

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERIA



Obtención de una clona de *Rhizobium radiobacter* para la transformación de plantas con el gen *CcVI*

Por:

MAX S ALTUNAR MAURICIO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre. 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 ver 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, graficas, 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 institución educativa, organización, medio público o privado.



Max S Altunar Mauricio

Autor principal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Obtención de una clona de *Rhizobium radiobacter* para transformación de plantas con el
gen *CcVI*

Por:

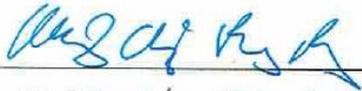
Max S Altunar Mauricio

TESIS

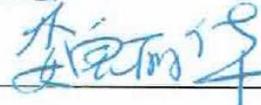
Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

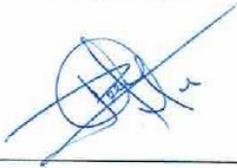
Aprobado por el comité de Asesoría:



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Director principal



Dra. Lihua Wei
Director externo



Dr. Valentín Robledo Torres
Co-Asesor



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Co-Asesor

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Obtención de una clona de *Rhizobium radiobacter* para transformación de plantas con el
gen *CcVI*

Por:

Max S Altunar Mauricio

TESIS

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

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobado por:

M.V. Silvia Patricia Acuña Álvarez
Presidenta

Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Secretario

Dr. Valentín Robledo Torres
Sinodal

Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Sinodal



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2024

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 el financiamiento para la realización de este trabajo a través del proyecto institucional de investigación 2445: Eficiencia en la Transformación Genética de *Brassica oleracea var. capitata* con tres cepas de *Rhizobium spp.*

A mi asesor el Dr. Miguel Angel Pérez Rodríguez por brindarme la confianza y la oportunidad de desarrollarme en diferentes áreas del laboratorio, sin dudar en ningún momento de enseñarme algo o responder alguna duda del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio por enseñarme todo lo necesario del laboratorio y de las técnicas que necesite para llevar a cabo este trabajo sin problemas.

A mis seres queridos mis padres, mis hermanas y hermanos por brindarme el apoyo moral y económico cuando más lo necesitaba, viendo siempre por mi salud tanto física como mental.

A mi novia Brenda Lizeth Hernández Hernández por brindarme su ayuda cada vez que lo necesitaba, palabras y apoyo incondicional, incluso servicios con los que yo no contaba y que fueron de gran ayuda para completar este trabajo.

Dedicatoria

A mis seres queridos, mis padres, mi hermano y mis hermanas.

Tabla de contenido

INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE FIGURAS	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. <i>R. radiobacter</i>	4
3.1.1. Historia.....	4
3.1.2. Ciclo de vida y patología	7
3.2. Sistema de transformación mediada por <i>R. radiobacter</i>	9
3.2.1 Mecanismo de transformación.....	9
3.2.2. Vectores binarios	11
3.2.3. Vector pCambia1301	12
3.3. Avispas parasitoides	13
3.3.1. Generalidades de la avispa parasitoide <i>Cotesia congregata</i>	15
3.3.2. Polidnavirus de avispas parasitoides.....	17
3.3.3. El gen CrV1	19
3.3.4. El gen CcV1	19
3.4. Transformación de <i>R. radiobacter</i> por el método de congelación/descongelación (freezer/thaw).....	21

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Transformación de <i>E. coli DH5α</i> con el vector pCambia1301-CcV1	25
4.1.1 Cultivo de colonia de <i>E. coli DH5α</i> transformada en medio LB + kanamicina	25
4.2. Extracción de ADN plasmídico.	26
4.2.1. PCR utilizando como sustrato el vector pCambia1301-CcV1 extraído de <i>E. coli DH5α</i>	28
4.3 Electroforesis de producto de PCR del ADN plasmídico extraído de cepas de <i>E. coli DH5α</i> transformadas.	32
4.4 Cultivo de <i>Rhizobium radiobacter LBA4404</i> en medio YEB + rifampicina	32
4.4.1 Preparación de células competentes de <i>R. radiobacter LBA4404</i>	33
4.5 Transformación de <i>R. radiobacter LBA4404</i> con el vector pCambia1301-CcV1 por el método de congelación/descongelación.....	33
4.6 Cultivo de <i>R. radiobacter LBA4404</i> transformadas con el vector pCambia1301-CcV1 en placas de medio YEB con antibióticos (kanamicina, rifampicina).....	34
4.7 PCR en colonias de <i>R. radiobacter LBA4404</i> transformadas con el vector pCambia1301-CcV1.	34
4.8 Electroforesis de ADN plasmídico de <i>R. radiobacter LBA4404</i> transformadas con vector pCambia1301-CcV1	35
V. RESULTADOS	36
5.1 Producto de PCR del vector pCambia1301-CcV1 extraído de <i>E. coli DH5α</i> transformada.	36

5.2 Colonias de <i>R. radiobacter</i> LBA4404 transformadas con el vector pCambia1301-CcV1.....	37
5.3 Electroforesis del producto de PCR de ADN de <i>R. radiobacter</i> LBA4404 transformadas con el vector pCambia1301-CcV1.....	38
VI. DISCUSIÓN.....	40
6.1 Comparación del método de congelación/descongelación con el método de electroporación.....	40
6.2 Transformación de <i>R. radiobacter</i> LBA4404 con el vector pCambia1301-CcV1	43
VII. CONCLUSIÓN.....	48
VIII. BIBLIOGRAFÍA:	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados en este estudio.	28
Tabla 2. Mezclas de reacción para realizar PCR	29
Tabla 3. Programa general de PCR.	29

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la estructura celular de <i>Rhizobium radiobacter</i> . Figura tomado de Manzanero et al., 2004.....	6
Figura 2. Ciclo de vida de la “corona de agallas” (<i>R. radiobacter</i>) en <i>Tectona grandis</i> . Tomado de Arguedas, 2009.....	8
Figura 3. Modelo del proceso de infección de las células vegetales por <i>R. radiobacter</i> . Tomado de Manzanero et al., 2004.	10
Figura 4. Sistema binario de vectores para transferencia de ADN mediante <i>R. radiobacter</i> tomado de Lee & Gelvin, 2008.	12
Figura 5. Mapa del vector pCambia1301 y sus componentes. Imagen tomada de Dong et al., 2021.	13
Figura 6. Ciclo de vida de avispas parasitoides. Tomada de Webb, 1998.	15
Figura 7. Ciclo de vida de polidnavirus. Tomado de Webb, 1998.....	18
Figura 8. Diagrama general de trabajo para transformar <i>R. radiobacter</i> LBA4404 con el vector pCambia1301-CcV1.	24
Figura 9. Mapa del vector pCambia1301-CcV1, sitios de unión de cebadores Pbinost y 986-1005cc.....	30
Figura 10. Mapa del vector pCambia1301-CcV1.	31
Figura 11. Mapa del vector pCambia1301.	32
Figura 12. Electroforesis para comprobar la transformación de las cepas de <i>E. coli</i> DH5 α con el vector pCambia1301-CcV1.	36

Figura 13. (A, B y C) Placas selectivas de medio YEB + kanamicina + rifampicina, inoculadas con *R. radiobacter* LBA4404 transformada con pCambia1301-CcV1 y (D) *R.*

radiobacter *LBA4404* sin
transformar.....37

Figura 14. Electroforesis de producto de PCR del vector pCambia1301-Ccv1 y pCambia1301..... 39

RESUMEN

La bacteria *R. radiobacter* puede vivir de manera saprofita en el suelo hasta por 2 años, esta bacteria también es conocida como la causante de la enfermedad de la agalla de la corona que se caracteriza por formar tumores en plantas susceptibles a *R. radiobacter*, nombrado así por los productores quienes notaron que la enfermedad se desarrollaba en la base de los árboles y en la unión de las raíces con el tronco. Se descubrió que el plásmido Ti le confería virulencia a *R. radiobacter*, lo que le permite a *R. radiobacter* transformar plantas. El estudio del plásmido Ti, llevo a descubrir las secuencias del borde izquierdo y derecho que delimitan el ADN-T, secuencia que se puede eliminar y permite usar el plásmido como vector de transferencia utilizando a *R. radiobacter* como mediador para introducir genes de interés en plantas. Las avispas parasitoides son organismos que necesitan en sus primeras etapas de desarrollo de un organismo huésped para desarrollarse, las familias de las avispas parasitoides, *braconidae* e *ichneumonidea* tienen un mecanismo para suprimir el sistema inmunológico del huésped (lepidópteros), utilizando virus llamados polidnavirus, entre ellos el CrV1 y CcV1, capaces de suprimir el sistema inmunológico del huésped y alterar el sistema neuroendocrino. En este trabajo se utilizó el método de congelación/descongelación para introducir el vector pCambia1301-CcV1 (portador del gen CcV1) en *R. radiobacter* LBA4404. En este trabajo se obtuvieron colonias de *R. radiobacter* LBA4404 transformadas con el vector pCambia1301-CcV1 que pueden ser utilizadas para transformar plantas susceptibles a *R. radiobacter*, se comprobó la transformación a través de PCR utilizando los cebadores del gen CcV1.

Palabras clave: *R. radiobacter*, ADN-T, vector binario, polidnavirus, *Cotesia congregata*, hemolinfa, gen CcV1.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los retos o problemas que tienen la mayoría de los agricultores es la pérdida de sus cultivos por plagas de insectos o enfermedades causadas por el daño o susceptibilidad a ellas provocadas por las plagas de insectos que atacan a los cultivos. Existen diferentes formas de enfrentar a las plagas de insectos, desde el uso de pesticidas hasta el control biológico, otra de las alternativas para el combate de plagas de insectos es el uso de plantas transgénicas que contienen un gen que ayude a combatir a las plagas de insectos.

Uno de los genes de interés que tiene el potencial de suprimir el sistema inmunológico de los lepidópteros es el gen CcV1, este gen se encuentra en la avispa parasitoide *Cotesia congregata* (Labropoulou et al., 2008), las avispas parasitoides son organismos que tienen un estilo de vida particular al necesitar de un organismo huésped para desarrollarse, alimentarse y que por lo tanto provocan la muerte del organismo que parasitan (Medina & Romero, 2011). El organismo huésped pierde la capacidad de desarrollarse e inhibe su alimentación (Beckage et al., 1990). El sistema inmunológico del huésped se ve comprometido, lo que favorece el crecimiento de las larvas de avispas hasta desarrollarse y emerger para iniciar el ciclo nuevamente.

R. radiobacter ha sido utilizado como mediador para la introducción de genes de interés en plantas y se obtiene como producto plantas transformadas con el gen de interés (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012). La introducción de un vector binario o ADN exógeno en las células de *R. radiobacter* es posible a través de diferentes métodos de transformación, entre ellos el método de congelación/ descongelación o también el método de electroporación.

La transformación de *R. radiobacter* requiere de un método sencillo, práctico, confiable y eficiente por ejemplo el método de congelación/descongelación para introducir un vector binario que contenga el gen de interés, y por lo tanto regenerar plantas transformadas resistentes a lepidópteros.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Transformar *R. radiobacter LBA4404* con el vector pCambia1301-CcV1

2.2 Objetivos específicos

- Utilizar el método de congelación/descongelación para introducir el vector pCambia1301-CcV1
- Verificar la introducción del vector pCambia1301-CcV1

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. *R. radiobacter*

3.1.1. Historia

En 1897, *R. radiobacter* fue aislada de tumores en plantas por Fridiano Cavara en Nápoles, Italia (Cavara, 1897). Lo que le dio el reconocimiento a *R. radiobacter* como la causa de la enfermedad de la agalla de la corona. Smith y Townsend denominaron a este organismo como *Bacterium tumefaciens* quien más tarde sería nombrado como *R. radiobacter* (Smith & Townsend, 1907).

En 1910 George Hedgcock publicó un compendio sobre la agalla de la corona de la vid, donde describe el aislamiento de la bacteria que causa la enfermedad de la agalla de la corona y así demuestra su tumorigenicidad (Kado, 2014). El nombre de la enfermedad de la corona fue nombrado por los productores quienes se dieron cuenta que la enfermedad se desarrollaba en la base de los árboles y la unión de las raíces con el tronco (Kado, 2014).

En ese entonces no se sabía cuál era el mecanismo de infección y como lograba producir tumores en una variedad de plantas. Braun y White demostraron que los tumores de la agalla de la corona estaban libres de bacterias, sugería que había una transformación genética de la planta huésped infectada (Braun & White, 1943).

La teoría más popular fue que *R. radiobacter* transformaba genéticamente a las células vegetales de las plantas y de esta manera se inducía la formación de tumores y por lo tanto se producía la enfermedad de la agalla de la corona (Chadha & Srivastava, 1971; Sahai Srivastava & Chadha, 1970). Se descubrió que era necesaria una herida para la infección de las células

vegetales, lo que significa que la pared celular vegetal es un tipo de barrera u obstáculo para que las bacterias lleven a cabo una infección. Entonces el ADN extraño era capaz de sobrevivir en las células vegetales al lograr introducirse por una herida en el huésped (Kado, 2014).

El descubrimiento de un plásmido que confería virulencia a *R. radiobacter*, hizo que los investigadores como María-Dell Chilton en el año 1977 se centraran en buscar ADN plasmático en células vegetales de la agalla de la corona; descubriendo la presencia de ADN extraño en el ADN total de las células tumorales vegetales. Esto significó la primera prueba de que un patógeno bacteriano logró transferir con éxito su propio ADN a células vegetales y en consecuencia que se desarrollaran tumores vegetales (enfermedad de agalla de la corona) (Kado, 2014).

Quedo establecido que un plásmido grande de *R. radiobacter* (plásmido Ti Figura 1) es el que le confiere virulencia (Gelvin, 2000). Los estudios posteriores se centraron en el mecanismo de transferencia horizontal de genes por *R. radiobacter* por ser el primer organismo que puede realizar una transferencia de genes entre el dominio Bacteria y Eukarya (Kado, 2009).

