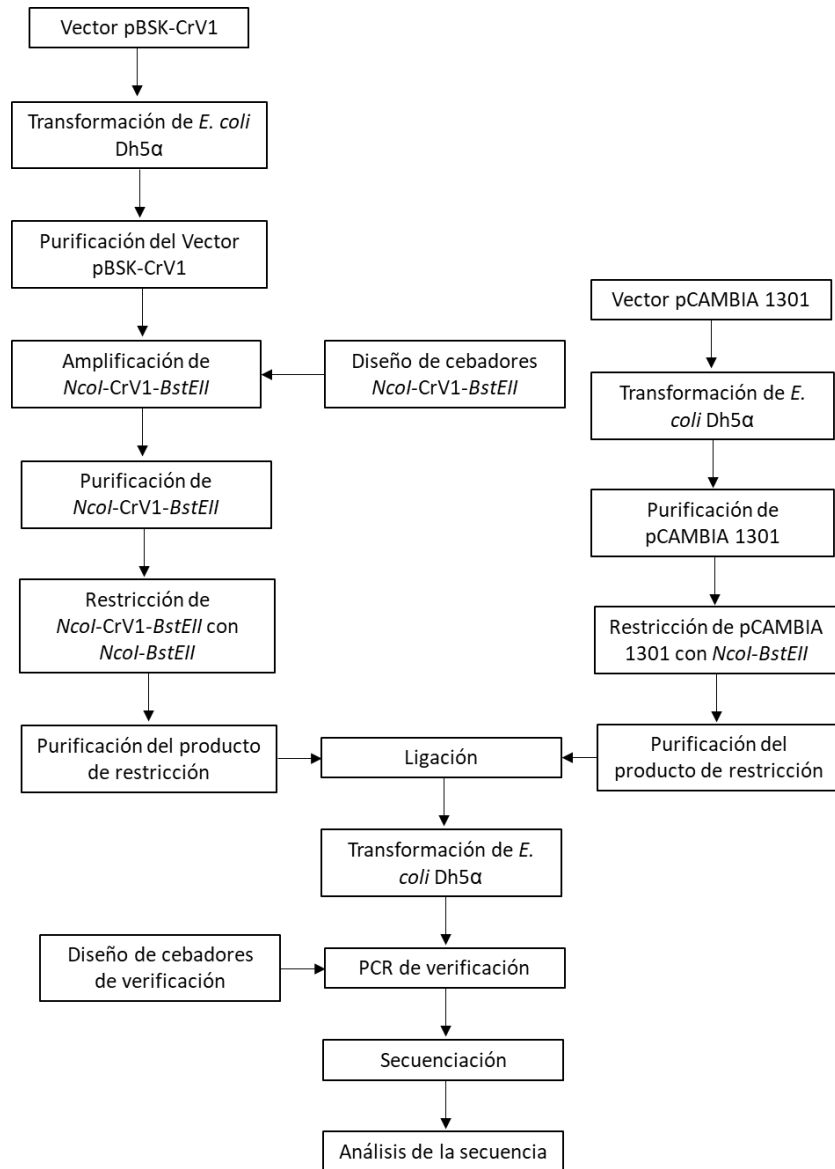


Figura 8. Diagrama de procedimiento para la construcción del vector pCAMBIA1301-CrV1.

4.1. Vectores

El vector pBSK-CrV1 fue previamente construido (Wei *et al.*, 2016) y el vector pCAMBIA1301 fue donado por el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la FAUANL.

4.2. Transformación de *E.coli* Dh5 α con el vector pBSK-CrV1

El vector pBSK-CrV1 fue utilizado para transformar la cepa quimiocompetente de *E. coli* Dh5 α por el método de choque térmico. Para lo cual, se añadieron 100 ng del vector y 100 μ L de células competentes en un microtubo de 1.5 mL. Se colocó en hielo durante 30 minutos, tras lo cual se colocó en un agitador térmico durante 45 s a una temperatura de 42° C, posteriormente se volvió a colocar en hielo durante dos minutos. Finalmente se agregaron 500 μ L de medio LB (caldo de lisogenia) líquido al tubo de reacción y se procedió a incubar durante dos horas a 37° C y 200 rpm (revoluciones por minuto). Posterior a la incubación, se procedió a sembrar las células transformadas en cajas Petri con medio agar-LB (15gr/L-25 gr/L) con ampicilina (50 mg/mL). Después de la siembra, las cajas se incubaron toda la noche a 37° C.

4.3. Purificación del vector pBSK-CrV1

Las colonias resultantes del paso anterior se inocularon en cinco mL de medio LB líquido (25 gr/L) con ampicilina (50 mg/mL) y se llevaron a incubar a 37°C con agitación de 200 rpm durante 12 horas. Posteriormente se realizó la extracción de ADN plasmídico, empleando el método de lisis alcalina previamente documentado (Sambrook *et al.*, 1989); para lo cual, primero se transfirieron 1.5 mL de cada medio con crecimiento bacteriano a un microtubo de 1.5 mL, posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm para luego descartar el sobrenadante. Después se agregaron 150 μ L de la solución buffer (solución I) y se resuspendió la pastilla con ayuda de un agitador tipo vortex. Después de la resuspensión se agregaron 200 mL de la solución II a

temperatura ambiente y se mezcló por inversión hasta obtener una solución viscosa, tras lo cual se añadieron 300 μ L de la solución III y se mezcló por inversión. Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante fue transferido a un microtubo de 1.5 mL limpio y se agregó isopropanol en una proporción 1:1 al sobrenadante transferido. La solución se mezcló por inversión y en seguida se llevó a incubar a -20° C durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se realizó centrifugación a 14.000 rpm durante cinco minutos, luego se removió el sobrenadante y se añadieron 600 μ L de etanol al 70 % y se mezcló por inversión. Finalmente se llevó a centrifugar a 14.000 rpm durante cinco minutos, se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla durante 20 min para luego rehidratarla con 50 μ l de agua libre nucleasas.

Para corroborar la correcta extracción del vector, se realizó una electroforesis cargando una muestra en un gel de agarosa al 0.8% y se visualizó en un fotodocumentador Axygen™.

Tabla 1 Composición de las soluciones del método de lisis alcalina para extracción de plásmidos

Solución I (resuspensión)	Buffer EB (10 mM tris-Cl, pH 8.5)
Solución II (lisis)	0.2 N NaOH, 1% SDS, agua
Solución III (neutralización)	5 M acetato de potasio, ácido glacial acético, agua

4.4. Diseño de cebadores *NcoI*-CrV1-*BstEII*

Para la amplificación del fragmento CrV1 se realizó el diseño de cebadores empleando el software SnapGene^R V 6.0.2 (Figura 9).

Los cebadores NCOCRF y bstcrR (tabla 2), se diseñaron de manera que sean específicos para CrV1 y además contengan secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *NcoI* y *BstEII* (Figura 10) respectivamente en los extremos 5'.



Figura 9. Diseño de cebadores NCOCRF y bstcrR.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores NCOCRF y bstcrR

Nombre	Secuencia	Tm
NCOCRF	5' AtaccatggATGTCACTCGTCAAAGTGc 3'	62°C
bstcrR	5' ataggtcaccTCAGATGCTACATATAGGGA 3'	61°C



Figura 10. Sitios de reconocimiento y corte de las enzimas de restricción *BstEII* (A) y *NcoI* (B).

4.5. Amplificación de *NcoI*-CrV1-*BstEII*

El fragmento CrV1 se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el estuche comercial de PCR Advantage HF 2 (Takara Bio) y los cebadores con adaptadores NCOCRF y bstcrR descritos anteriormente empleando un termociclador Axygen® MaxyGene II. Cada reacción contenía los cebadores directo e inverso, el vector PBSK-CrV1, dNTPs, buffer y la enzima polimerasa, todo en un volumen de reacción de 20 μ L (Tabla 4). El programa de PCR empleado se muestra en la Tabla 3.

Para corroborar el producto de PCR se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.08% y se visualizó en un fotodocumentador Axygen™.

Tabla 3. Programa de PCR para la amplificación *NcoI*-CrV1-*BstEII*

Pasos	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94	30 s	
Alineamiento	61	30 s	30 ciclos
Extensión	72	30 s	
Extensión	72	10 min	1 ciclo

Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR para amplificar el fragmento *NcoI*-CrV1-BstEII

Componentes	Volumen	Concentración final
H ₂ O grado-PCR	13.1 μ L	--
10X HF 2 PCR Buffer	2 μ L	1x
PBSK-CrV1	0.5 μ L	0.2 ng
Primer 1 (10 μ M)	1 μ L	0.5 μ M
Primer 2 (10 μ M)	1 μ L	0.5 μ M
10X HF 2 dNTP Mix	2 μ L	1x
50X Advantage-HF 2 Polymerase Mix	0.4 μ L	1x
Volumen final	20 μL	

4.6. Purificación del producto de PCR

Una vez obtenido el amplicón, se realizó la purificación empleando el estuche comercial Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System (Promega), para lo cual: se añadió igual volumen de membrane binding solution al producto de PCR y la mezcla se transfirió a una minicolumna insertada en un tubo de recolección y se dejó incubar durante un minuto. Una vez transcurrido el tiempo, se llevó a centrifugar a 14,000 rpm durante un minuto y se descartó el líquido obtenido en el tubo de recolección. En seguida se limpió la columna añadiendo 700 μ L de membrane wash solution para después centrifugar a 14,000 rpm durante un minuto y luego descartar el líquido del tubo de recolección. La limpieza se repitió añadiendo ahora 500 μ L de membrane wash solution y centrifugando durante cinco minutos. Al final de los lavados se realizó una centrifugación extra de

un minuto para asegurar la eliminación de etanol residual. Después se colocó la columna sobre un microtubo limpio de 1.5 mL para proceder con la elución en la cual se añadieron 30 µL de agua libre de nucleasas y se dejó incubar durante un minuto. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 14,000 rpm durante un minuto y la muestra de ADN obtenida se almacenó a 4°C.

4.7. Restricción del producto de PCR *NcoI*-CrV1-*BstEII*

Una vez amplificado y purificado el fragmento, se empleó el estuche comercial FastDigest *NcoI* (thermo scientific) para realizar la primera digestión del fragmento *NcoI*-CrV1-*BstEII*. La mezcla de la reacción se realizó según las indicaciones del fabricante (Tabla 5) y se incubó durante una hora a 37°C.

Después del tiempo de incubación, se realizó la purificación por columnas con el estuche comercial Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System (Promega) siguiendo los pasos descritos anteriormente y se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8%.

Una vez cortado el fragmento CrV1 con *NcoI* y posteriormente purificado, se procedió a realizar la digestión con la enzima *BstEII* (thermo scientific). Se realizaron tres reacciones de restricción de 20 µL c/u como se muestra en la Tabla 6 siguiendo las indicaciones del proveedor y se llevó a incubar a 37°C durante 16 horas.

Tabla 5. Componentes de la reacción de digestión del producto de PCR CrV1 con *NcoI*

Componentes	Volumen	Concentración Final
ADN	9 μ L	1 μ g
10X FastDigest buffer	2 μ L	1X
<i>NcoI</i> (1 U/ μ L)	1 μ L	1 U
Agua libre de nucleasas	8 μ	--
Volumen final	20 μL	

Tabla 6. Componentes de la reacción de digestión del producto de PCR CrV1 con *BstEII*

Componentes	Volumen	Concentración final
ADN	17 μ L	1 μ g
10X Buffer O	2 μ L	1x
<i>BstEII</i> (10 U/ μ L)	1 μ L	10 U
Volumen final	20 μL	

4.8. Purificación del producto de restricción CrV1 con *NcoI-BstEII*.

Se realizó electroforesis del producto de restricción *NcoI*-CrV1-*BstEII* en un gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente bajo luz UV se escindió manualmente con un bisturí la banda correspondiente al producto de restricción y se colocó en un tubo de reacción para proceder a emplear el estuche comercial de purificación de fragmentos de ADN Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System (Promega). Para esto, se agregaron 10 μ L de membrane binding solution por cada

10 mg de gel de agarosa para luego llevar a incubación a 65°C durante aproximadamente 10 min o hasta que el gel se haya disuelto completamente. Durante el tiempo de incubación se mezcló de manera intermitente el tubo en un agitador tipo vortex, esto para facilitar la disolución del gel de agarosa. Una vez se disolvió por completo el gel, se prosiguió con el método de purificación por columnas descrito en este documento.

4.9. Transformación de *E. coli* Dh5α con el vector pCAMBIA 1301

El vector pCAMBIA 1301 fue utilizado para transformar la cepa quimiocompetente de *E. coli* Dh5α por el método de choque térmico. Para ello, se añadieron 100 ng de vector pCAMBIA1301 y 100μL de células competentes en un microtubo de 1.5 mL. El microtubo se colocó en hielo durante 30 minutos y posteriormente en agitador térmico durante 45 s a una temperatura de 42° C, posteriormente se colocó nuevamente en hielo durante dos minutos. Finalmente se agregaron 500 μL de medio LB líquido al tubo de reacción y se procedió a incubar durante dos horas a 37° C y 200 rpm. Seguido de la incubación, se procedió a sembrar las células transformadas en cajas Petri con medio agar-LB (25gr/L-15 gr/L) con kanamicina (50mg/mL), después de la siembra, las cajas se llevaron a incubar toda la noche a 37° C.

4.10. Purificación del vector pCAMBIA 1301

Las colonias resultantes de la transformación se inocularon en 5 mL de medio LB líquido con kanamicina (50 mg/mL) y se incubaron a 37° C con agitación de 200 rpm durante 12 horas. Posteriormente se realizó la extracción de ADN plasmídico, empleando el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) para lo cual, primero se transfirieron 1.5 mL de cada medio con crecimiento bacteriano a un microtubo de 1.5 mL, posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm para luego descartar el sobrenadante. Después se agregaron 150 μL de la solución buffer (solución I) y

se resuspendió la pastilla con ayuda de un agitador tipo vortex. Después de la resuspensión se agregaron 200 mL de la solución II a temperatura ambiente y se mezcló por inversión hasta obtener una solución viscosa, tras lo cual se añadieron 300 μ L de la solución III y se mezcló por inversión. Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante cinco minutos. Con ayuda de una micropipeta el sobrenadante fue transferido a un microtubo de 1.5 mL limpio y se agregó isopropanol en una proporción similar al sobrenadante transferido. La solución se mezcló por inversión y en seguida se llevó a incubar a -20° C durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se realizó centrifugación a 14.000 rpm durante cinco minutos, se removió el sobrenadante y se añadieron 600 μ L de etanol al 70 % para luego mezclar el tubo por inversión. Finalmente se llevó a centrifugar a 14.000 rpm durante cinco min, se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla durante 20 min para luego rehidratarla con 50 μ l agua libre nucleasas.

Para corroborar la correcta extracción del vector, se realizó una electroforesis cargando una muestra en un gel de agarosa 0.8% y se visualizó en un fotodocumentador Axygen™.

4.11. Restricción del vector pCAMBIA 1301 con *NcoI*-*BstEII*

El vector purificado al igual que el producto de PCR se cortaron empleando el estuche comercial FastDigest *NcoI* (thermo scientific). La mezcla de reacción (Tabla 7) se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor y se incubó durante una hora a 37° C.

Después del tiempo de incubación, se realizó la purificación por columnas con el estuche comercial Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System (Promega) siguiendo el procedimiento ya descrito.

Una vez digerido con *NcoI* y posteriormente purificado, se procedió a realizar la digestión con la enzima *BstEII* (Thermo Scientific). Se realizaron tres reacciones de restricción de 20 μ L c/u

como se muestra en la Tabla 8 siguiendo las indicaciones del proveedor y se llevó a incubar a 37°C durante 16 horas.

Tabla 7. Componentes de la reacción de digestión de pCAMBIA 1301 con *NcoI*

Componentes	Volumen	Concentración final
ADN	17 µL	1 µg
10 x FastDigest Buffer	2 µL	1x
<i>NcoI</i> (1U/µL)	1 µL	1 U
Volumen final	20 µL	

Tabla 8. Componentes de la reacción de digestión de pCAMBIA 1301 con *BstEII*

Componentes	Volumen	Concentración final
ADN	17 µL	1 µg
10X Buffer O	2 µL	1x
<i>BstEII</i> (10 U/µML)	1 µL	10 U
Volumen final	20 µL	

4.12. Purificación del vector pCAMBIA 1301 con *NcoI-BstEII*

Se realizó un corrimiento electroforético del total de producto de restricción de pCAMBIA1301 (60 µL) en gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente bajo luz UV se escindió manualmente con un bisturí la banda correspondiente al vector pCAMBIA1301 producto de la

restricción y se colocó en un tubo de reacción para proceder a emplear el estuche comercial de purificación de fragmentos de ADN Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System (Promega). Para esto, se agregaron 10 µL de membrane binding solution por cada 10 mg de gel de agarosa para luego llevar a incubar a 65°C durante aproximadamente 10 min o hasta que el gel se haya disuelto completamente. Durante el tiempo de incubación se debe mezclar de manera intermitente el tubo en un agitador tipo vortex, esto para facilitar la disolución del gel de agarosa. Una vez esté disuelto por completo el gel, se prosiguió con el método de purificación por columnas descrito en este documento.

4.13. Ligación

Para la construcción del vector se optó por el método de ligación empleando la enzima T4 DNA ligasa (Promega). Para ello se utilizó el vector pCAMBIA 1301 y el fragmento CrV1 posteriormente digeridos y purificados. Se realizaron tres reacciones empleando las relaciones molares de vector-inserto 1:1, 1:3 y 3:1 (Tabla 9). Las mezclas de reacción se incubaron a 4°C toda la noche.