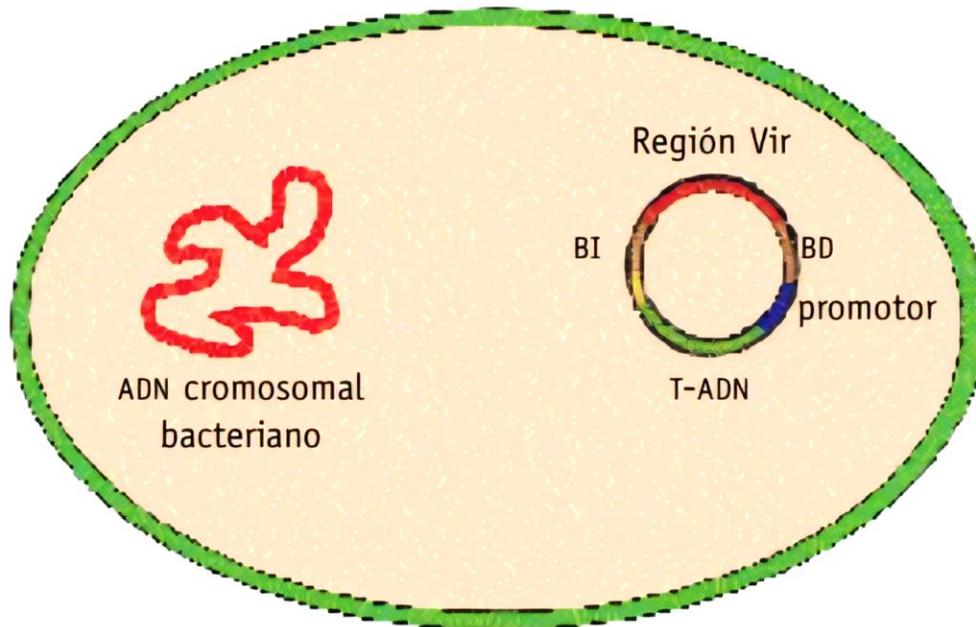


Figura 1. Esquema general de la estructura celular de *Rhizobium radiobacter*. Figura tomado de Manzanero et al., 2004.

La longitud del ADN-T (ADN transferido) varía en cada línea tumoral y está flanqueada en cada uno de los extremos por secuencias repetidas de 25 pares de bases (Wang et al., 1984; Yadav et al., 1982). El ADN-T se encuentra localizado en el núcleo de las células de la planta huésped y está unido covalentemente al ADN nuclear, la secuencia del borde derecho determina la dirección de la transferencia de ADN desde *R. radiobacter* al genoma de la planta. Las siguientes investigaciones se basaron en identificar las funciones que tenía el ADN-T en las células vegetales de la agalla de la corona, y que son líneas tumorales productoras de opinas (agrocinopina sintasa, octopina, nopalina), triptófano 2-monooxigenasa, fitohormonas (ácido indol-3-acético, citoquininas) (Gelvin et al., 1982; Joos et al., 1983).

El estudio de las funciones de los genes del ADN-T llevo al descubrimiento de la región vir, región que es necesaria para la virulencia. Cada operón de la región vir tiene la función de llevar a cabo el reconocimiento bacteriano de la planta huésped a través de interacciones distales y proximales (Rogowsky et al., 1987; Winans, 1992). Para que se exprese la región vir el operón se inicia mediante la detección de inductores químicos externos. El operón virB son los responsables de la tumorigénesis (Christie, 1997; Christie et al., 2005; O'Callaghan et al., 1999).

Las cepas de *R. radiobacter* inducidas por virulencia producen un pilus de 10 nm (T-pilus) (Lai & Kado, 2000). La maquinaria de tipo VI (T6SS) transloca una proteína que es similar a una punta de fago y ayuda a perforar a las células diana y se retícula gracias a la proteína actina (Pukatzki et al., 2007).

La transferencia del ADN-T culmina con su integración en el ADN nuclear de las células vegetales dianas (Kado, 2014).

3.1.2. Ciclo de vida y patología

R. radiobacter se encuentra en el suelo, puede vivir aproximadamente 2 años de manera saprofita en el suelo (Inoue et al., 1990). Logra penetrar (se mueve por quimiotactismo) a la planta a través de heridas producidas de manera natural (por insectos, nematodos, etc.) o artificial (trasplante de plantas, corte, etc.). Si la bacteria ha logrado penetrar a la planta u hospedero, estimula a las células a dividirse repetidas veces (tumorigénesis) hasta que aumentan considerablemente su tamaño (dando origen a tumores o agallas), al mismo tiempo inserta parte de su ADN en los cromosomas de las células de la planta (Figura 2). Además,

causa que se produzcan citoquininas y citoxinas, hormonas de crecimiento de la planta y opinas que son el alimento de las bacterias (Inoue et al., 1990).

Al paso del tiempo estas estructuras (tumores) se deteriorarán, presentan un color claro y tienen células multinucleadas sin epidermis, lo que la vuelve vulnerable a más patógenos o insectos, la biomasa o masa celular se “secará” resultado de la degradación celular y caerá al suelo (tumor o agalla) conteniendo la bacteria y liberándola al suelo reiniciando el ciclo (Arguedas, 2009).(Figura 2.)

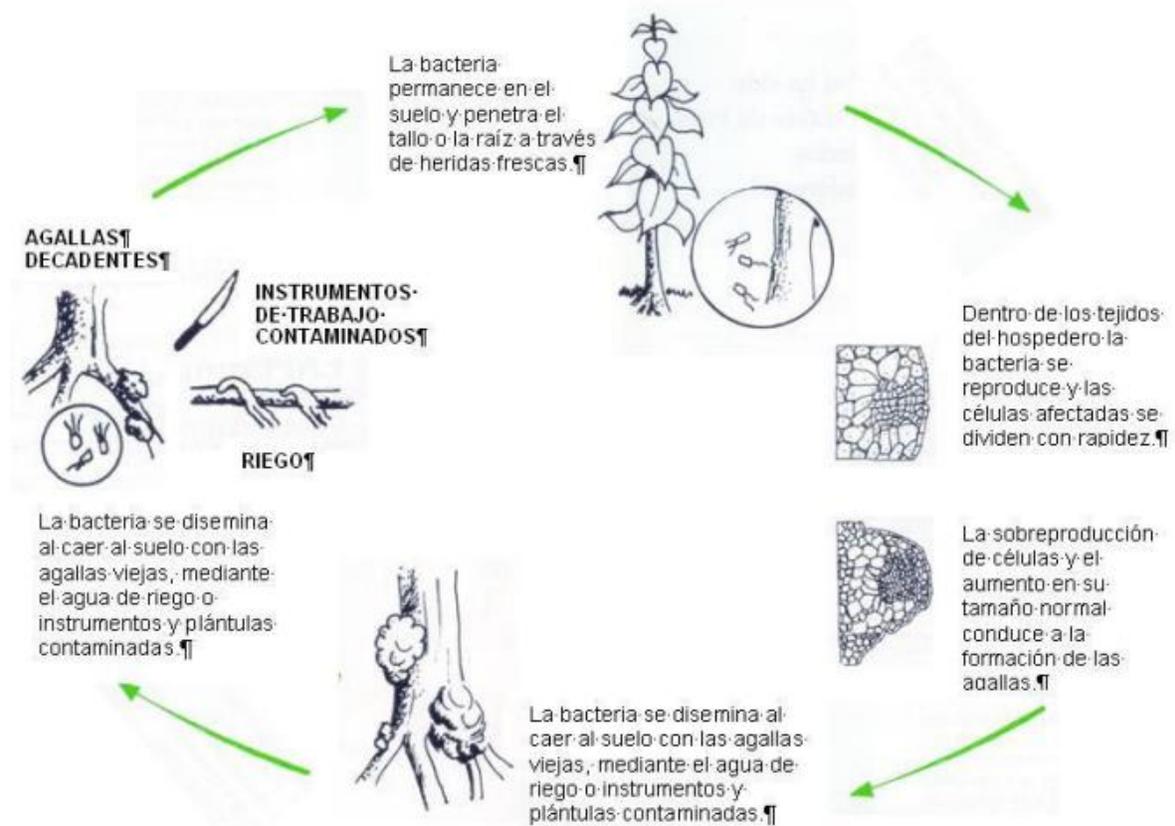


Figura 2. Ciclo de vida de la “corona de agallas” (*Rhizobium radiobacter*) en *Tectona grandis*. Tomado de Arguedas, 2009.

3.2. Sistema de transformación mediada por *R. radiobacter*

3.2.1 Mecanismo de transformación.

Por su capacidad y eficiencia para infectar diversos organismos vegetales se comenzó a utilizar *R. radiobacter*, como mediador para la introducción de genes de interés en plantas (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012). El diseño de vectores para la transformación genética de plantas mediante *R. radiobacter* fue posible al descubrir que solo las secuencias bordes del ADN-T son necesarias para que la transferencia pueda llevarse a cabo, porque todos o la mayoría de los genes del ADN-T pueden ser removidos y puede ser usado como vector sin generar los síntomas o causar la enfermedad de la agalla de la corona. Esto significó la transformación genética de especies de plantas dicotiledóneas, algunas monocotiledóneas susceptibles a *R. radiobacter*, y a su vez se pudo realizar estudios de la función y expresión de genes (Valderrama Fonseca et al., 2005).

El mecanismo de transferencia del ADN-T de *R. radiobacter* a la célula vegetal implica una serie de etapas complejas de interacción molecular entre la bacteria y la planta, incluyendo el reconocimiento y adherencia de la bacteria a las células vegetales, que se lleva a cabo mediante proteínas específicas como ChvA, ChvB, PscA y Att, según se ha identificado (Zhu et al., 2003). *R. radiobacter* detecta señales de plantas heridas mediante sensores proteicos como VirA y VirG reaccionan con compuestos fenólicos producidos por las plantas, promoviendo la activación transcripcional de los genes vir (Winans et al., 1994). Estos genes vir, regulados por una secuencia promotora específica que contiene sitios de unión para la proteína VirG fosforilada, se activan posteriormente, desencadenando la producción del ADN-T, un proceso facilitado por proteínas como VirD1 y VirD2(Figura 3). Una vez

generado, el ADN-T es exportado hacia la planta hospedera mediante un sistema de secreción tipo IV, que también se encarga de exportar factores de virulencia cruciales (Burns, 2003). Luego, el complejo formado por VirD2 y otras proteínas facilita la importación nuclear del ADN-T, donde puede integrarse en el genoma de la planta (Citovsky et al., 1994). Diversos factores, como la edad y el tipo de tejido vegetal, la cepa de *R. radiobacter* utilizada y las condiciones de inoculación, pueden influir en la eficiencia de este proceso (Grevelding et al., 1993).

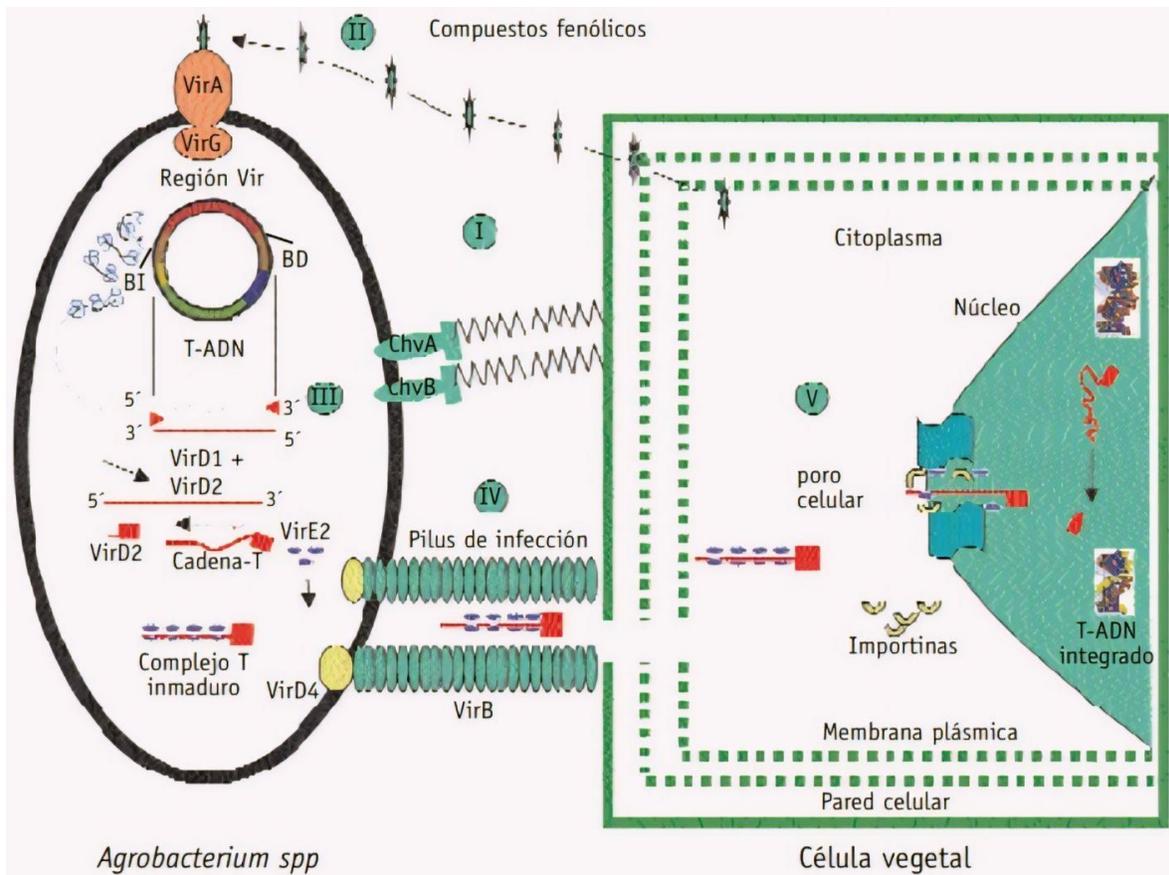


Figura 3. Modelo del proceso de infección de las células vegetales por *R. radiobacter*. Tomado de Manzanero et al., 2004.

Etapas de infección (Figura 3):

- I. Adhesión de la bacteria a la pared celular vegetal.
- II. Percepción de los compuestos fenólicos. Modulación de la expresión de los genes de virulencia de la bacteria (El operon *vir*, se encuentra ubicado en el plásmido Ti).
- III. Formación del complejo de transferencia de ADN-T.
- IV. Formación de un canal de transporte en la membrana celular bacteriana.
- V. Integración del ADN-T al genoma de la célula vegetal, proceso que supone una participación activa de las proteínas vegetales.

3.2.2. Vectores binarios

Los vectores binarios se utilizan para transferir genes o segmentos de ADN de interés a una planta (Eleftherianos et al., 2007). El vector binario, contiene los bordes del ADN-T que a su vez contiene el casete de expresión o genes de interés (Hellens et al., 2000).