Tabla 9. Componentes de las reacciones de ligación

Relación	1:1	1:3	3:1
Vector	100 ng	100 ng	100 ng
Inserto	9 ng	28 ng	3 ng
Buffer 10x	1x	1x	1x
Ligasa	1 U	1 U	1 U
Volumen final	10µl		

4.14. Transformación de *E. coli* Dh5a

Se realizó una transformación por cada tratamiento de ligación y se empleó agua como control negativo y el vector pCAMBIA 1301 como control positivo. El procedimiento se realizó empleando el método de choque térmico como ya se ha descrito anteriormente, solo que en este caso se empleó el total de las reacciones de ligación (10µL) para transformar las células.

Finalmente, el resultado de la transformación se sembró en placas con medio LB suplementado con kanamicina (50 mg/mL) y se llevó a incubar a 37°C durante toda la noche.

4.15. Diseño de cebadores de verificación para la construcción

Los cebadores para verificación se diseñaron con ayuda del software SnapGene^R V 6.0.2. Los cebadores pbinCamV y pbinNost (Tabla 10) se emplearon para la verificación mediante PCR puesto que fueron diseñados de tal manera que fueran específicos del vector y amplificaran la secuencia comprendida entre el promotor CaMV 35S y el terminador NOS (Figura 11). Esto

permitiría de acuerdo con el tamaño del amplicón obtenido confirmar la inserción del fragmento CrV1 que, en caso de ser positivo, tendría un tamaño alrededor de 1.2 kb.

Los cebadores pbinNost, 62-84Pcamv y 265-45CR (Tabla 10) se emplearon para verificar la construcción mediante secuenciación y se diseñaron de tal manera que se secuenciara en su totalidad el gen CrV1 así como parte de las secuencias adyacentes a este (promotor CaMV 35S y terminador NOS) (Figura 12).

Tabla 10. Cebadores para verificación de la construcción pCAMBIA1301-CrV1

Nombre	Secuencia	Tm
pbinCamV	5' AGTGGATTGATGTGATATCTCC 3'	54°C
pbinNost	5' GTTAATTATTACATGCTTAACG 3'	50°C
62-84Pcamv	5' GTCACCTTATTGTGAAGATAGT 3'	51°C
265-45CR	5' GTGCCTCAGAATAAGACTTC 3'	52°C

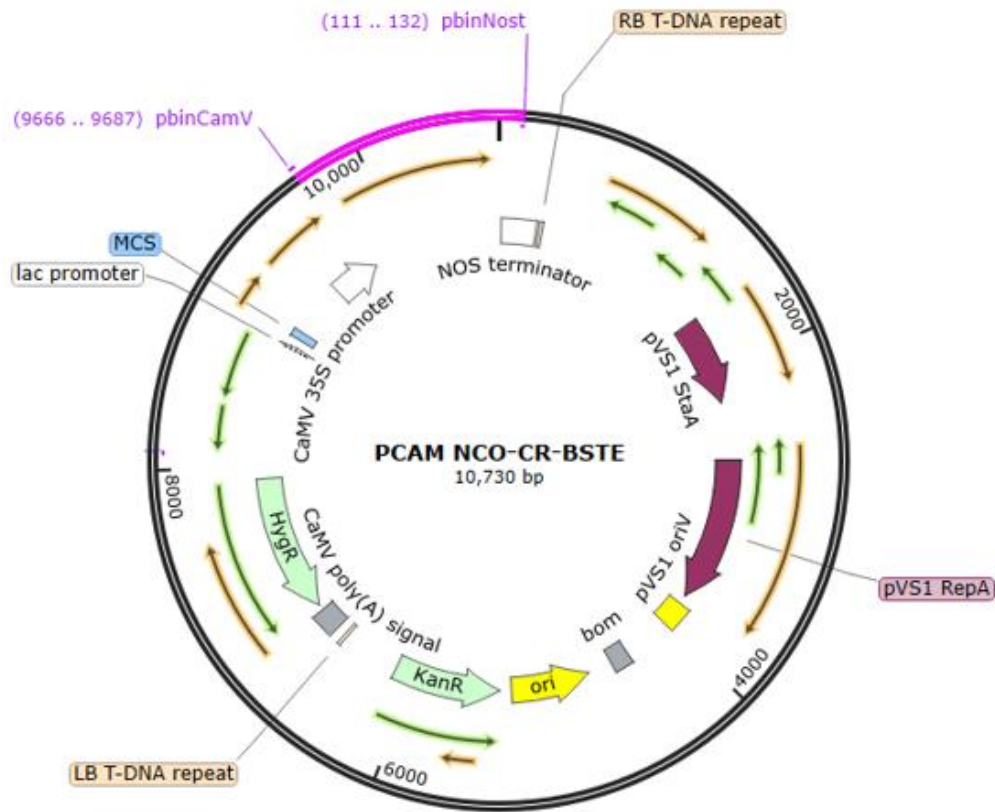


Figura 11. Esquema de la construcción esperada que muestra la secuencia que amplifican los cebadores de comprobación.

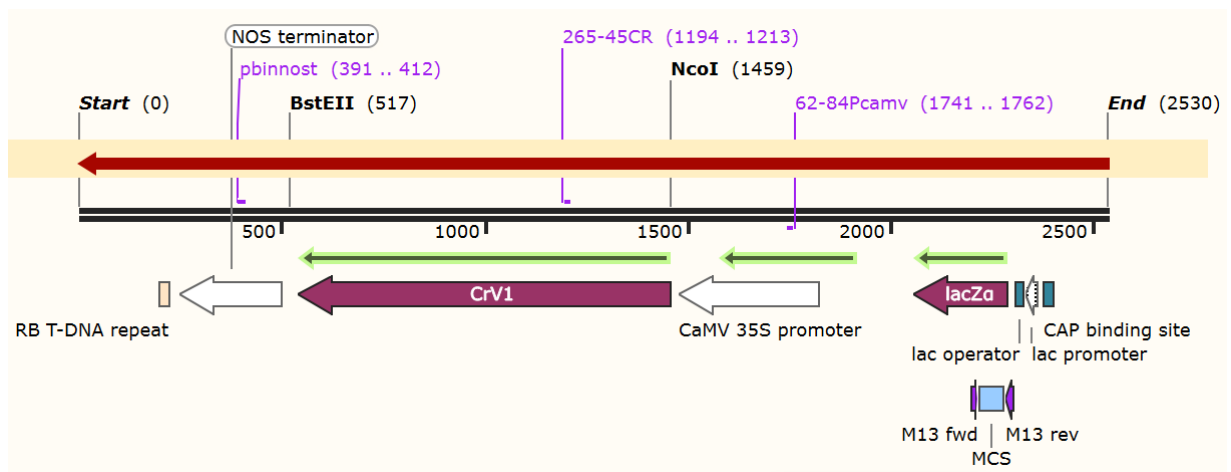


Figura 12. Sitio de hibridación de los cebadores diseñados para la verificación por secuenciación.

4.16. PCR de verificación

Se realizaron 23 reacciones de PCR en colonia para identificar si alguna de las colonias que crecieron en las placas presentaba la construcción esperada. Para ello se usó el estuche comercial Gotaq green master mix (Promega), los cebadores pbinCamV y pbinNost que se presentan en la Tabla 10 y se empleó como control negativo el vector pBSK-CrV1. El programa de PCR empleado se describe en la Tabla 12 y la mezcla de reacción en la Tabla 11.

Tabla 11. Componentes de la reacción PCR en colonia

Componentes	Volumen	Concentración final
H ₂ O	2.5 µL	--
ADN	--	>250 ng
Primer 1 (10 µM)	1 µL	1 µM
Primer 2 (10 µM)	1 µL	1 µM
2x Go taq mix	5 µL	1x
Volumen final	10 µl	

Tabla 12. Programa de PCR para la verificación de la construcción pCAMBIA1301-CrV1

Pasos	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94	30 s	
Alineamiento	52	30 s	30 ciclos
Extensión	72	45 s	
Extensión	72	10 min	1 ciclo

De las muestras positivas a la PCR en colonia se eligieron la clona uno y dos para inocular en 5 mL de medio LB líquido (25 gr/L) con kanamicina (50 mg/mL) y posteriormente extraer el vector. Con el vector aislado se realizó una segunda PCR empleando pCAMBIA 1301 como control, los mismos cebadores (Tabla 10) y el programa (Tabla 12) de la PCR en colonia. Para ello se empleó el Go taq green master mix (Promega) realizando la mezcla de reacción de la Tabla 13.

Tabla 13. Componentes de la reacción de PCR de comprobación.

Componentes	Volumen	Concentración final
H ₂ O	2.5 µL	--
ADN	0.5 µL	>250 ng
Primer 1 (10 µM)	1 µL	1 µM
Primer 2 (10 µM)	1 µL	1 µM
2x Go taq mix	5 µL	1x
Volumen final	10 µl	

4.17. Secuenciación

Las muestras de vector positivas se multiplicaron en *E. coli* Dh5 α , se extrajeron por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) y se prepararon para mandar a secuenciar al Laboratorio de Servicios Genómicos del LANGEBIO empleando los cebadores 62-84Pcamv, 265-45CR y pbinNost que se muestran en la Tabla 10.

4.18. Análisis de la secuencia

Empleando el software SnapGene^R V 6.0.2. se realizó el análisis de las secuencias realizando el alineamiento de estas para determinar si coincidían con el segmento de la construcción que se pretendía secuenciar el cual, comprendía la secuencia completa del gen, así como parte de sus secuencias adyacentes, es decir el promotor y el terminador.

V. Resultados

5.1. Obtención de ADN

La extracción mediante lisis alcalina permitió la obtención del vector PBSK-CrV1 (Figura 14). La PCR utilizando el vector PBSK-CrV1 y los cebadores NCOCRF y bstcrR permitió la amplificación de fragmento CrV1 con los extremos correspondientes a las enzimas de restricción *NcoI* y *BstEII* (Figura 15); esto demuestra tanto que el vector PBSK contiene el fragmento perteneciente a CrV1 como que el diseño de los cebadores fue correcto ya que la banda corresponde al tamaño esperado de 954 pb (Figura 13).

En el carril dos de la Figura 15 se observa el resultado de una extracción y purificación mediante lisis alcalina, técnica que permitió aislar el vector pCAMBIA1301 que sería digerido con enzimas para la ligación con CrV1; el corrimiento electroforético del vector aislado muestra un tamaño de banda que corresponde al tamaño del vector el cual consta de 11,850 pb.

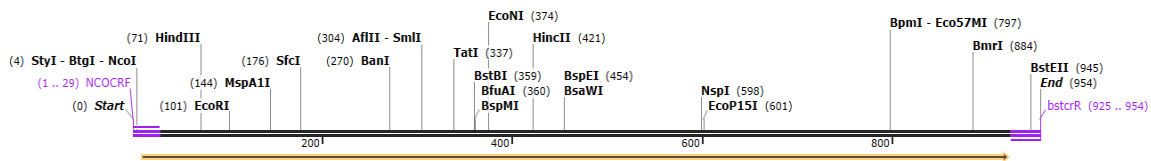


Figura 13. Esquema que muestra el producto de PCR de 954 pb *NcoI*-CrV1-*BstEII*.

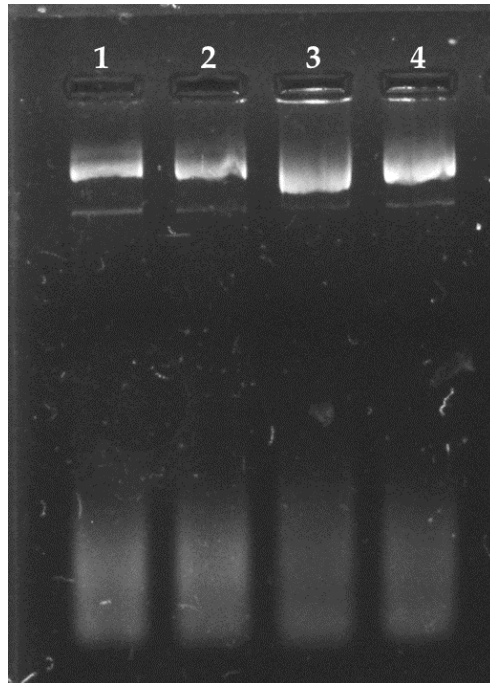


Figura 14. Electroforesis del vector pBSK-CrV1 extraído mediante lisis alcalina.

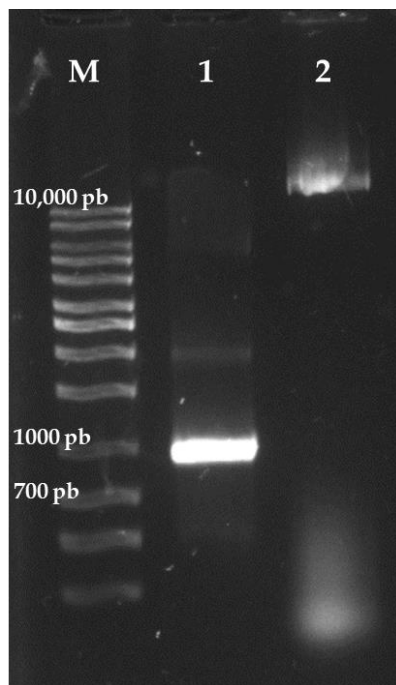


Figura 15. Electroforesis del amplicón *NcoI*-CrV1-*BstEII* y el vector pCAMBIA1301 extraído mediante lisis alcalina (carril 1 y 2 respectivamente). M: marcador de peso molecular Axygen 1kb.

5.2. Digestión con enzimas

Para la digestión se emplearon dos enzimas de restricción distintas: *NcoI* y *BstEII* las cuales permitirían la escisión de la secuencia perteneciente a GUS y del affinity tag 6xHis, dejando libre el espacio entre el promotor CaMV 35S y el terminador NOS necesarios para la expresión genética; por tanto, este espacio se pudo aprovechar para sustituirlo por el fragmento CrV1.

Del proceso de digestión con ambas enzimas se obtuvieron las bandas mostradas en el gel de electroforesis de la Figura 17, donde A es el fragmento CrV1 digerido el cual corresponde al tamaño esperado de 946 pb. En cuanto a la banda B, representa el vector pCAMBIA1301 cortado, del cual se esperaba un tamaño de 9789 pb una vez desprovisto de la secuencia GUS-6xHis la cual se representa con la letra C y corresponde al tamaño previsto de 2061 pb (Figura 16). La purificación de los productos de restricción se realizó para CrV1 y el fragmento grande del vector pCAMBIA1301, lo cual se muestra en la Figura 18.

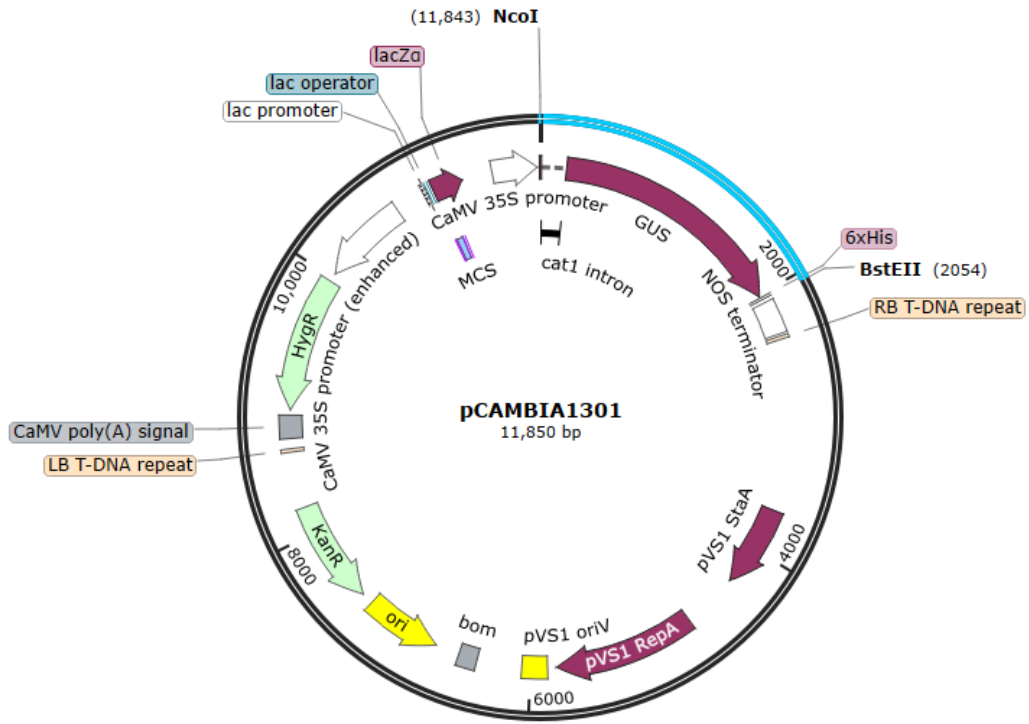


Figura 16. Esquema del vector pCAMBIA 1301, que muestra el fragmento que escinden las enzimas de restricción *NcoI* y *BstEII* (2061 pb).