Los vectores binarios contienen genes de resistencia a antibióticos para la selección del vector binario en *E. coli* y *R. radiobacter*, un origen(es) de replicación para permitir el mantenimiento en *E. coli* y *R. radiobacter*, secuencias repetidas de los bordes izquierdo y derecho del ADN-T para definir y delimitar el ADN-T, un gen marcador seleccionable activo en la planta (Lee & Gelvin, 2008) (Figura 4)

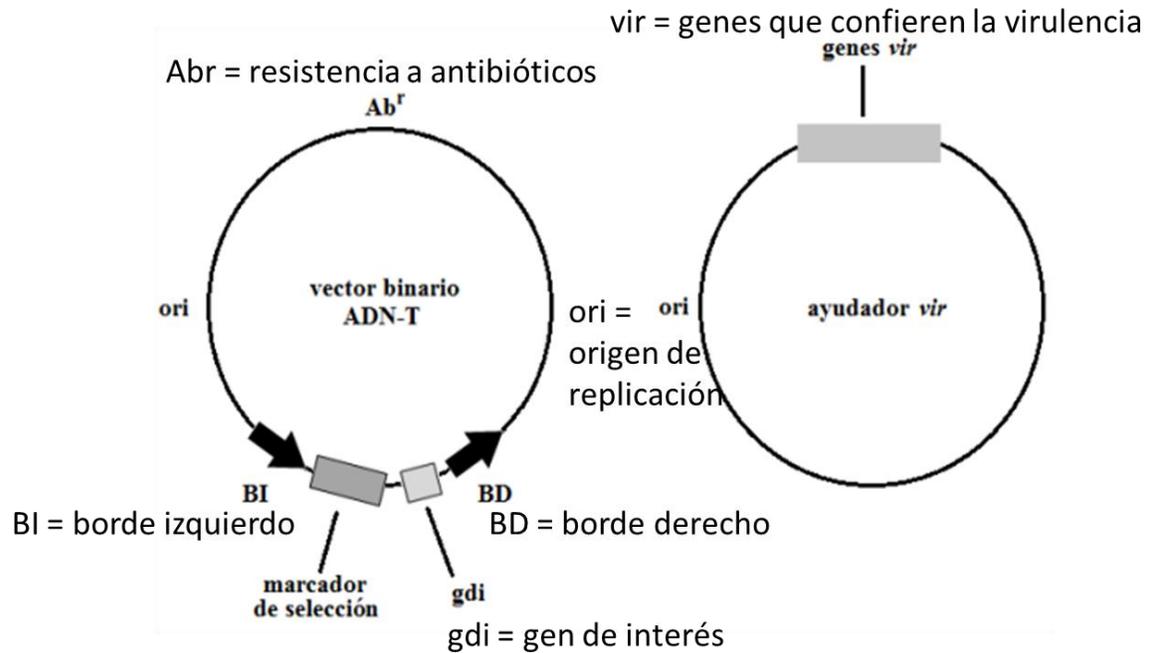


Figura 4. Sistema binario de vectores para transferencia de ADN mediante *R. radiobacter* tomado de Lee & Gelvin, 2008.

3.2.3. Vector pCambia1301

Este vector es utilizado para estudios de transformación (Kathiresan et al., 2009). Contiene un gen de resistencia a kanamicina para la selección bacteriana, un gen de resistencia a higromicina B para la selección de plantas y el gen marcador gus A. Un alto número de copias en *E. coli* para altos rendimientos de ADN. Contiene al replicón pVS1 para alta estabilidad en *R. radiobacter*.

Los genes de selección de plantas en los vectores pCambia1301 son expresados por una versión doble potenciadora del promotor CaMV 35 S y terminados por la señal poliA de CaMV 35 S. Este vector contiene la secuencia GUS (β -glucuronidasa, gen indicador impulsado por el promotor CaMV 35S)(Kathiresan et al., 2009). Adecuado para la inserción

de genes de interés que contengan su propio promotor y terminador (Figura 5).

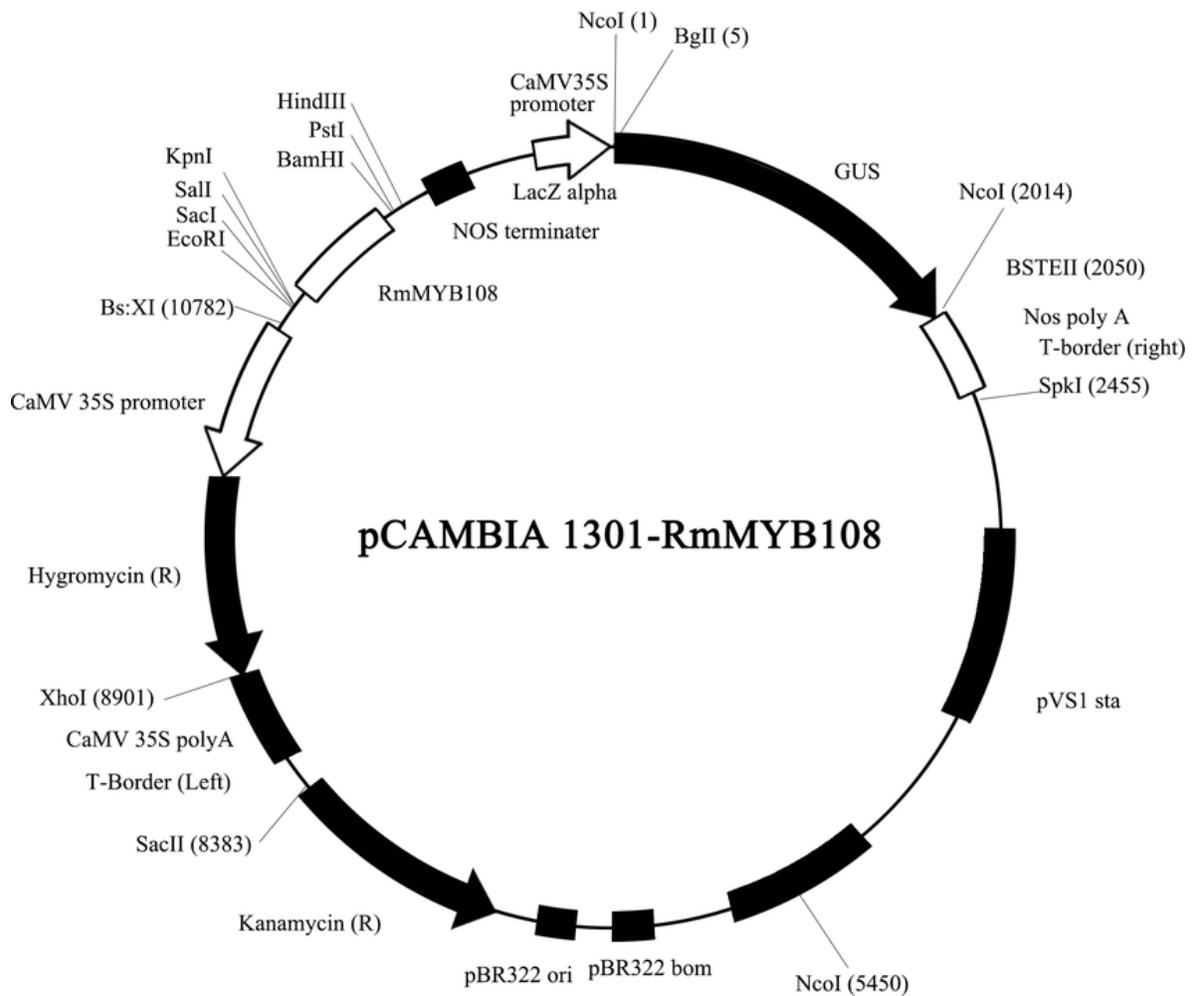


Figura 5. Mapa del vector pCambia1301 y sus componentes. Imagen tomada de Dong et al., 2021.

3.3. Avispas parasitoides

Según Medina y Romero las avispas parasitoides son un grupo de insectos que tienen un estilo de vida único y un papel importante en la regulación de las poblaciones de insectos. Las avispas parasitoides son insectos que en las primeras etapas de su desarrollo necesitan de un organismo huésped del cual alimentarse y en el que desarrollarse (Webb, 1998). Las avispas progenitoras depositan sus huevos dentro de un huésped, por ejemplo, un pulgón del chícharo

o una larva de mariposa. Los pulgones o las larvas sirven como incubadoras y fuentes de alimento para las larvas de las avispas parasitoides. Las larvas de las avispas se alimentan del interior del huésped hasta que están listas para emerger como nuevas avispas y continuar el ciclo de vida llamado "parasitismo" (Medina & Romero, 2011).

Conforme las larvas de las avispas se alimentan y se desarrollan dentro del huésped, lo van matando. Consumen y parasitan al mismo tiempo por ese motivo se llama "parasitoidismo". Algunas avispas parasitoides de las familias Braconidae e Ichneumonidae tienen estrategias efectivas para contrarrestar las defensas de los huéspedes. Para este caso en particular, se menciona la existencia de virus llamados "polidnavirus" (Kimenyi et al., 2016).

Estos virus se replican dentro del cuerpo de la avispa parasitoide y se introducen en el huésped cuando la avispa pone sus huevos en él y debilitan el sistema inmunológico del huésped, lo que facilita el desarrollo de la larva parasitoide (Figura 6).

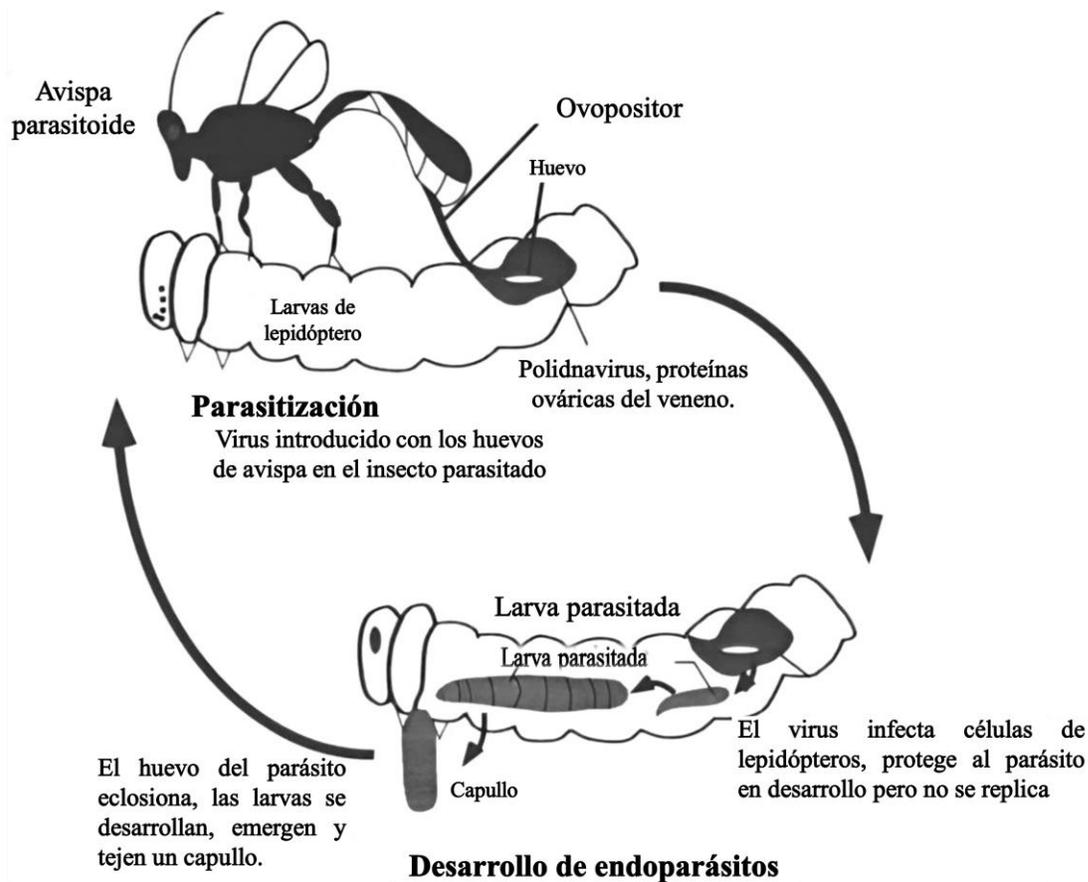


Figura 6. Ciclo de vida de avispas parasitoides. Tomada de Webb, 1998.

3.3.1. Generalidades de la avispa parasitoide *Cotesia congregata*

Según Beckage et al., 1994 los PDV de *C. congregata* se asemeja a otros PDVs encontrados en avispas braconidas endoparasitoides. Tiene un genoma de ADN segmentado, de más de 15 círculos de ADN de doble cadena. Estos círculos de ADN no están presentes en proporciones equimolares y varían en tamaño, con los más pequeños en el rango de 9 kb en una preparación y 5 kb en otra. Se estima que el genoma del PDV de *C. congregata* podría ser mayor de 300 kb, mientras que otros PDVs también tienen genomas de 100 kb o más (Fleming, 2003).

Los machos de *C. congregata* no producen formas extracromosómicas del virus, pero, los anticuerpos del PDV se hibridan con el ADN genómico de los machos, lo que sugiere que algunas secuencias virales del PDV están integradas en los cromosomas de los machos, a pesar de que aparentemente no están presentes los PDVs extracelulares en los machos (Webb & Summers, 1990).

El PDV induce alteraciones en el hospedero como en su desarrollo y fisiología (Beckage & Riddiford, 1982). Tiene efectos sobre el sistema neuroendocrino del hospedero, lo que lleva a la supresión de la producción de ecdisteroides (Webb & Summers, 1990).

En algunos casos, el hospedero puede encapsular a los parasitoides, pero esto no siempre resulta en la muerte del parasitoide. La encapsulación puede tener efectos en el desarrollo del hospedero, lo que sugiere una influencia del parasitoide incluso cuando se produce la encapsulación (Dushay & Beckage, 1993).

Beckage et al., 1994 describe el impacto del parasitismo por la avispa braconida *Cotesia congregata* en las larvas del hospedero *Manduca sexta*. El parasitismo incluye la inducción de la síntesis de nuevas proteínas en la hemolinfa (el equivalente de la sangre en insectos) (Uribe Soto, 1997), cambios en la depresión de la actividad de la monofenoloxidasas en la hemolinfa, alteraciones en los niveles de hormonas juveniles (JH), la inhibición de la alimentación, el crecimiento de la larva del hospedero, cambios en la pigmentación de la epidermis y los tejidos pericárdicos, básicamente todos los aspectos de la fisiología del hospedero se ven afectados por el parasitismo (Beckage et al., 1990).

El cambio más relevante causado por el parasitismo es la alteración del programa de desarrollo normal del hospedero. El desarrollo del hospedero se detiene en la etapa larval

antes de entrar en la fase de búsqueda de un lugar adecuado para pupar (Beckage & Riddiford, 1982).

El parasitismo por *C. congregata* provoca una serie de cambios significativos en las larvas del hospedero, incluida la interrupción del desarrollo normal, cambios en la función endocrina y alteraciones en el sistema inmunológico del hospedero (Beckage et al., 1994).

Según Webb, 1998 el sistema parasitoide *M. sexta/C. congregata* se caracteriza por una extensa expresión de genes virales en el huésped parasitado en términos de la duración y la gran cantidad de genes virales expresados, clasificados como genes de clase II (Webb, 1998).