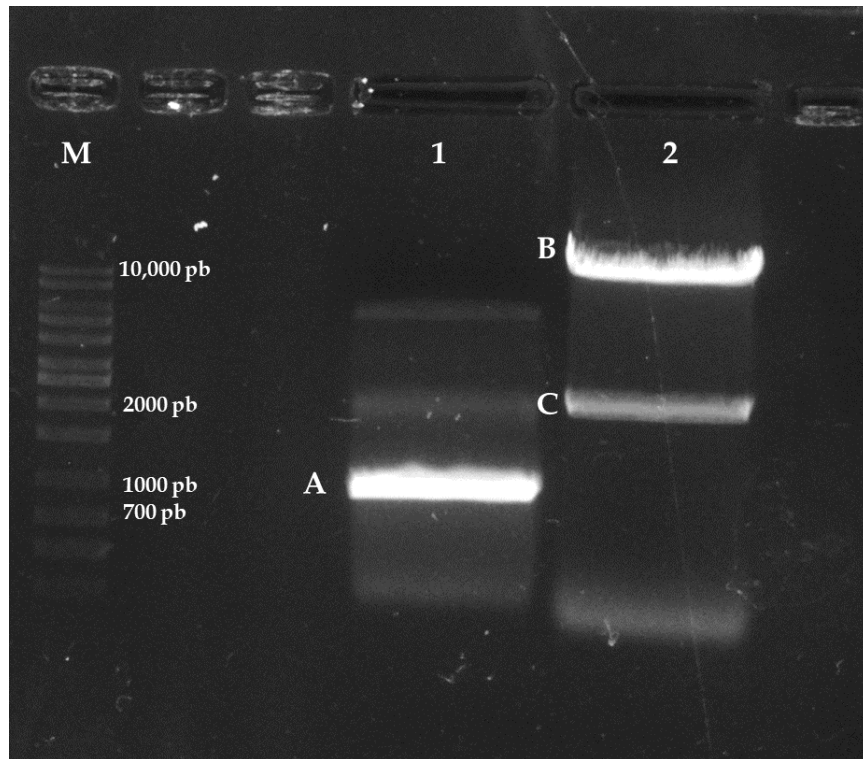


Figura 17. Electroforesis del producto de PCR *NcoI*-CrV1-*BstEII* y pCAMBIA1301, digeridos con *NcoI* y *BstEII*. Carril M: marcador de peso molecular de 1Kb de axygen, carril 1 *NcoI*-CrV1-*BstEII* digerido con *NcoI* y *BstEII*, carril 2 pCAMBIA1301 digerido con *NcoI* y *BstEII*.

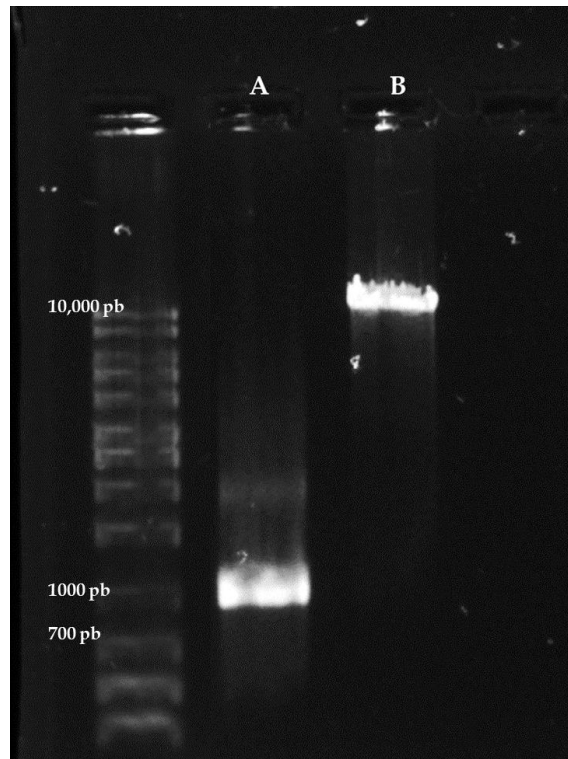


Figura 18. Producto de purificación en gel de CrV1 y pCAMBIA1301 tratados con las enzimas de restricción *NcoI* y *BstEII*. El carril A corresponde a CrV1, el carril B pertenece a el vector pCAMBIA1301 y M representa el marcador de peso molecular 1Kb Axygen.

5.3. Ligación

Los productos de ligación de las tres relaciones vector-inserto (1:1, 1:3 y 3:1) y un control negativo se emplearon para transformar la cepa *E. coli* Dh5 α y se sembraron en placas de selección para identificar las clonas que presumiblemente contenían la construcción esperada. De la transformación se obtuvieron en total 31 clonas, la mayoría pertenecientes al tratamiento 1:1 lo cual se puede observar en la Figura 19.

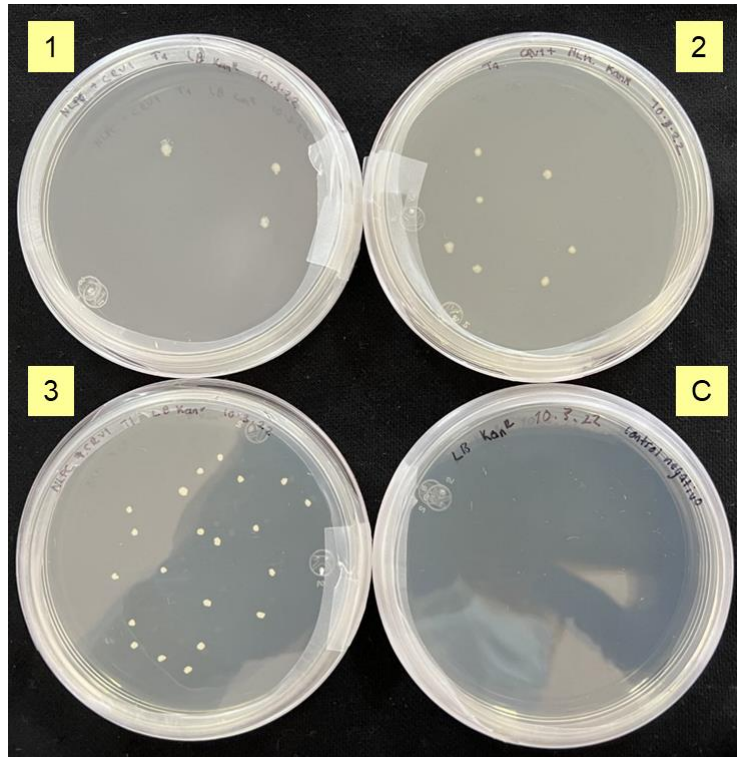


Figura 19. Clonas resultantes de la transformación genética de los productos de ligación. Las placas uno y dos corresponden al tratamiento de ligación 3:1, la placa tres pertenece a el tratamiento 1:1 y la letra C representa el control negativo.

5.4. PCR de comprobación

De las clonas resultantes del paso anterior, se seleccionaron 22 para realizar una comprobación mediante PCR en colonia, en donde la estrategia consistió en emplear cebadores específicos que amplifican entre la secuencia del promotor CaMV 35S y el terminador NOS lo cual, nos permitiría identificar si las clonas poseían el vector con el fragmento CrV1 clonado o se trataba del vector pCAMBIA1301 nativo. En caso de que el resultado fuera positivo, la banda amplificada tendría que contar con un tamaño de 1197 pb mientras que un resultado negativo corresponde a una amplificación de 2317 pb.

En la Figura 20 se muestra el resultado de la PCR en colonia, donde de las 22 colonias sometidas a prueba solo en 13 hubo amplificación siendo en todos los casos positiva para el constructo esperado.

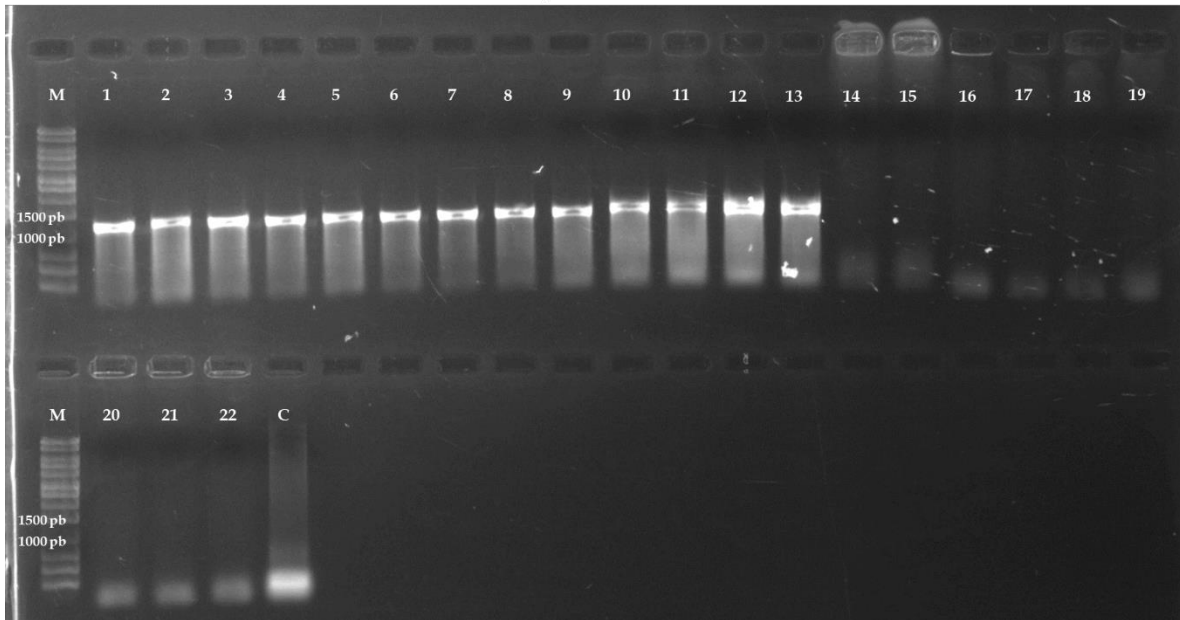


Figura 20. Corrimiento electroforético de la PCR en colonia, utilizando los cebadores pbinCamV y pbinNost. Se representan numeradas del 1 al 22 las colonias sometidas a prueba, la letra C corresponde al control negativo pBSK-CRV1 y M es el marcador molecular 1Kb Axygen.