3.3.2. Polidnavirus de avispas parasitoides

Existe una relación entre avispas parasitoides de las familias Braconidae e Ichneumonidae y los polidnavirus (PDVs) en el proceso de parasitismo exitoso de sus hospederos lepidópteros (mariposas y polillas) (Deng et al., 2000).

Los PDVs se transmiten de una generación de avispas a la siguiente (transmisión vertical), se replican exclusivamente en las células de un órgano reproductor de las avispas parasitoides llamado "calyx". Los virus se acumulan en el interior del órgano reproductor junto con los huevos de las avispas antes de ser inyectados en el hospedero durante la oviposición (Summers & Dib-Hajj, 1995).

Los PDVs, junto con otros factores inyectados por la avispa hembra en el hospedero, actúan para suprimir el sistema inmunológico del hospedero lepidóptero. Esto es vital para el éxito del parasitismo, ya que evita que el hospedero se defienda activamente de las larvas de la avispa. Se menciona que la expresión de genes virales en el hospedero parasitado afecta su

sistema inmunológico, particularmente los hemocitos (células sanguíneas) y el cuerpo graso (Strand & Pech, 2003).

Los detalles específicos de cómo los genes virales afectan al hospedero pueden variar según la especie de avispa parasitoide y su hospedero lepidóptero. Se mencionan proteínas virales específicas, como el EP1 (early protein 1) y el CrV1 (*Cotesia rubecula* virus 1), que desempeñan un papel en la inmunomodulación del hospedero. Por ejemplo, el CrV1 se ha demostrado que inhibe la polimerización de actina en el citoesqueleto de los hemocitos del hospedero, lo que temporalmente desactiva la función inmunológica de estas células (Hayakawa et al., 1994).

Las avispas parasitoides, los polidnavirus y sus hospederos lepidópteros, así como los virus y otros factores manipulan el sistema inmunológico del hospedero para asegurar el éxito del parasitismo (Webb, 1998) (Figura 7).

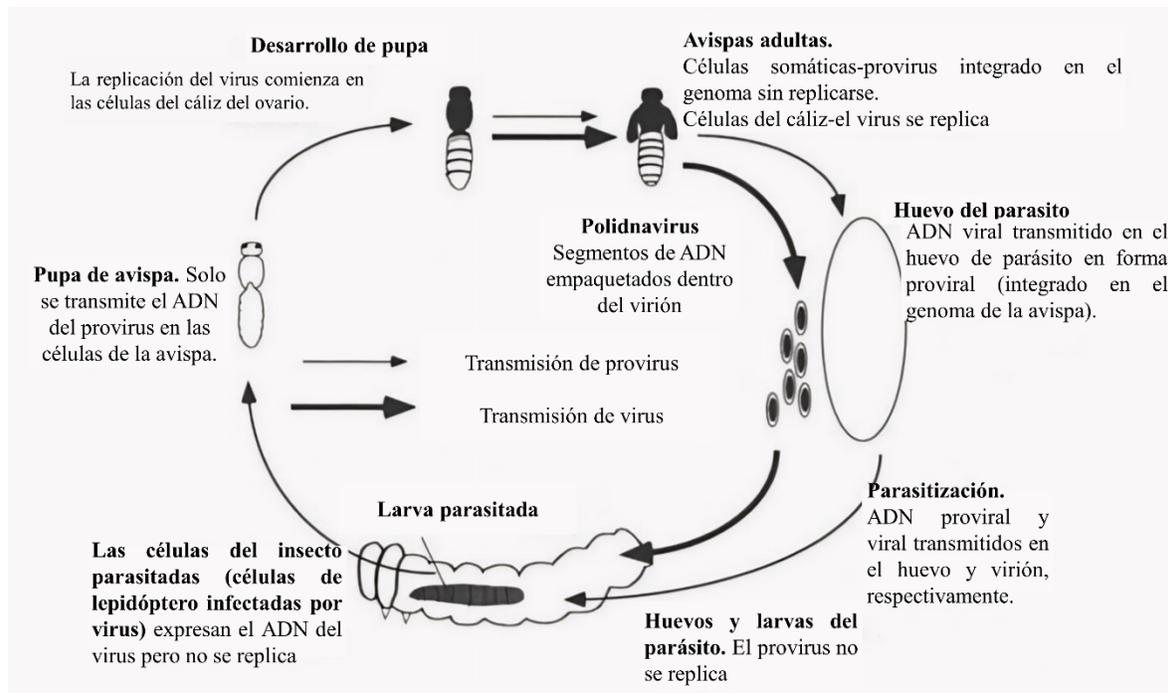


Figura 7. Ciclo de vida de polidnavirus. Tomado de Webb, 1998.

3.3.3. El gen CrV1

En este sistema parasitoide (*Cotesia rubecula/Pieris rapae*) se caracteriza por la expresión de un único transcrito viral llamado CrV1 en los hemocitos del huésped. La expresión de CrV1 conduce a la inactivación de los hemocitos del huésped, expresándose en los hemocitos del huésped de transcripción de forma transitoria (Asgari et al., 1996). Este transcrito viral es esencial para prevenir la encapsulación de los primeros instares del parasitoide por parte del sistema inmunológico del huésped (Asgari & Schmidt, 1994).

Las secuencias virales pueden encontrarse en el ADN genómico del huésped durante las etapas finales de la parasitación. Esto sugiere que los PDVs pueden integrar sus secuencias en el genoma del huésped, lo que podría tener implicaciones significativas en la transformación del genoma del huésped (Belle et al., 2002).

Le et al., (2003) realizó el análisis de la expresión del gen viral CrV1 en el sistema huésped/parásito entre *Cotesia rubecula/Pieris rapae*. La expresión de CrV1 es crítica en la inmunomodulación del huésped, y su regulación involucra factores virales y posiblemente factores no virales que pueden actuar en conjunto. La investigación también sugiere la posible integración de secuencias virales en el genoma del huésped.

3.3.4. El gen CcV1

Según estudios realizados por Labropoulou et al., 2008 la proteína CcV1 ejerce una supresión de la respuesta inmunológica del huésped a nivel celular, específicamente en relación con la capacidad de las células sanguíneas (hemocitos) para fagocitar bacterias.

La proteína CcV1 tiene un segundo nivel de acción en la supresión de la respuesta inmunológica del huésped. CcV1 no actúa solamente a nivel molecular, sino que también influye en las células del sistema inmunológico del huésped (Bettencourt et al., 1999).

La fagocitosis es un proceso mediante el cual las células del sistema inmunológico (hemocitos en este caso) engullen y destruyen bacterias u otros microorganismos invasores al huésped (Rojas-Espinosa & Arce-Paredes, 2004) CcV1 suprime la capacidad de los hemocitos para fagocitar bacterias tanto en experimentos realizados en placas de laboratorio (in vitro) como en experimentos en organismos vivos (in vivo) (Labropoulou et al., 2008).

Labropoulou et al., 2008 encontró que la función de CcV1 tiene relación con la inhibición de la endocitosis (el proceso de fagocitosis) no es específica de una especie en particular. Esto significa que CcV1 puede afectar a hemocitos de diferentes especies y no solo a una específica.

La hemolinfa tiene la capacidad de unirse a una molécula llamada LPS (lipopolisacárido) y causar aglutinación bacteriana. La aglutinación bacteriana es un proceso en el que las bacterias se agrupan, como parte de la respuesta inmunológica para combatir infecciones (Labropoulou et al., 2008).

Los investigadores descubrieron que cuando CcV1 interactúa con la hemolinfa, afecta negativamente la capacidad de la hemolinfa para unirse a LPS provocando aglutinación bacteriana. Esto significa que la interacción entre CcV1 y hemolinfa interfiere con una función importante de la hemolinfa en el sistema inmunológico (Bettencourt et al., 1999).

La interacción entre CcV1 y hemolinfa que ocurre en larvas que parasitan un huésped podría llevar a una "contra acción humoral" en el sistema inmunológico del huésped por lo tanto no

se activa la respuesta inmunológica del huésped para combatir la infección parasitaria, la interacción entre CcV1 y hemolinfa podría estar inhibiendo esa respuesta inmunológica (Amaya et al., 2005; Asgari et al., 1997).

Esta investigación arroja luz sobre cómo CcV1 puede debilitar la respuesta inmunológica del huésped a nivel celular. La proteína CcV1 interfiere con la función de la hemolinfa en el sistema inmunológico al enmascarar las repeticiones de reconocimiento de patrones de la hemolinfa. Esto podría tener implicaciones en la capacidad del sistema inmunológico para combatir infecciones parasitarias en larvas parasitadas (Labropoulou et al., 2008).

La entrada de la proteína CcV1 en las células puede ocurrir incluso en ausencia de factores de hemolinfa (componentes líquidos del sistema circulatorio de insectos) (Uribe Soto, 1997). Esto es importante porque estudios previos sugerían que la entrada de una proteína similar (CrV1) en hemocitos de otro organismo (*C. rubecula*) requería factores de hemolinfa.

Se sugiere que la interacción entre la hemolinfa y CcV1 compromete la función inmunológica de los hemocitos. Esto podría deberse a la interferencia tanto en la superficie celular (interacción de CcV1 con la hemolinfa que se une a los microorganismos) como en el interior de las células (interferencia con la estructura citoesquelética) (Labropoulou et al., 2008).

3.4. Transformación de *R. radiobacter* por el método de congelación/descongelación (freezer/thaw).

El método de transformación de congelación/descongelación es una técnica utilizada para introducir material genético (como plásmidos), en bacterias. Este método se centra en mejorar la eficiencia de transformación para obtener una mayor cantidad de colonias

bacterianas portadoras del material genético deseado. En contraste con otros métodos como la electroporación, este tipo de transformación se presenta como una alternativa simple, rápida, económica y práctica (De Groot et al., 1998).

El procedimiento implica el uso de células competentes tratadas con cloruro de calcio. Inicia con el crecimiento de células bacterianas en medio de cultivo, seguido por su enfriamiento en hielo y su resuspensión en solución de CaCl₂. Las células competentes así preparadas se mezclan con el ADN deseado, se mantienen a baja temperatura y luego se someten a un choque térmico elevando la temperatura a 42 °C durante unos minutos. Las células se recuperen en un medio sin antibióticos durante un periodo de 30 a 60 minutos a 37 °C, antes de ser sembradas en placas selectivas para su crecimiento y selección (Pope & Kent, 1996).

El método de transformación por choque térmico representa una técnica viable y accesible para la introducción de ADN en bacterias, su practicidad y bajo costo lo convierten en una opción valiosa para aplicaciones de clonación y transformación genética en bacterias (Gómez Arias et al., 2018).

Según los resultados de la investigación de Dityatkin et al., 1972 demostraron que, utilizando el método de congelación/descongelación de bacterias lograron que el ADN de un fago aislado (ADN Iq57) se introduzca en cepas de *E. coli* (*E. coli* C, K12, C600) y *Proteus vulgaris*.

Holsters et al., 1978 logra llevar a cabo la transfección y transformación de cepas de *R. radiobacter* B6S3 y B6-6 con el ADN del fago temperado PS8cc186, y la cepa Gv3100 de *R. radiobacter* con el plásmido tipo P RP4, utilizando el método de congelación/descongelación, recalando que sin el paso del choque frío no habría ninguna

transformación utilizando este método, porque no se crearían lesiones en la pared celular y la membrana de las bacterias, y de esta forma no habría logrado penetrar el ADN a las células.

En un experimento realizado por Vincze & Bowra, 2006 utilizaron diferentes colonias de rizobios (*mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti* y *Bradyrhizobium lupini*) y llevaron a cabo con éxito la transformación de estas cepas con el método de congelación/descongelación, empleando un vector binario genérico (pPZP211) de 9.3 a 10.9 kb.

Específicamente este experimento buscaba un método rápido y sencillo para llevar a cabo la transformación de rizobio, comparado a otros métodos como el método de transferencia conyugal que necesitan de mucho tiempo o la electroporación que necesita equipo especial, el método de congelación/descongelación resulto más efectivo tomando en cuenta esos dos aspectos. Se han obtenido resultados similares de una electroporación con *Azotobacter vinelandii* usando plásmidos de 4.8 a 24 kb (Korányi et al., 1998).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se realizó la transformación de *R. radiobacter* LBA4404 (Takara Bio USA, Inc.) con el vector pCambia1301-CcV1 y se utilizaron métodos moleculares para confirmación de dicha transformación, en la figura 8 se detalla en términos generales, el flujo del trabajo realizado.

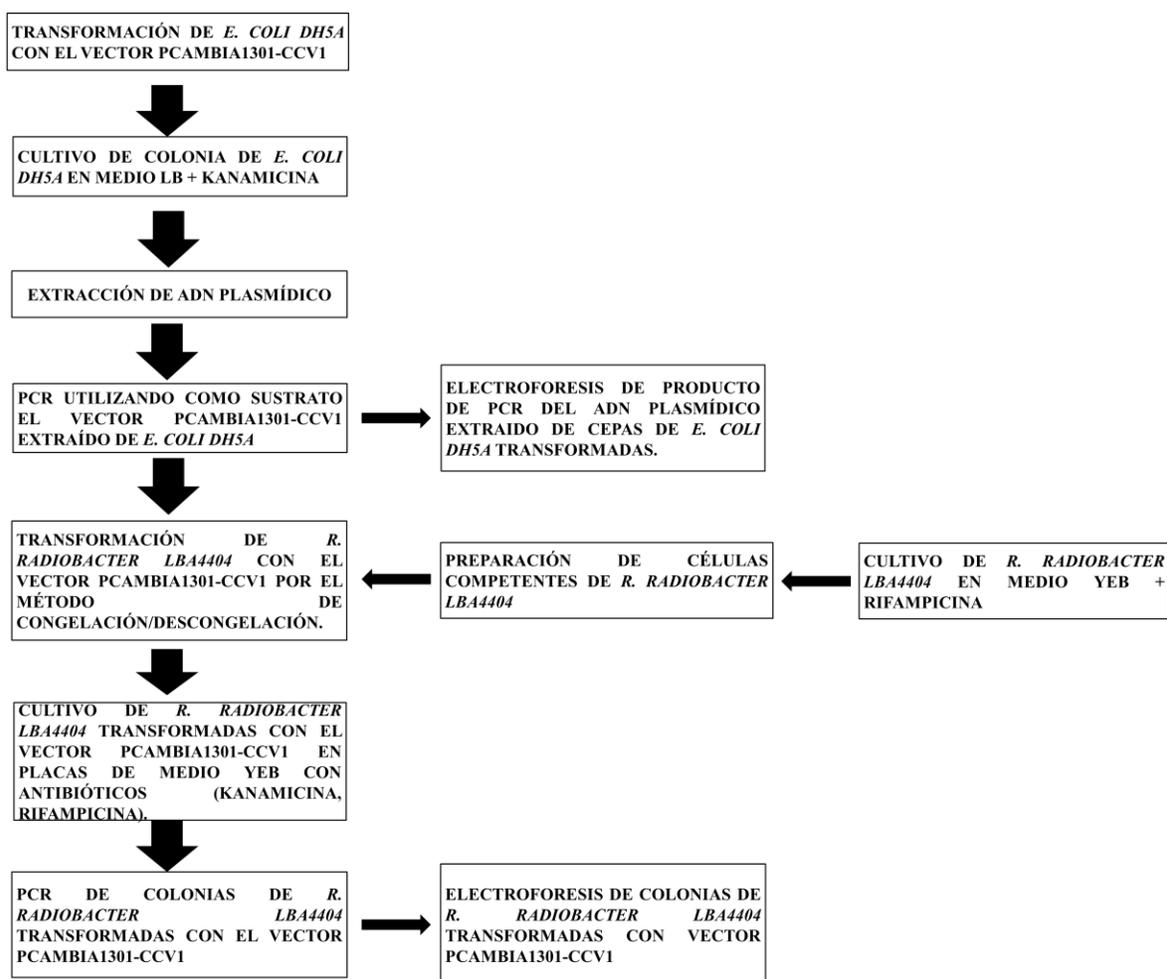


Figura 8. Diagrama general de trabajo para transformar *R. radiobacter* LBA4404 con el vector pCambia1301-CcV1.

4.1 Transformación de *E. coli DH5α* con el vector pCambia1301-CcV1

Para la transformación se realizó la preparación de dos muestras. En el primer caso, se adicionó > 10 ng de ADN del vector pCambia1301-CcV1 a un microtubo estéril de 1.5 ml, seguido de la incorporación de 100 µl de células de *E. coli DH5α* competentes. Se preparó un control negativo en otro tubo, utilizando agua ultrapura estéril en lugar del ADN plasmídico. Ambas muestras fueron colocadas en hielo durante un lapso de 30 minutos.

Posteriormente, los tubos fueron llevados a choque térmico de 30 segundos a 42°C. Tras del choque térmico los tubos fueron colocados nuevamente en hielo durante 5 minutos, para posteriormente añadir 1 ml de medio de cultivo LB (Caldo de lisogenia) a cada muestra.

Las células fueron cultivadas a una temperatura de 37°C, con agitación a una velocidad de 200 rpm, durante un lapso de 2 horas. Posteriormente se procedió a sembrar las muestras en placas de medio agar-LB con Kanamicina con una concentración de 50 µg/mL, que se incubaron a 37°C durante 12 horas.

4.1.1 Cultivo de colonia de *E. coli DH5α* transformada en medio LB + kanamicina

De las colonias resultantes de la transformación del paso anterior, una fue disuelta en 30 µl de agua ultrapura estéril. Posteriormente, 7.5 µl de la dilución fueron utilizados para inocular 5 ml de medio de cultivo LB adicionado con Kanamicina a una concentración de 50 µg/mL. Se incubó a 37°C con una agitación de 120 rpm durante 12 horas.

4.2. Extracción de ADN plasmídico.

Con el cultivo bacteriano del paso anterior, se realizó la purificación del ADN plasmídico utilizando el estuche de extracción Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA, A1460) de la siguiente manera:

El cultivo bacteriano se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se secó el tubo, invirtiéndolo sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de medio.

Posteriormente, se añadieron 250 μ l de la solución de resuspensión celular al sedimento bacteriano y se procedió a resuspender completamente las células mediante agitación vertical (moviendo el tubo de arriba hacia debajo de manera repetida) hasta su total resuspensión. Luego, las células completamente resuspendidas se transfirieron a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml.

Acto seguido, se agregaron 250 μ l de la solución de lisis celular al tubo y se mezcló invirtiéndolo cuatro veces. La mezcla se incubó hasta que la resuspensión de células se aclaró, aproximadamente durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Para continuar, se añadieron 10 μ l de la solución de proteasas alcalina al tubo y se mezcló invirtiéndolo cuatro veces. Posteriormente, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se procedió a agregar 350 μ l de solución de neutralización y se mezcló de inmediato invirtiéndolo cuatro veces. A continuación, el lisado bacteriano se centrifugó a máxima velocidad (alrededor de 13000 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se prepararon unidades de purificación de ADN plasmídico insertando una columna giratoria en un tubo de recolección de 2 ml para cada muestra. El lisado aclarado, aproximadamente 850 μ l, se transfirió a la columna, evitando alterar o transferir el precipitado blanco con el sobrenadante.

El sobrenadante resultante se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 1 minuto a temperatura ambiente. Luego, se retiró la columna de centrifugación del tubo de recolección, se eliminó el flujo del tubo y se volvió a insertar la columna giratoria en el tubo de recolección.

Se agregaron 750 μ l de la solución de lavado de columna, diluida previamente con etanol al 95%, a la columna de centrifugación. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente. La columna se retiró y se desechó el líquido filtrado.

El procedimiento de lavado se repitió con 250 μ l de solución y luego se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Seguidamente, se transfirió la columna a un microtubo de 1.5 ml estéril. Se procedió a hidratar (eluir) el ADN del plásmido, añadiendo 100 μ l de agua libre de nucleasas a la columna de centrifugación. Luego se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente en una microcentrífuga.

Finalmente, se retiró el microtubo de 1.5 ml, se eliminó la columna de purificación y se almacenó el ADN plasmídico purificado tapando el tubo de microcentrífuga y conservándolo a -20 °C.

4.2.1. PCR utilizando como sustrato el vector pCambia1301-CcV1 extraído de *E. coli* DH5a

Con la finalidad de corroborar la identidad del vector pCambia-CcV1, realizaron tres reacciones de amplificación utilizando los cebadores pBinNost y 986-1005cc (Tabla 2 y Figura 9), la mezcla de reacción para un volumen de reacción de 10 µl (Tabla 3), el programa de PCR de los cebadores Pbinnost y 986-1005cc con una Tm de 51°C (Tabla 4) y se adicionaron dos controles negativos. El primer control negativo fue el vector pCambia1301 y el segundo una reacción de agua ultrapura estéril.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia	Tm
Pbinnost	5'GTTAATTATTACATGCTTAACG 3'	50° C
986-1005cc	5 'GCTATTAAAGAGGCATTCA 3'	52° C
NCOCC	5' ATTCCATGGATGCCACCAACAAACGACTT 3'	64° C
BSTCC	5'ATTGGTCACCCTAAGAAATTGATGAGAAATGAGTT 3'	61° C
GUSF	5'TCGTCCGTCCTGTAGAAA 3'	53 °C
GUSR	3'TTCACCGAAGTTCATGCC 5'	53°C

Tabla 2. Mezclas de reacción para realizar PCR

Componente	Concentración Final
2X GoTaq Mix G2 Green	1X
Cebador F, 10μM	1.0 μ M
Cebador R, 10μM	1.0 μ M
ADN	<250ng
Agua libre de nucleasas	Aforar a 25 μ L

Tabla 3. Programa general de PCR.

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	30
Alineamiento	51,62,51	30 s	
Extensión	72	45 s	
Extensión	72	10 min	1

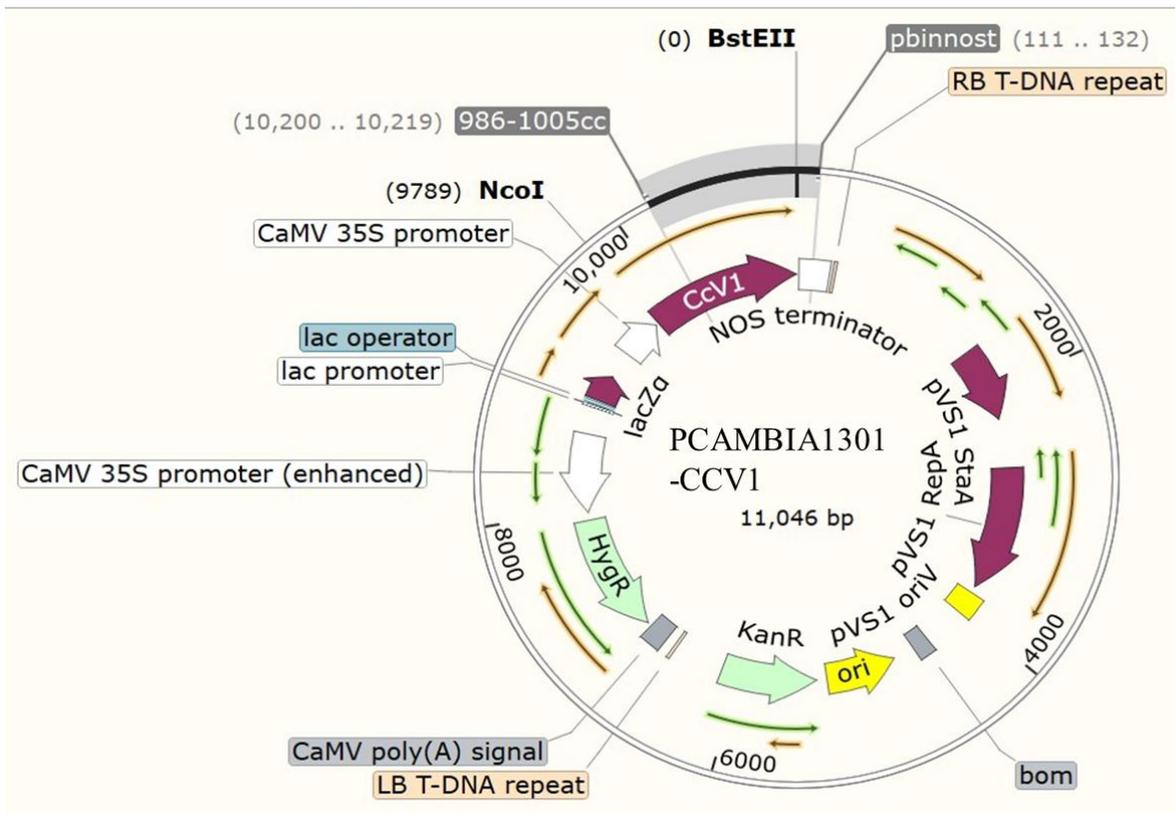


Figura 9. Mapa del vector pCambia1301-CcV1, sitios de unión de cebadores Pbinnost y 986-1005cc.

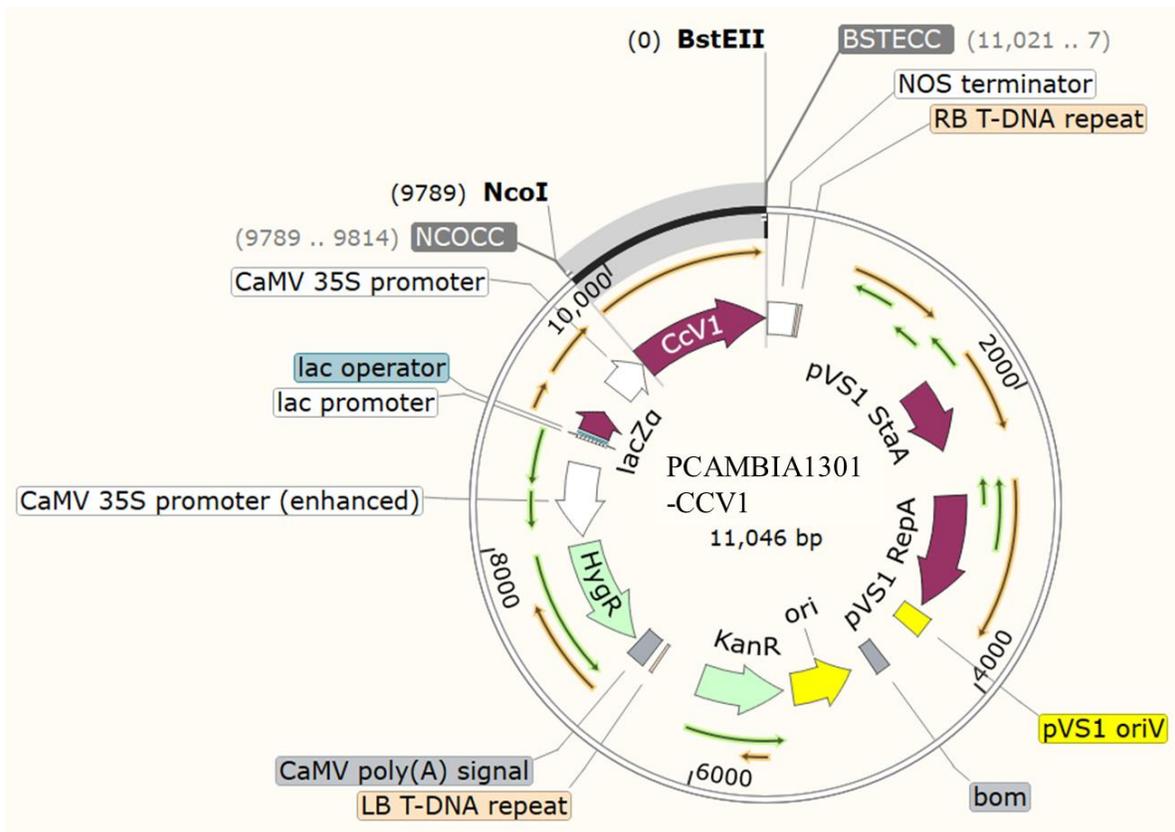


Figura 10. Mapa del vector pCambia1301-CcV1.