Para mayor certeza se eligieron dos de las clonas que dieron positivo a la PCR en colonia y se les realizó una extracción plasmídica la cual se muestra en la Figura 21. Una vez purificada la construcción se realizó una PCR empleando la misma estrategia de la PCR en colonia, y para contrastar el resultado se empleó como control el vector pCAMBIA1301 nativo. En este caso se corrobora que ambas clonas presentaban el constructo esperado ya que como se muestra en la Figura 22 las clonas uno y dos (pertenecientes al carril A y B respectivamente) presentaron una amplificación prevista de 1197 pb. El carril C de la Figura 21 corresponde al resultado de la

amplificación del vector nativo pCAMBIA1301 empleado como control, el cual cuenta con el tamaño previsto de 2317 pb.

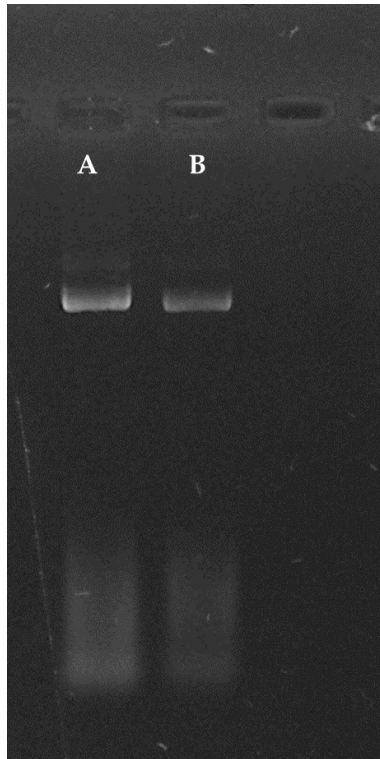


Figura 21. Purificación del constructo mediante lisis alcalina de las dos clonas seleccionadas.

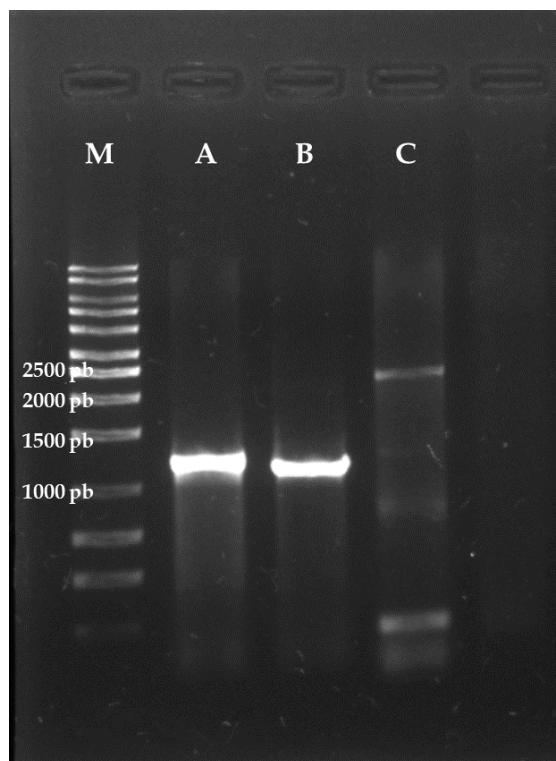


Figura 22. PCR utilizando los cebadores pbinCamV y pbinNost y el vector pBSK-CrV1 como sustrato. Vector de las clonas uno y dos pertenecientes al carril A y B respectivamente. El carril C corresponde al control pCAMBIA1301. M: marcador de peso molecular 1 Kb Axygen.

5.5. Secuenciación

Se obtuvo una secuencia para cada cebador, con las cuales se realizó el alineamiento mostrado en la figura 23, donde se observa que las secuencias se sobreponen y cubren en su totalidad la secuencia del gen CrV1, el promotor CaMV 35S y parte del terminador Nos. Además, las secuencias obtenidas con los cebadores 62-84Pcamv y 265-45CR (Figura 24) presentan el sitio restrictivo de la enzima *NcoI*, mientras que la secuencia obtenida con el cebador pbinNost (Figura 25) presenta el sitio restrictivo de la enzima *BstEII* demostrando la correcta inserción del gen en el vector pCAMBIA1301.

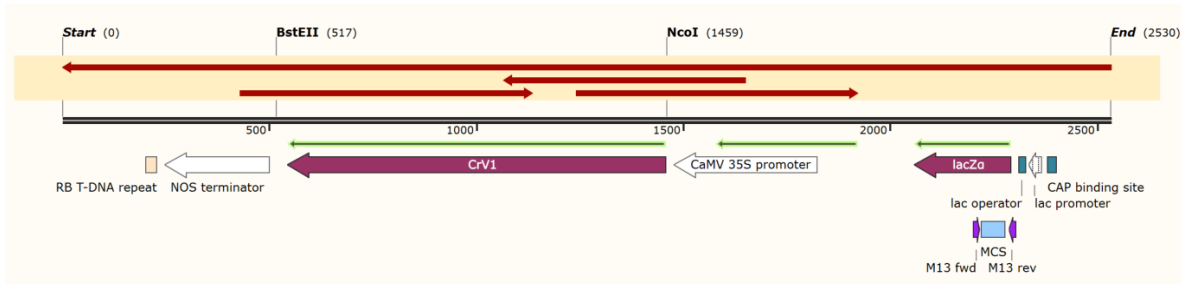


Figura 23. Alineamiento de las secuencias obtenidas y el constructo esperado.

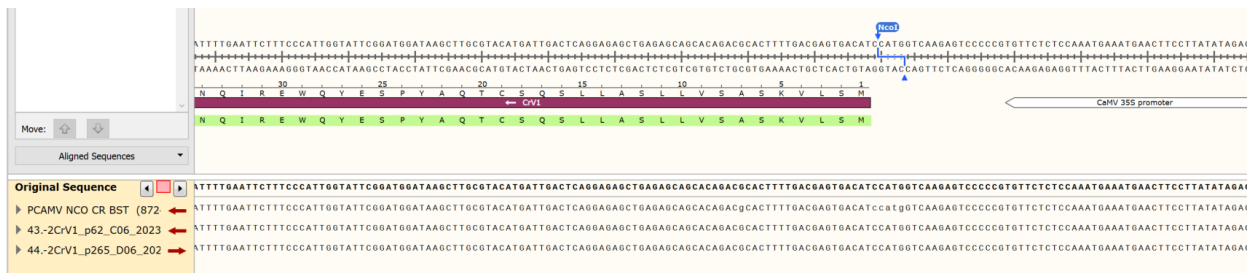


Figura 24. Secuencias obtenidas con los cebadores 62-84Pcamv y 265-45CR.



Figura 25. Secuencia obtenida con el cebador pbinNost.

VI. Discusión

En el curso de este trabajo se generó un vector para plantas el cual posee la secuencia codificante del gen CrV1 del bracovirus de *Cotesia rubecula*. Para ello se empleó el método de clonación tradicional con enzimas de restricción y ligasa; el cual, sigue siendo uno de los más empleados aún con el desarrollado de métodos más modernos, pues a pesar de que relativamente requiere un trabajo más laborioso, es más fácil monitorear los errores que se pueden cometer durante cada paso del proceso, determinando así si es conveniente continuar con la siguiente fase o hay que modificar alguna de las técnicas empleadas (Matsumura, 2015).

En el caso de este trabajo, los resultados de cada técnica empleada como fue la extracción de plásmidos, amplificaciones por PCR, reacciones de digestión y purificación de ADN, fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa lo cual nos dio la pauta para continuar con cada parte del proceso de la construcción del vector pCAMBIA1301-CrV1.

La construcción obtenida se verificó haciendo uso de la técnica de PCR empleando cebadores específicos del vector los cuales flanquean el sitio de inserción del gen, siendo así el tamaño del amplicón el que determinó la presencia del inserto puesto que al visualizar en un gel de electroforesis se obtuvieron las bandas correspondientes de 1197 pb.

Pese a que se detectó la presencia del inserto en la construcción, aun no era suficiente para confirmar la direccionalidad de este, aunque de cierta manera se esperaba fuera correcta debido a que en la digestión se emplearon dos enzimas de restricción distintas (*NcoI* y *BstEII*) lo cual según Sambrook *et al.*, 1989 asegura la obtención de construcciones con el inserto en la orientación deseada.