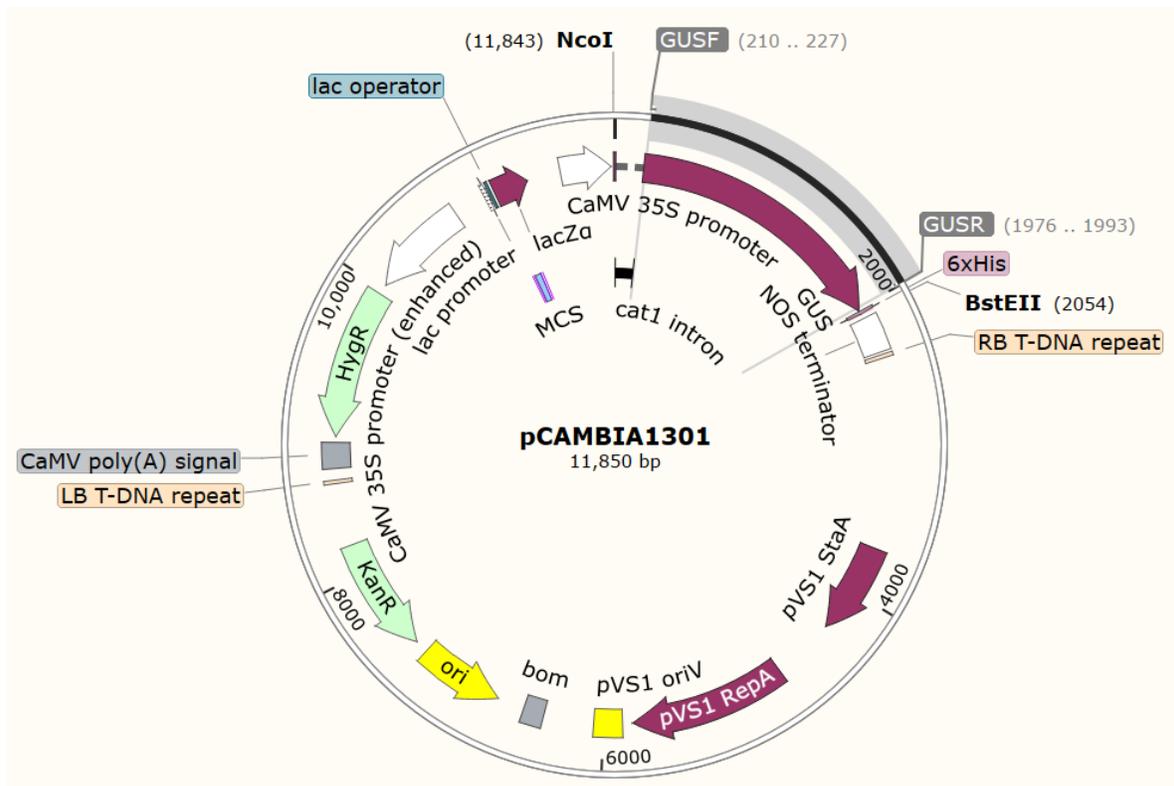


Figura 11. Mapa del vector pCambia1301.

4.3 Electroforesis de producto de PCR.

Los productos de la PCR anterior, fueron sometido a electroforesis. Para ello, se empleó 1 μ l de amortiguador de carga (5X Green Reaction Buffer cat M7911 + Diamond™ Nucleic Acid Dye cat H1181 de Promega, USA), el cual se combinó con 4 μ l del producto de PCR. Posteriormente, esta mezcla se corrió en electroforesis un gel de agarosa al 1% (TAE1X, 70V).

4.4 Cultivo de *R. radiobacter* LBA4404 en medio YEB + rifampicina

El inculo inicial de células de *R. radiobacter* LBA4404 fue tomado del estuche comercial de Takara Bio USA, Inc. (Cat 9115), se tomaron 10 μ l del contenido de un vial comercial

para inocular 5 ml de medio de cultivo YEB adicionado con rifampicina (50 µg/mL). Se incubó a 28°C con una agitación de 120 rpm por 12 horas.

4.4.1 Preparación de células competentes de *R. radiobacter* LBA4404

Se inoculó 10 µl de la cepa de *R. radiobacter* LBA4404 en 2 mL de medio líquido YEB rifampicina 50 µg/mL, se incubó a 28 °C en agitación a 120 rpm durante 48 h.

El cultivo anterior se utilizó para inocular 50 mL de medio YEB (rifampicina a una concentración de 50 µg/mL). La incubación continuó hasta que las células alcanzaron una OD₆₀₀ entre 0.5 y 1.0, se enfrió el cultivo sobre hielo.

Las células se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 10,000 RPM. Se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 5 mL de CaCl₂ (20 mM) frío y se repitió la centrifugación. Se desechó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 1 mL de CaCl₂ (20 mM) frío. Se hicieron alícuotas de 100 µL de la solución celular y se colocaron en microtubos de 1.5 ml previamente congelados. Los tubos con las células se almacenaron a -80°C para uso futuro.

4.5 Transformación de *R. radiobacter* LBA4404 con el vector pCambia1301-CcV1 por el método de congelación/descongelación.

La transformación de *R. radiobacter* LBA4404 con el vector pCambia1301-CcV1 se llevó a cabo siguiendo el protocolo de congelación/descongelación (Jyothishwaran et al., 2007).

En primer lugar, se prepararon dos microtubos de 1.5 ml para la transformación. En uno se colocaron >10 ng de ADN del vector pCambia1301-CcV1 y 100 µl de células competentes

de *R. radiobacter* LBA4404 preparadas en el paso anterior. Mientras que en el segundo microtubo se añadió 1 µl de agua ultrapura estéril y 100 µl de células competentes de *R. radiobacter* LBA4404 (como control negativo). Los tubos se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. Posteriormente, los dos microtubos fueron sumergidos en nitrógeno líquido durante 5 minutos.

Tras esta etapa, se procedió a descongelar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, se añadió a cada microtubo 1 ml de medio YEB, y se incubaron a una temperatura de 28°C durante 2 h con agitación de 200 rpm.

Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos, tras lo cual se eliminaron 600 µl de medio y se procedió a resuspender las células nuevamente con 1 ml de medio YEB con antibiótico (kanamicina, rifampicina a una concentración de 50 µg /mL).

4.6 Cultivo de *R. radiobacter* LBA4404 transformadas con el vector pCambia1301-CcV1 en placas de medio YEB con antibióticos (kanamicina, rifampicina).

Posteriormente, las bacterias transformadas fueron sembradas sobre placas selectivas que contenían medio YEB adicionado con Kanamicina y Rifampicina (50 µg/mL) y agar 1.5 g/100 ml. Las placas sembradas fueron incubadas a 28°C por 48 horas.

4.7 PCR en colonias de *R. radiobacter* LBA4404 transformadas con el vector pCambia1301-CcV1.

Para verificar el éxito de la transformación, se seleccionaron 4 colonias del paso anterior, con las cuales se realizó PCR en colonia utilizando los cebadores NCOCC y BSTCC (Figura 10)

para una T_m de 62°C (Tabla 4) para verificar la presencia del gen CcV1 en las cepas A1, B1, B2, C1 y se usó el vector pCambia1301, *R. radiobacter* LBA4404 sin transformar y agua como controles negativos.

Como segunda corroboración se utilizaron las mismas colonias con las cuales se realizó PCR en colonia utilizando el cebador GUSF y GUSR (Tabla 2), la mezcla de reacción utilizada se detalla en la Tabla 3 y, el programa de PCR de los cebadores GUSF y GUSR como se señala en la Figura 11, donde se consideró una T_m de 53°C (Tabla 4).

4.8 Electroforesis de ADN plasmídico de *R. radiobacter* LBA4404 transformadas con vector pCambia1301-CcV1

Los productos de PCR del paso anterior, se corrieron en electroforesis en gel de agarosa, para lo cual se empleó se empleó 1 µl de amortiguador de carga (5X Green Reaction Buffer cat M7911 + Diamond™ Nucleic Acid Dye cat H1181 de Promega, USA), el cual se combinó con 4 µl de cada una de los 14 productos totales de PCR con cebador GUSF y GUSR para verificar la ausencia del gen GUS y los cebadores NCOCC y BSTCC de las cepas A1, B1, B2, C1 y se usó el vector pCambia1301, *R. radiobacter* LBA4404 sin transformar y agua. Posteriormente, esta mezcla se cargó en un gel de agarosa al 1% (TAE1X, 70V).

V. RESULTADOS

5.1 Verificación por PCR del vector pCambia1301-CcV1

En la figura 12 podemos observar la banda esperada en el carril “1” que corresponde a la amplificación de una parte del gen CcV1 y la región NOS, esta banda evidencia que amplificó con los cebadores Pbinnost y 986-1005cc. Esto confirma que se llevó a cabo la transformación de las cepas de *E. coli DH5α* con el vector pCambia1301-CcV1.

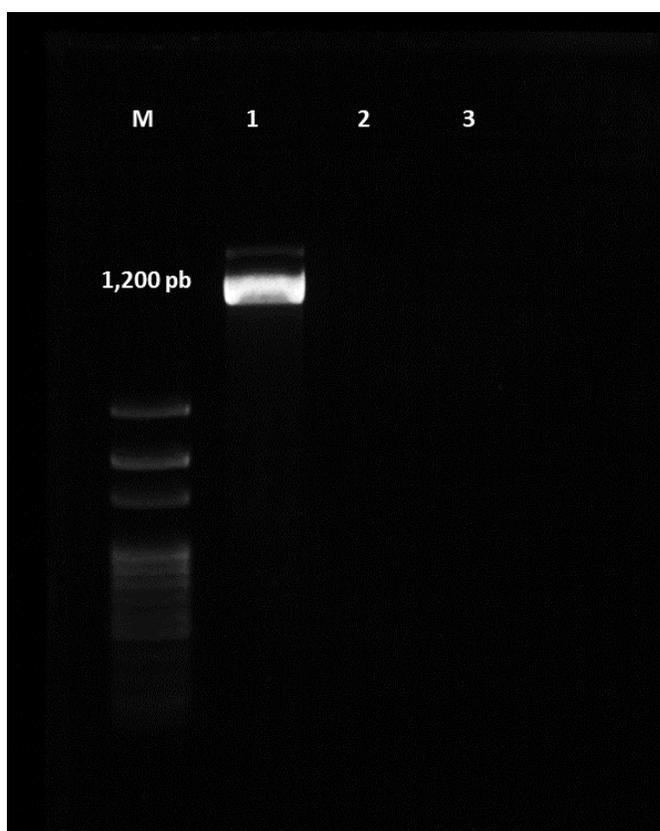


Figura 12. Electroforesis para comprobar la transformación de las cepas de *E. coli DH5α* con el vector pCambia1301-CcV1.

5.2 Colonias de *R. radiobacter* LBA4404 transformadas con el vector pCambia1301-CcV1

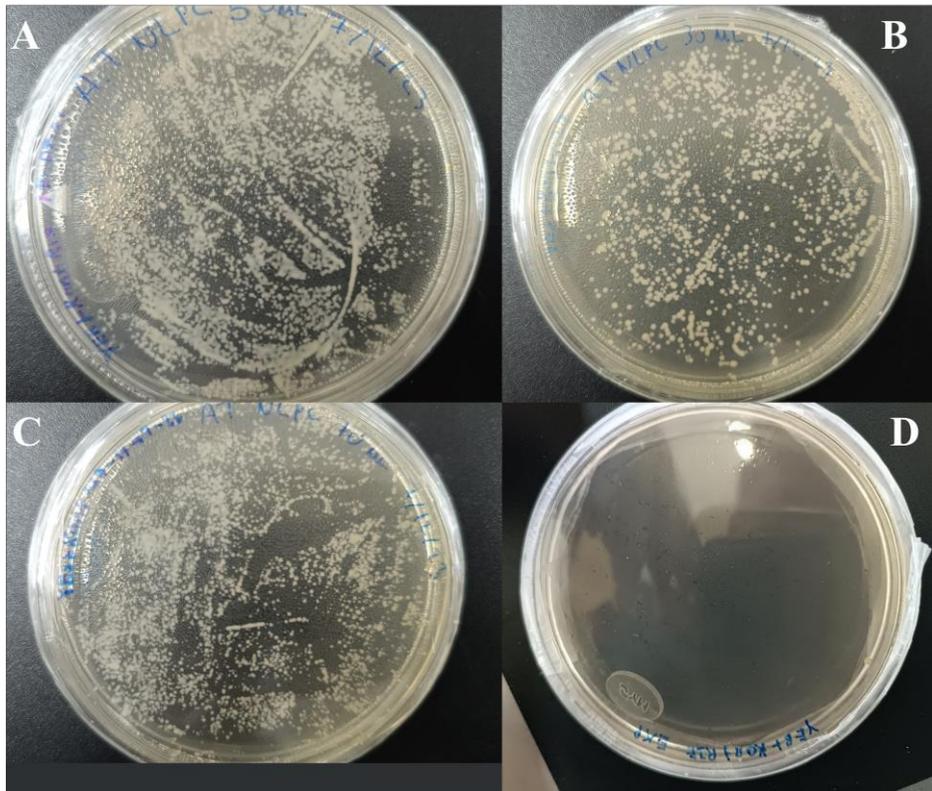


Figura 13. (A, B y C) Placas selectivas de medio YEB + kanamicina + rifampicina, inoculadas con *R. radiobacter* LBA4404 transformada con pCambia1301-CcV1 y (D) *R. radiobacter* LBA4404 sin transformar.

Se observaron colonias en las placas A, B y C (figura 13) a las 48 h, lo que indica la presencia de cepas de *R. radiobacter* LBA4404 con el vector pCambia1301-CcV1 que contenía resistencia a kanamicina. Como control negativo, se colocaron cepas de *R. radiobacter* LBA4404 sin transformar en la placa D; al no poseer el gen de resistencia a estos antibióticos, no crecieron y, por ende, no mostraron colonias incluso después de 72 h. La ausencia de colonias en la placa D confirmó la efectividad de los antibióticos en el medio de cultivo y respaldó el crecimiento de las cepas de *R. radiobacter* LBA4404 con el vector pCambia1301-CcV1.

5.3 Verificación de la transformación de *R. radiobacter* LBA4404 transformadas con el vector pCambia1301-CcV1

En la figura 14 en el carril “5” se observó la banda del control positivo que amplificaban los cebadores GUSF y GUSR (Figura 11); en el carril se encontraba el vector pCambia1301 que contenía el gen GUS. No se observaron bandas en los carriles “1, 2, 3, 4” correspondientes a las colonias de *R. radiobacter* LBA4404 que se transformaron en este experimento (A1, B1, B2, C1). En los carriles “6” y “7” del lado del cebador GUS se encontraban los controles negativos, (agua y células de *R. radiobacter* LBA4404 sin transformar), y no se observó ninguna banda, lo que indico que no hubo contaminación, ni presencia del gen GUS en el producto de PCR de estas muestras. El carril “8” contenía el marcador molecular Axygen de 1 kb, la banda del carril “5” se encontró más arriba de 10 kb, lo que corresponde al tamaño del vector pCambia1301 que contiene el gen GUS (11,850 pb).

En la figura 14 los carriles “9, 10, 11 y 12” se encontró el producto de PCR de las colonias de *R. radiobacter* LBA4404 transformadas con el vector pCambia1301-CcV1. Se observaron las bandas esperadas en los carriles “9, 10, 11 y 12” lo que confirmo la amplificación del vector pCambia1301-CcV1 con los cebadores NCOCC y BSTCC (figura 10), indicando que estas colonias contienen el gen CcV1. Las bandas de estas colonias (carril “9-12”) se encontraron más arriba de 1.2 kb, mostradas con el marcador de peso molecular Axygen de 1 kb, lo que corresponde el tamaño aproximado del gen CcV1 que se encuentra en el vector pCambia1301-CcV1 (Fig.10). Esto confirmo la transformación de las células de *R. radiobacter* LBA4404 con el vector pCambia1301-CcV1.

En la figura 14, en el carril “13” se encontraba el producto de PCR del vector pCambia1301 con los cebadores NCOCC y BSTCC (figura 10). El vector pCambia1301 no contiene la

secuencia del gen CcV1, por lo que no se mostró ninguna banda. En el carril “14” se encontraba el producto de PCR de las colonias de *R. radiobacter* LBA4404 sin transformar con los cebadores NCOCC y BSTCC. No se esperaban bandas porque no tenían el gen CcV1. En el carril “15” del lado del cebador CCV1 se encontraba el tercer control negativo “agua ultrapura estéril” y no presento amplificación lo que sugirió la ausencia de contaminantes en los productos de PCR. Estos resultados respaldaron la efectividad del proceso de transformación y la especificidad de la amplificación con el cebador de CcV1 en las colonias seleccionadas.

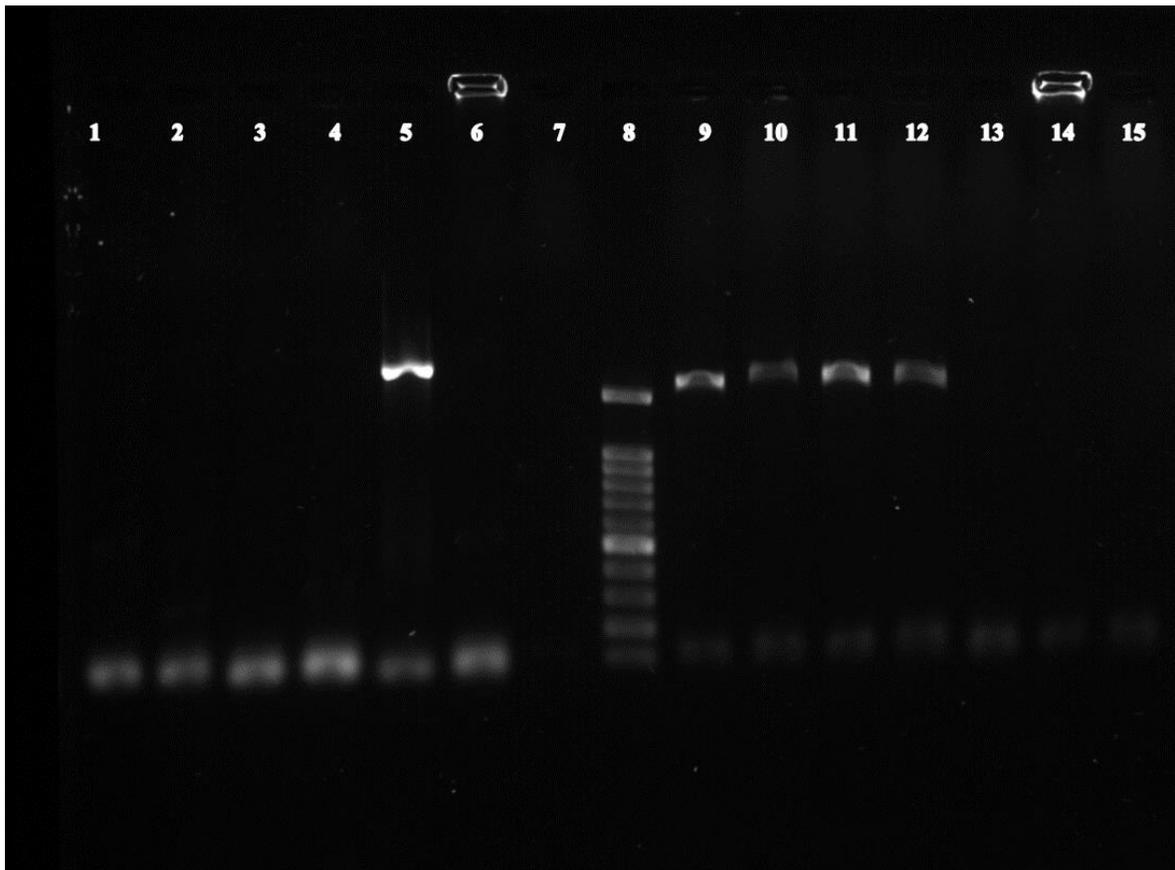


Figura 14. Electroforesis de producto de PCR del vector pCambia1301-Ccv1 y pCambia1301.

VI. DISCUSIÓN

6.1 Comparación del método de congelación/descongelación con el método de electroporación

Jyothishwaran et al., (2007) utilizan y describen el método de congelación/descongelación como un procedimiento simple, rápido y confiable, que puede ser empleado de manera efectiva para transformar *R. radiobacter* con un plásmido vector binario pGreen-CaCPK2. Esta transformación fue confirmada adicionalmente mediante PCR y análisis de Southern Blot.

El método de congelación/descongelación utilizado en este experimento se basa en la descripción realizada por Jyothishwaran et al., (2007) para transformar cepas de *R. radiobacter LBA4404*, se transformó *R. radiobacter LBA4404* con el vector pCambia1301-CcV1, obteniendo como resultado final en este experimento cepas de *R. radiobacter LBA4404* transformadas con el vector pCambia1301-CcV1.

El procedimiento de electroporación implica exponer las células bacterianas a pulsos de alto voltaje, lo que provoca la formación de poros en la membrana celular y facilita la entrada de ADN exógeno. En el estudio, se utilizó *R. radiobacter A136*, que se mezcló con ADN plasmídico y se expuso a pulsos de 1, 5 o 10 ms a diferentes intensidades de campo (Mersereau et al., 1990). Sin embargo, la exposición excesiva a campos eléctricos puede tener como consecuencia daños irreversibles a las membranas de las células y provocar su muerte (Sale & Hamilton, 1967).

Las desventajas en comparación con otros métodos incluyen la necesidad de equipo especializado para controlar la intensidad de los campos utilizados sobre las células, lo que reduce la eficiencia de transformación a altas intensidades de campos (Sale & Hamilton, 1967).

Durante el método de congelación/descongelación no se tuvo problema para controlar las diferentes temperaturas a las que se somete *R. radiobacter LBA4404* por la facilidad que brinda el método de cambiar a *R. radiobacter LBA4404* a diferentes temperaturas para llevar a cabo la transformación.

La entrada del ADN exógeno en el método de congelación/descongelación se favoreció por las lesiones en la pared celular y la membrana de las bacterias que provoca el choque térmico durante el procedimiento y que no significan un riesgo grave para las bacterias, siempre y cuando las temperaturas sean controladas (Inoue et al., 1990).

Durante el procedimiento del método de congelación/descongelación para transformar *R. radiobacter LBA4404*, se manejó de manera cuidadosa y precisa los tiempos y temperaturas a las que se expusieron las muestras de *R. radiobacter LBA4404* con el vector pCambia1301-CcVI para asegurar la supervivencia y la salud de las células después del procedimiento. La supervivencia y la salud de las células de *R. radiobacter LBA4404* con el vector pCambia1301-CcVI se reflejó en el crecimiento de las colonias en placas selectivas de medio YEB con antibiótico, obteniendo un crecimiento positivo.

Las ventajas del método congelación/descongelación sobre la electroporación se basan en su simplicidad y accesibilidad, congelación/descongelación implica cambios simples en la temperatura, lo que lo hace fácil de entender y realizar en el laboratorio. No requiere equipos sofisticados ni costosos. Los protocolos de congelación/descongelación suelen ser más simples y requieren menos pasos de preparación en comparación con la electroporación. Por otra parte, la electroporación necesita de un electroporador, mientras que congelación/descongelación no requiere equipos específicos.

Por esta razón el método de congelación/descongelación se convierte en uno de los métodos más accesibles para laboratorios que no dispongan equipo avanzado o tengan un presupuesto limitado. Este método está limitado por el presupuesto y presenta un menor riesgo de daño celular. Congelación/descongelación no requiere de pulsos eléctricos para ingresar el material genético a la célula, lo que puede minimizar el riesgo de daño celular o estrés oxidativo asociado con la electroporación.

Las células pueden ser más viables después del choque térmico, lo que resulta beneficioso para aplicaciones que requieren una alta viabilidad celular posterior a la transformación. Se reflejó un alto número de colonias transformadas de *R. radiobacter* LBA4404 en las placas de medio de cultivo de medio YEB con los antibióticos de kanamicina y rifampicina, lo cual demostró que el choque térmico no tuvo efectos negativos en la transformación mediante el método de congelación/descongelación. Estos resultados respaldaron la efectividad del método utilizado.

El método de congelación/descongelación ofrece ventajas significativas en términos de simplicidad, accesibilidad, facilidad de uso y menor requerimiento de equipos especializados lo hacen atractivo como método de transformación en bacterias incluyendo *R. radiobacter* (Gómez Arias et al., 2018).

El método congelación/descongelación se basa en congelar rápidamente una mezcla de bacterias receptoras (*E. coli*, *R. radiobacter*, etc.) y ADN de interés a temperaturas extremadamente bajas (-70°C) y luego descongelarlas. Bajo este principio, se aplicó este método para la transfección de *R. radiobacter* con ADN del fago PS8cc186 y ADN plasmídico RP4, donde la transformación fue exitosa (Holsters et al., 1978).

En el estudio realizado por Holsters et al. (1978), también se empleó el método de transfección por transfusión, donde se utiliza ADN purificado del fago PS8cc186 para transfectar cepas de *R. radiobacter* sensibles a este fago. La transfección se llevó a cabo mediante una técnica de transfusión directa de ADN en las células bacterianas. Esta técnica presenta la ventaja de una mayor eficiencia en la transferencia de material genético a las células receptoras en algunos casos, por lo que puede resultar menos adecuado para su escalado a grandes volúmenes de cultivo celular debido a la necesidad de una manipulación más cuidadosa.

Por otro lado, el método de congelación/descongelación podría ser más apropiado para escalar a grandes volúmenes de cultivo celular y causar menor daño a las células receptoras.

6.2 Transformación de *R. radiobacter* LBA4404 con el vector pCambia1301-CcV1

Los genes que se utilizaron para seleccionar las cepas que habían sido transformadas por el vector pCambia1301-CcV1 que contenía el gen CcV1, tenían la función de conferir resistencia contra kanamicina a las células que fueron transformadas, esto les permitió multiplicarse y formar colonias en un medio de cultivo con el agente selectivo (kanamicina y rifampicina) (Hadi et al., 2002). Esta es una de las confirmaciones que necesitábamos para la validación de nuestro experimento, para conocer si había células de *R. radiobacter* LBA4404 con la capacidad de sobrevivir en medio de cultivo con antibiótico.

Los genes seleccionados para la resistencia contra kanamicina y rifampicina fueron clave en la identificación de las cepas transformadas por el vector pCambia1301-CcV1 que portaba el gen CcV1. Esta resistencia permitió a las células transformadas multiplicarse y formar colonias en un entorno de cultivo impregnado con los mencionados agentes selectivos

(kanamicina y rifampicina)) (Hadi et al., 2002). Este hallazgo fue fundamental para la validación de nuestro experimento, ya que nos proporcionó una confirmación directa de la presencia de células de *R. radiobacter LBA4404* capaces de sobrevivir en un medio enriquecido con antibióticos. La capacidad de estas células para resistir la presión selectiva de los antibióticos indica que llevan consigo el vector pCambia1301-CcV1.

La kanamicina y la rifampicina son antibióticos que interfieren con procesos celulares específicos en las bacterias, lo que conducen a su muerte. Al introducir un vector binario (pCambia1301-CcV1) con genes de resistencia a estos antibióticos en *R. radiobacter LBA4404*, las células que han sido transformadas y que mantenían el vector pCambia1301-CcV1 con los genes de resistencia a antibióticos fueron capaces de sobrevivir y reproducirse en un medio que contenga estos antibióticos. Esto permite seleccionar eficientemente las células transformadas.

Al agregar kanamicina y rifampicina al medio de cultivo, las células que no han adquirido el vector pCambia1301-CcV1 con los genes de resistencia a estos antibióticos serán inhibidas o eliminadas, lo que garantiza que solo las células transformadas puedan crecer y formar colonias.

Al imponer una presión selectiva mediante el uso de estos antibióticos, se favorece la retención del vector pCambia1301-CcV1 en la población bacteriana. Las células que pierden el vector pCambia1301-CcV1 o lo eliminan tendrán una desventaja competitiva y son superadas por aquellas que conservan el vector pCambia1301-CcV1.

Se utilizaron controles tanto positivos como negativos en cada una de las PCR llevadas a cabo durante el experimento para comprobar la transformación de las células de *R. radiobacter*

LBA4404 y *E. coli DH5α*. Estos controles servían para diferentes propósitos. El control positivo es una muestra de ADN que se sabe que contiene el fragmento de ADN que se pretende amplificar el control positivo que utilizamos para identificar colonias de *R. radiobacter LBA4404* que tuvieran el gen GUS fue el vector pCambia1301. Su propósito es confirmar que la PCR se ha llevado a cabo correctamente y que los reactivos utilizados son eficaces. Si la amplificación del control positivo es exitosa, indica que las condiciones de la PCR son adecuadas y que todos los componentes del sistema están funcionando correctamente.

Por otro lado, el control negativo es una muestra de ADN que no debería contener el fragmento de ADN que se está amplificando como control negativo se utilizó agua ultrapura estéril, *R. radiobacter LBA4404* y el vector pCambia 1301 para comprobar que las colonias fueran realmente transformadas y contuvieran el gen CcV1. Se utiliza para detectar la presencia de contaminación. Si aparecen bandas amplificadas en el control negativo, puede indicar contaminación cruzada de ADN durante la manipulación de las muestras o contaminación de los reactivos.

También se utilizan controles positivos y negativos al momento de sembrar en placas de medio de cultivo. Las células transformadas se colocaron medio YEB con kanamicina y rifampicina. Como control positivo, se añadieron células capaces de crecer en este medio con ambos antibióticos, mientras que como control negativo se utilizaron células sin transformar. Además, se incluyó una muestra para determinar si las células sometidas al método de transformación fueron realmente transformadas.

Se emplearon diferentes concentraciones de antibióticos para verificar si en los controles positivos y negativos se observaría la formación de colonias al variar la concentración.

Asimismo, se realizó esta prueba para determinar si las células transformadas mostraban mayor o menor resistencia al cambiar la concentración.

El crecimiento de las colonias de *R. radiobacter* LBA4404 transformadas con el vector pCambia1301-CcV1 en medio YEB y medio YEB con antibiótico, reflejó la estabilidad del vector pCambia1301-CcV1 en las cepas de *R. radiobacter* LBA4404 debido a la capacidad de las cepas de *R. radiobacter* LBA4404 de sobrevivir en un medio selectivo. Aunque el cultivo de las cepas de *R. radiobacter* LBA4404 se realizó en placas de medio selectivo por triplicado, cada placa presentó crecimientos similares.