Para tener la certeza de la direccionalidad, así como de la presencia del inserto se optó por secuenciar muestras de los vectores positivos a la PCR de comprobación. Las secuencias resultantes cubrían la secuencia total del gen CrV1 así como del promotor y parte del terminador, presentando además los sitios restrictivos de *NcoI* y *BstEII* lo cual permitió determinar que el fragmento se encuentra en el sentido correcto y en el sitio establecido entre el promotor CaMV 35S y el terminador NOS.

El promotor es una secuencia de ADN que se encuentra aguas arriba del gen, la cual posee los sitios de unión para los factores de transcripción y la polimerasa, por lo cual es en esta región donde se inicia la transcripción génica, determinando el espacio y tiempo en que se expresa un gen (Addgene: Promoters, s/f; Grunennvaldt *et al.*, 2015). El promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) es uno de los principales promotores empleados para una alta expresión de transgenes en plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Amack & Antunes, 2020; Battraw & Hall, 1990), proporcionando así un amplio uso de la construcción obtenida para la expresión de CrV1 en gran diversidad de cultivos.

El terminador también es un elemento génico importante en la expresión del transgén. Este se encuentra aguas abajo del gen y contiene las regiones que determinan el final de la transcripción, la escisión del pre-ARNm y la poliadenilación del extremo 3' lo cual, es de suma importancia para la exportación y estabilidad del transcrito en la planta (De Felippes & Waterhouse, 2023); en este caso se empleó el terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.

La construcción obtenida se puede emplear posteriormente para la transformación genética de plantas empleando el método de transformación mediada por *Agrobacterium*, puesto que se trabajó con un vector binario. Aunque se espera que se pueda aplicar a gran variedad de cultivos, la construcción se diseñó específicamente para la transformación de crucíferas. Estudios anteriores

han demostrado la acción inmunosupresora de genes de PDV (Asgari *et al.*, 1997; Bitra *et al.*, 2012; X. Li & Webb, 1994; Suderman *et al.*, 2008; Thoetkiattikul *et al.*, 2005); en el caso de una de las plagas de las crucíferas, el lepidoptero *Pieris rapae*, se ha descrito la actividad inmunosupresora del gen CrV1 del PDV de *C. rubecula* el cual actúa despolimerizando de los filamentos de actina de los hemocitos provocando la muerte del lepidóptero, es por ello que se optó por emplear el gen CrV1. Además de actuar sobre los hemocitos de *P. rapae* sería deseable que el gen pueda actuar de igual manera en otras plagas, principalmente lepidópteros de importancia como *Manduca sexta*, *Plutella xylostella* y *Spodoptera exigua*, lo cual requiere futuros estudios.

VI. Conclusión

Se logró amplificar la secuencia codificante del gen CrV1 y, su posterior clonación debajo del promotor CaMV 35s en el vector de transferencia pCAMBIA1301, empleando el método tradicional con las enzimas de restricción *NcoI* y *BstEII*. Se confirmó mediante las técnicas de PCR en colonia y secuenciación que la construcción pCAMBIA1301-CrV1 se construyó conforme a lo esperado. El vector construido en el presente trabajo es apto para la transformación de plantas en general, lo cual se espera en un futuro sea de utilidad para combatir plagas, principalmente lepidópteros, siendo el uso de genes de PDVs con actividad insecticida una alternativa prometedora contra el uso de pesticidas disminuyendo los impactos ambientales y económicos que estos conllevan.

VII. Bibliografía

Abu-Arish, A., Frenkiel-Krispin, D., Fricke, T., Tzfira, T., Citovsky, V., Wolf, S. G., & Elbaum, M. (2004). Three-dimensional Reconstruction of *Agrobacterium* VirE2 Protein with Single-stranded DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25359–25363. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401804200>

Addgene: Promoters. (s/f). <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/promoters/#:~:text=A%20promoter%20is%20a%20region,translated%20into%20a%20functional%20protein.>

Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., Conrad, L. J., Gelvin, S. B., Jackson, D. P., Kausch, A. P., Lemaux, P. G., Medford, J. I., Orozco-Cárdenas, M. L., Tricoli, D. M., Van Eck, J., Voytas, D. F., Walbot, V., Wang, K., Zhang, Z. J., & Stewart Jr., C. N. (2016). Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. *The Plant Cell*, 28(7), 1510–1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>

Amack, S. C., & Antunes, M. S. (2020). CaMV35S promoter – A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Current Plant Biology*, 24, 100179. <https://doi.org/10.1016/J.CPB.2020.100179>

Anand, A., & Mysore, K. S. (2006). *Agrobacterium* biology and crown gall disease. En *Plant-Associated Bacteria* (pp. 359–384). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_11

- Arguedas, M. (2009). SOLUCIÓN TECNOLÓGICA Serie: Plagas y enfermedades forestales La “corona de agallas” (*Agrobacterium tumefaciens*). En *Kurú: Revista Forestal (Costa Rica)* (Vol. 6, Número 16).
- Asgari, S., Hellers, M., & Schmidt, O. (1996). Host haernocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene. En *Journal of General Virology* (Vol. 77). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-10-2653>
- Asgari, S., Schmidt, O., & Theopold, U. (1997). A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor. En *Journal of General Virology* (Vol. 78).
- Battraw, M. J., & Hall, T. C. (1990). Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- β -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Molecular Biology*, 15(4), 527–538. <https://doi.org/10.1007/BF00017828>
- Beck, M. H., & Strand, M. R. (2007). *A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0708056104
- beckage N. (1998). *Parasitoids and Polydnaviruses An unusual mode of symbiosis in which a DNA virus causes host insect immunosuppression and allows the parasitoid to develop*. <https://academic.oup.com/bioscience/article/48/4/305/270525>
- Beckage, N. E. (2008). *PARASITOID POLYDNAVIRUSES AND INSECT IMMUNITY*.
- 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)
- Bitra, K., Suderman, R. J., & Strand, M. R. (2012). Polydnavirus Ank proteins bind NF- κ B homodimers and inhibit processing of Relish. *PLoS Pathogens*, 8(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002722>
- Christie, P. J. (2009). Agrobacterium and Plant Cell Transformation. *Encyclopedia of Microbiology*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00115-2>
- 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>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Plasmids. *Molecular Biology*, 712–748. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00023-9>
- Danilova, S. A. (2007). The technologies for genetic transformation of cereals. En *Russian Journal of Plant Physiology* (Vol. 54, Número 5, pp. 569–581).
<https://doi.org/10.1134/S1021443707050019>
- de Buron, I., & Beckage, N. E. (1992). Characterization of a polydnavirus (PDV) and virus-like filamentous particle (VLFP) in the braconid wasp *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 59(3), 315–327.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2011\(92\)90139-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90139-U)

- De Felippes, F. F., & Waterhouse, P. M. (2023). Plant terminators: the unsung heroes of gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 74(7), 2239–2250. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac467>
- Desai, K., Solanki, B., Mankad, A. U., Pandya, H., Desai, K., Mankad, A., Desai, K. I., Society, P., & Deodar, T.-D. (2016). Genetic Transformation of Plants International Journal of Scientific Research and Reviews Genetic Transformation of Plants. *IJSRR*, 2019(2), 1792–1806. <https://www.researchgate.net/publication/343834521>
- Drezen, J. M., Provost, B., Espagne, E., Cattolico, L., Dupuy, C., Poirié, M., Periquet, G., & Huguët, E. (2003). Polydnavirus genome: Integrated vs. free virus. *Journal of Insect Physiology*, 49(5), 407–417. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00058-1)
- Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8(8), 380–386. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00162-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6)
- Espagne, E., Douris, V., Lalmanach, G., Provost, B., Cattolico, L., Lesobre, J., Kurata, S., Iatrou, K., Drezen, J.-M., & Huguët, E. (2005). A Virus Essential for Insect Host-Parasite Interactions Encodes Cystatins. *Journal of Virology*, 79(15), 9765–9776. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.15.9765-9776.2005>
- FAO. (2012). *Guia para la aplicacion de normas fitosanitarias en el sector forestal / Guide for the application of phytosanitary standards in the forestry sector*. FAO.
- FAO. (2022). *Cinco formas en las que el cambio climático intensifica las amenazas para la salud de las plantas*. <https://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1507930/>

- Fath-Goodin, A., & Webb, B. A. (2008). Polydnviruses: General Features. *Encyclopedia of Virology*, 256–261. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00472-6>
- Gao, H. S., Hu, R. M., Wang, Z. H., Ye, X. Q., Wu, X. T., Huang, J. H., Wang, Z. Z., & Chen, X. X. (2022). A Polydnvirus Protein Tyrosine Phosphatase Negatively Regulates the Host Phenoxidase Pathway. *Viruses*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/v15010056>
- Gill, T. A., Fath-Goodin, A., Maiti, I. I., & Webb, B. A. (2006). Potential Uses of Cys-Motif and Other Polydnvirus Genes in Biotechnology. En *Advances in Virus Research* (Vol. 68, pp. 393–426). [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)68011-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)68011-1)
- Glatz, R., Schmidt, O., & Asgari, S. (2003). Characterization of a Novel Protein with Homology to C-type Lectins Expressed by the *Cotesia rubecula* Bracovirus in Larvae of the Lepidopteran Host, *Pieris rapae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 19743–19750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301396200>
- Godfray, H. C. J. (2001). Parasitoids. En *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition* (pp. 674–682). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00152-0>
- Gomez, A. A. (2012). *Pesticides* (UK ed.). Nova Science Publishers.
- Gordon, J. E., & Christie, P. J. (2014). The Agrobacterium Ti Plasmids. *Microbiology Spectrum*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.PLAS-0010-2013>
- Grunenvaldt, R. L., Degenhardt-Goldbach, J., Gerhardt, I. R., & Quoirin, M. (2015). *Promoters used in genetic transformation of plants*.
- Haelterman, R. M. (2019). *Agalla de Corona*. Consejo Federal de Inversiones. https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/10082/INTA_CIAP_Insti

tutodePatologiaVegetal_Haelterman_R_Agalla_de_corona..pdf?sequence=2&isAllowed=y

Hely, P., Pasfield, G., & Gellatley, J. (1982). *Insect Pests of Fruit and Vegetables in NSW*.

Herlihy, M. V., & Van Driesche, R. G. (2013). Effect of *Cotesia rubecula* (Hymenoptera: Braconidae) on survival of larval cohorts of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) on collards: Evaluation of an introduced biological control agent. *Florida Entomologist*, 96(2), 360–369. <https://doi.org/10.1653/024.096.0256>

Hwang, H.-H., Yu, M., & Lai, E.-M. (2017). Agrobacterium -Mediated Plant Transformation: Biology and Applications . *The Arabidopsis Book*, 15, e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>

Kalyanasundaram, M., & Kamala, I. M. (2016). Parasitoids. En *Ecofriendly Pest Management for Food Security* (pp. 109–138). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00004-X>

Keshavareddy, G., Kumar, A. R. V., & S. Ramu, V. (2018). Methods of Plant Transformation- A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(07), 2656–2668. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.312>

Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J., & Komari, T. (2007). *Update on Binary Vectors Current Status of Binary Vectors and Superbinary Vectors*. <https://doi.org/10.1104/pp.107.105734>

Kroemer, J. A., & Webb, B. A. (2004). Polydnavirus Genes and Genomes: Emerging Gene Families and New Insights into Polydnavirus Replication. En *Annual Review of*

Entomology (Vol. 49, pp. 431–456).
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.072103.120132>

Lee, L. Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA binary vectors and systems. En *Plant Physiology* (Vol. 146, Número 2, pp. 325–332). American Society of Plant Biologists.
<https://doi.org/10.1104/pp.107.113001>

Legacy pCAMBIA Vectors – Cambia. (s/f). Recuperado el 5 de febrero de 2023, de
<http://cambia.org/welcome-to-cambialabs/cambialabs-projects/cambialabs-projects-legacy-pcambia-vectors-pcambia-legacy-vectors-1/>

Li, X., & Webb, B. A. (1994). Apparent Functional Role for a Cysteine-Rich Polydnavirus Protein in Suppression of the Insect Cellular Immune Responset. En *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 68, Número 11).

Li, Y. G., & Christie, P. J. (2018). The *Agrobacterium* VirB/VirD4 T4SS: Mechanism and Architecture Defined Through In Vivo Mutagenesis and Chimeric Systems. *Current topics in microbiology and immunology*, 418, 233. https://doi.org/10.1007/82_2018_94

Liu, F., Huang, W., Wu, K., Qiu, Z., Huang, Y., & Ling, E. (2017). Exploiting Innate Immunity for Biological Pest Control. En *Advances in Insect Physiology* (Vol. 52, pp. 199–230). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2017.02.001>

Lu, Z., Beck, M. H., & Strand, M. R. (2010). Egf1.5 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>

- Matsumura, I. (2015). Why Johnny can't clone: Common pitfalls and not so common solutions. *BioTechniques*, 59(3), IV–XIII. <https://doi.org/10.2144/000114324>
- Mubeen, H., Zahra Naqvi, R., Masood, A., Shoaib, M. W., & Raza, S. (2016). *Gene transformation: Methods, Uses and Applications*. <http://www.jpabs.org/>
- Pratiwi, R. A., & Surya, M. I. (2020). *Agrobacterium-Mediated Transformation*. www.intechopen.com
- Provost, B., Varricchio, P., Arana, E., Espagne, E., Falabella, P., Huguet, E., La Scaleia, R., Cattolico, L., Poirié, M., Malva, C., Olszewski, J. A., Pennacchio, F., & Drezen, J.-M. (2004). Bracoviruses Contain a Large Multigene Family Coding for Protein Tyrosine Phosphatases. *Journal of Virology*, 78(23), 13090–13103. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.23.13090-13103.2004>
- Ramsey, M. M., Korgaonkar, A. K., & Whiteley, M. (2009). Quorum-Sensing in Bacteria. *Encyclopedia of Microbiology*, 357–374. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00089-4>
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (1992). *Biología de las plantas*. Reverté. <https://books.google.com.mx/books?id=xvNd3udrh1YC>
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. En *New york: cold spring harbor laboratory press* (2nd ed.).
- Shelby, K. S., & Webb, B. A. (1999). Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. En *Journal of Insect Physiology* (Vol. 45).

- Strand, M. R. (2012). Polydnavirus Gene Products that Interact with the Host Immune System. En *Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens* (pp. 149–161). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384858-1.00012-6>
- Su, Y.-H., Liu, Y.-B., & Zhang, X.-S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4(4), 616–625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr007>
- Suderman, R. J., Pruijssers, A. J., & Strand, M. R. (2008). Protein tyrosine phosphatase-H2 from a polydnavirus induces apoptosis of insect cells. *Journal of General Virology*, 89(6), 1411–1420. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000307-0>
- Tanaka, K., Lapointe, R., Barney, W. E., Makkay, A. M., Stoltz, D., Cusson, M., & Webb, B. A. (2007). Shared and species-specific features among ichnovirus genomes. *Virology*, 363(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.034>
- Theilmann, D., & Summers, M. (1988). *Identification and comparison of Campoletis sonorensis virus transcripts expressed from four genomic segments in the insect hosts Campoletis sonorensis and Heliothis virescens.*
- Thoetkiattikul, H., Beck, M. H., & Strand, M. R. (2005). *Inhibitor B-like proteins from a polydnavirus inhibit NF-B activation and suppress the insect immune response.* www.cbs.dtu.dk/services/SignalP
- Tiwari, M., Mishra, A. K., & Chakrabarty, D. (2022). *Agrobacterium*-mediated gene transfer: recent advancements and layered immunity in plants. En *Planta* (Vol. 256, Número 2). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03951-x>

- Tzfira, T., Vaidya, M., & Citovsky, V. (2004). Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Nature* 2004 431:7004, 431(7004), 87–92. <https://doi.org/10.1038/nature02857>
- Volkoff, A. N., Béliveau, C., Rocher, J., Hilgarth, R., Levasseur, A., Duonor-Cérutti, M., Cusson, M., & Webb, B. A. (2002). Evidence for a Conserved Polydnavirus Gene Family: Ichnovirus Homologs of the CsIV Repeat Element Genes. *Virology*, 300(2), 316–331. <https://doi.org/10.1006/VIRO.2002.1535>
- Volkoff, A.-N., Ravallec, M., Bossy, J.-P., Cerutti, P., Rocher, J., Cerutti, M., & Devauchelle, G. (1995). The replication of *Hyposoter didymator* polydnavirus: Cytopathology of the calyx cells in the parasitoid. *Biology of the Cell*, 83(1), 1–13. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0248-4900\(96\)89926-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0248-4900(96)89926-6)
- Webb, B. A. (1998). *Polydnavirus Biology, Genome Structure, and Evolution*.
- Wei, L., Pérez-Rodríguez, M. Á., Tamez-Guerra, P., De Luna-Santillana, E. de J., Rosas-García, N. M., Villegas-Mendoza, J. M., & Rodríguez-Pérez, M. A. (2016). Improved insecticidal activity of a genetically modified baculovirus expressing the immunosuppressive CrV1 protein from a polydnavirus against *Spodoptera exigua*. *Biocontrol Science and Technology*, 26(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1072129>
- Whitfield, J. B., & Asgari, S. (2003). Virus or not? Phylogenetics of polydnaviruses and their wasp carriers. *Journal of Insect Physiology*, 49(5), 397–405. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00057-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00057-X)

Ye, X. qian, Shi, M., Huang, J. hua, & Chen, X. xin. (2018). Parasitoid polydnviruses and immune interaction with secondary hosts. *Developmental and Comparative Immunology*, 83, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.007>

Zaltsman, A., Krichevsky, A., Loyter, A., & Citovsky, V. (2010). *Agrobacterium* induces expression of a host F-box protein required for tumorigenicity. *Cell host & microbe*, 7(3), 197. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2010.02.009>