Contar con un método fácil y rápido para transformar *R. radiobacter* es útil para llevar a cabo la transformación de células en diferentes volúmenes. Además, es más práctico, no requiere especialización, resulta económico, no requiere el uso de equipos especializados. Esto permite llevar a cabo un mayor número de transformaciones sin necesidad de contar con una gran cantidad de personal. Asimismo, posibilita realizar múltiples transformaciones en un menor tiempo, ya que se vuelve más rápido y fácil llevarlas a cabo.

Al tener más células de *R. radiobacter* transformadas de manera rápida y sencilla, se agiliza la regeneración de plantas infectadas previamente. Esto permite realizar múltiples transformaciones en callos o células vegetales, lo que amplía las posibilidades de regenerar plantas transformadas mediante *R. radiobacter*. En el ámbito de la biotecnología vegetal, es ventajoso contar con cepas de *R. radiobacter* transformadas de forma eficiente. El método congelación/descongelación posibilita obtener estas cepas rápidamente, con una reducción significativa de costos al no requerir equipos especializados, lo que facilita su replicación.

En este caso en particular, una de las aplicaciones potenciales de la proteína CcV1 es la de suprimir la respuesta inmunológica del huésped a nivel celular, específicamente en relación con la capacidad de los hemocitos para fagocitar bacterias (Labropoulou et al., 2008), lo que podrían hacer que los insectos sean más susceptibles a infecciones bacterianas o reducir su capacidad para defenderse contra otros patógenos. Esto ayudaría a controlar las poblaciones de plagas de manera más efectiva.

Las bacterias modificadas son potencialmente útiles para transformar plantas que serían útiles en la investigación científica para mejorar la comprensión de los mecanismos inmunes de los insectos y su interacción con otros organismos. Esto podría conducir al desarrollo de nuevos enfoques para el control de plagas y la prevención de enfermedades transmitidas por insectos.

R. radiobacter LBA4404 transformada con el vector pCambia1301-Ccv1 podría ser utilizada en biotecnología agrícola para crear cultivos genéticamente modificados con el fin de combatir plagas de insectos, es decir, que los cultivos presenten resistencia a plagas y enfermedades causadas directa o indirectamente por insectos.

El método de congelación/descongelación es una técnica viable y accesible para la introducción de ADN en bacterias, su practicidad y bajo costo lo convierten en una opción valiosa para aplicaciones de clonación y transformación genética en bacterias (Gómez Arias et al., 2018).

VII. CONCLUSIÓN

Obtuvimos colonias de *R. radiobacter* LBA4404 transformadas con el vector pCambia1301-CcV1, mediante el método de congelación/descongelación. Se verificó la transformación a través de PCR con cebadores que hibridaron en la construcción del vector pCambia1301-CcV1 para comprobar que se encontraba en las colonias de *E. coli* Dh5 α . Se verificó la transformación a través de PCR con cebadores que hibridaron en el gen CcV1 en colonias de *R. radiobacter* LBA4404. Estas cepas de *R. radiobacter* LBA4404 transformadas pudieron ser utilizadas como mediador para la introducción del gen CcV1 en plantas.

Para obtener estas cepas transformadas se utilizó el método de congelación/descongelación no solo se logró la transformación de las células de *R. radiobacter* LBA4404 a través de este método, si no también se comprobó la eficacia de este método al obtener células de *R. radiobacter* LBA4404 con el gen CcV1.

Se utilizaron controles positivos y negativos para comprobar que no existiera contaminación cruzada, también fueron utilizados para comprobar la transformación de *R. radiobacter* LBA4404 con el gen CcV1. Fue un paso importante y necesario el usar controles negativos y positivos en este experimento.

La transformación de células de *R. radiobacter* LBA4404 es un paso en un proceso de transformación de plantas susceptibles a *R. radiobacter*, estas células transformadas serán utilizadas en experimentos posteriores donde serán utilizadas para infectar células vegetales y regenerar plantas a partir de células indiferenciadas (callos), logrando que las plantas por si mismas logren combatir plagas de interés en crucíferas, eliminando el uso de plaguicidas y contaminación del suelo por el mismo motivo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA:

- 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.
- Arguedas, M. (2009). Solución Tecnológica Serie: Plagas y enfermedades forestales La “corona de agallas” (*Agrobacterium tumefaciens*). In *Kurú: Revista Forestal (Costa Rica)* (Vol. 6, Issue 16).
- Asgari, S., Hellers, M., & Schmidt, O. (1996). Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: Transient expression of a polydnavirus gene. *Journal of General Virology*, 77(10), 2653–2662.
- Asgari, S., & Schmidt, O. (1994). Passive protection of eggs from the parasitoid, *Cotesia rubecula*, in the host, *Pieris rapae*. *Journal of Insect Physiology*, 40(9), 789–795.
- Asgari, S., Schmidt, O., & Theopold, U. (1997). A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor. *Journal of General Virology*, 78(11), 3061–3070.
- Beckage, N. E., Metcalf, J. S., Nesbit, D. J., Schleifer, K. W., Zetlan, S. R., & de Buron, I. (1990). Host hemolymph monophenoloxidase activity in parasitized *Manduca sexta* larvae and evidence for inhibition by wasp polydnavirus. *Insect Biochemistry*, 20(3), 285–294.

- Beckage, N. E., & Riddiford, L. M. (1982). Effects of parasitism by *Apanteles congregatus* on the endocrine physiology of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *General and Comparative Endocrinology*, 47(3), 308–322.
- 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.
- Belle, E., Beckage, N. E., Rousselet, J., Poirié, M., Lemeunier, F., & Drezen, J.-M. (2002). Visualization of Polydnavirus Sequences in a Parasitoid Wasp Chromosome. *Journal of Virology*, 76(11), 5793–5796.
- Bettencourt, R., Gunne, H., Gastinel, L., Steiner, H., & Faye, I. (1999). Implications of hemolin glycosylation and Ca²⁺-binding on homophilic and cellular interactions. *European Journal of Biochemistry*, 266(3), 964–976.
- Braun, A. C., & White, P. R. (1943). Bacteriological sterility of tissues derived from secondary crown-gall tumors. *Phytopathology*, 33(2), 85–100.
- Burns, D. L. (2003). Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(1), 29–34.
- Chadha, K. C., & Srivastava, B. I. S. (1971). Evidence for the Presence of Bacteria-specific Proteins in Sterile Crown Gall Tumor Tissue. *Plant Physiology*, 48(2), 125–129.
- Christie, P. J. (1997). *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 179(10), 3085–3094.

- Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., & Cascales, E. (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, *59*, 451–485.
- Citovsky, V., Warnick, D., & Zambryski, P. (1994). Nuclear import of *Agrobacterium VirD2* and *VirE2* proteins in maize and tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(8), 3210–3214.
- De Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J., Beijersbergen, A. G. M., & Chapman, J. W. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 1998 *16*:9, *16*(9), 839–842.
- Deng, L., Stoltz, D. B., & Webb, B. A. (2000). A Gene Encoding a Polydnavirus Structural Polypeptide Is Not Encapsidated. *Virology*, *269*(2), 440–450.
- Díaz Granados, C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *15*, 49–61.
- Dityatkin, S. Y., Lisovskaya, K. V., Panzhava, N. N., & Iliashenko, B. N. (1972). Frozen-thawed bacteria as recipients of isolated coliphage DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, *281*(3), 319–323.
- Dong, J., Cao, L., Zhang, X., Zhang, W., Yang, T., Zhang, J., & Che, D. (2021). An R2R3-MYB Transcription Factor RmMYB108 Responds to Chilling Stress of *Rosa multiflora* and Conferred Cold Tolerance of *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, *12*.
- Dushay, M. S., & Beckage, N. E. (1993). Dose-dependent separation of *Cotesia congregata*-associated polydnavirus effects on *Manduca sexta* larval development and immunity. *Journal of Insect Physiology*, *39*(12), 1029–1040.

- Eleftherianos, I., Boundy, S., Joyce, S. A., Aslam, S., Marshall, J. W., Cox, R. J., Simpson, T. J., Clarke, D. J., Ffrench-Constant, R. H., & Reynolds, S. E. (2007). An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(7), 2419–2424.
- Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Biology*, *51*(1), 223–256.
- Gelvin, S. B., Thomashow, M. F., McPherson, J. C., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1982). Sizes and map positions of several plasmid-DNA-encoded transcripts in octopine-type crown gall tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(1), 76–80.
- Gómez Arias, L. Y., Gómez Daza, S., Núñez Zarantes, V., Gómez Arias, L. Y., Gómez Daza, S., & Núñez Zarantes, V. (2018). Estandarización de protocolos de transformación genética en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* para la generación de una colección de constructos génicos. *Ciencia En Desarrollo*, *9*(2), 9–16. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882018000200009&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Grevelding, C., Fantes, V., Kemper, E., Schell, J., & Masterson, R. (1993). Single-copy T-DNA insertions in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in root-derived transgenics, whereas multiple insertions are found in leaf discs. *Plant Molecular Biology*, *23*(4), 847–860.
- Hadi, M., Kemper, E., Wendeler, E., & Reiss, B. (2002). Simple and versatile selection of *Arabidopsis* transformants. *Plant Cell Reports*, *21*(2), 130–135.

- Hayakawa, Y., Yazaki, K., Yamanaka, A., & Tanaka, T. (1994). Expression of polydnavirus genes from the parasitoid wasp *Cotesia kariyai* in two noctuid hosts. *Insect Molecular Biology*, 3(2), 97–103.
- Hellens, R., Mullineaux, P., & Klee, H. (2000). Technical focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10), 446–451.
- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., & Schell, J. (1978a). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *MGG Molecular & General Genetics*, 163(2), 181–187.
- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., & Schell, J. (1978b). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *MGG Molecular & General Genetics*, 163(2), 181–187.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28.
- Joos, H., Inze, D., Caplan, A., Sormann, M., Van Montagu, M., & Schell, J. (1983). Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. *Cell*, 32(4), 1057–1067.
- Jyothishwaran, G., Kotresha, D., Selvaraj, T., Srideshikan, S. M., Rajvanshi, P. K., & Jayabaskaran, C. (2007). A modified freeze–thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Science*, 93(6), 770–772.
<http://www.jstor.org/stable/24099118>
- Kado, C. I. (2009). Horizontal gene transfer: sustaining pathogenicity and optimizing host–pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology*, 10(1), 143–150.

- Kado, C. I. (2014). Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Microbiology*, 5(340).
- Kathiresan, S., Chandrashekar, A., Ravishankar, G. A., & Sarada, R. (2009). *Agrobacterium*-mediated transformation in the green alga *haematococcus pluvialis* (chlorophyceae, volvocales)1. *Journal of Phycology*, 45(3), 642–649.
- Kimenyi, K. M., Abry, M. F., Okeyo, W., Matovu, E., Masiga, D., & Kulohoma, B. W. (2016). Genome sequence of *tsetse bracoviruses*: insights into symbiotic virus evolution. *BioRxiv*, 045088.
- Korányi, P., Burg, K., & Berényi, M. (1998). Stable electrotransformation of symbiont candidate diazotrophic bacterium with plasmids carrying selectable and screenable marker genes. *Research in Microbiology*, 149(5), 361–372.
- 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.
- Lai, E. M., & Kado, C. I. (2000). The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends in Microbiology*, 8(8), 361–369.
- Lee, L. Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325.
- Le, N. T., Asgari, S., Amaya, K., Tan, F. F., & Beckage, N. E. (2003). Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, 49(5), 533–543.

- Medina, A. M., & Romero, R. R. (2011). Relaciones dañinas, neutras o positivas. *Elementos* 84, 53–58.
- Mersereau, M., Pazour, G. J., & Das, A. (1990). Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene*, 90(1), 149–151.
- O’Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., & Ramuz, M. (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* *VirB* and *Bordetella pertussis* *Ptl* type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Molecular Microbiology*, 33(6), 1210–1220.
- Pope, B., & Kent, H. M. (1996). High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 24(3), 536.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15508–15513.
- Rogowsky, P. M., Close, T. J., Chimera, J. A., Shaw, J. J., & Kado, C. I. (1987). Regulation of the *vir* genes of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *Journal of Bacteriology*, 169(11), 5101–5112.
- Sahai Srivastava, B. I., & Chadha, K. C. (1970). Liberation of *agrobacterium tumefaciens* dna from the crown gall tumor cell DNA from the crown gall tumor cell DNA by shearing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40(4), 968–972.

- Sale, A. J. H., & Hamilton, W. A. (1967). Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 148(3), 781–788.
- Strand, M. R., & Pech, L. L. (2003). Immunological Basis for Compatibility in Parasitoid-Host Relationships.
- Summers, M. D., & Dib-Hajj, S. D. (1995). Polydnavirus-facilitated endoparasite protection against host immune defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(1), 29–36.
- Uribe Soto, S. (1997). Mecanismos de respuesta inmune en insectos. *Revista Colombiana de Entomología*, 23(2), 177–185.
- Valderrama Fonseca, A. M., Arango Isaza, R., & Afanador Kafuri, L. (2005). Transformación de plantas mediada por *agrobacterium*: “ingeniería genética natural aplicada.” *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58, 2569–2585.
- Vincze, E., & Bowra, S. (2006). Transformation of rhizobia with broad-host-range plasmids by using a freeze-thaw method. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2290–2293.
- Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., & Zambryski, P. (1984). Right 25 by terminus sequence of the nopaline t-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell*, 38(2), 455–462.
- Webb, B. A. (1998). Polydnavirus Biology, Genome Structure, and Evolution. In L. K. Miller & L. A. Ball (Eds.), *The Insect Viruses* (pp. 105–139). Springer US.

- Webb, B. A., & Summers, M. D. (1990). Venom and viral expression products of the endoparasitic wasp *Campoletis sonorensis* share epitopes and related sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(13), 4961–4965.
- Winans, S. C. (1992). Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiological Reviews*, 56(1), 12–31.
- Winans, S. C., Mantis, N. J., Chen, C. Y., Chang, C. H., & Dong Cho Han. (1994). Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *agrobacterium tumefaciens*. *Research in Microbiology*, 145(5–6), 461–473.
- 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.
- Zhu, Y., Nam, J., Humara, J. M., Mysore, K. S., Lee, L. Y., Cao, H., Valentine, L., Li, J., Kaiser, A. D., Kopecky, A. L., Hwang, H. H., Bhattacharjee, S., Rao, P. K., Tzfira, T., Rajagopal, J., Yi, H. C., Veena, Yadav, B. S., Crane, Y. M., ... Gelvin, S. B. (2003). Identification of *Arabidopsis* rat Mutants. *Plant Physiology*, 132(2), 494.