

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA



**Obtención de una clona de *Rhizobium radiobacter* para la
transformación de plantas con el gen CrV1**

Por:

EDUARDO MENDIETA CHAVERO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERIA

Obtención de una clona de *Rhizobium radiobacter* para la transformación de plantas con el gen *C_{rV1}*

Por:

EDUARDO MENDIETA CHAVERO

TESIS

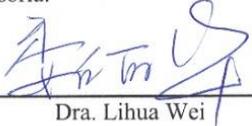
Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

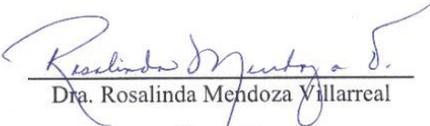
Aprobada por el comité de Asesoría:



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Asesor Principal Interno



Dra. Lihua Wei
Asesor Principal Externo



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Coasesor



Dra. Silvia Yudith Martínez
Amador
Coasesor

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

Agosto, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERIA

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

Por:

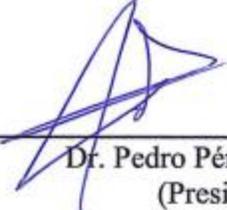
EDUARDO MENDIETA CHAVERO

TESIS

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

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

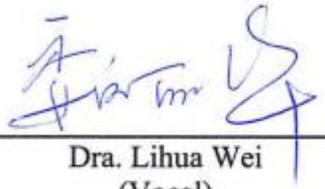
Aprobada por el Jurado Examinador:



Dr. Pedro Pérez Rodríguez
(Presidente)



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
(Vocal)



Dra. Lihua Wei
(Vocal)



Dra. Silvia Yudith Martínez
Amador
(Vocal)





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

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Agosto 2024

Declaración 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.



Eduardo Mendieta Chavero

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 el apoyo económico para la realización de este proyecto (Clave 2445: Eficiencia en la Transformación Genética de Brassica oleracea var. capitata con tres cepas de *Rhizobium spp.*).

A mi asesor el **Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez** por brindarme la oportunidad de desarrollar mis habilidades profesionales, y brindarme los conocimientos para el desarrollo de mi trabajo.

A mis **compañeros de laboratorio** que me apoyaron, me enseñaron, me auxiliaron las dudas que surgieron durante mi estancia en el laboratorio.

A mis **seres queridos**, principalmente a mis padres Asunción Chavero Sánchez, Silvano Mendieta Corona y hermanos German Chavero Sánchez, Mariana Mendieta Chavero, Roberto Mendieta Chavero, que siempre me apoyaron dando ánimos, y siempre me motivaron para seguir adelante.

Dedicatoria

A mis profesores, padres, hermanos, amigos que estuvieron presentes en mi desarrollo profesional y por hacer de mi la persona que ahora soy.

Tabla de contenido

Tabla de contenido.....	IV
índice de figuras.....	VII
índice de tablas.....	IX
Resumen.....	X
I. Introducción.....	01
II. Objetivos.....	03
2.1 Objetivos generales.....	03
2.2 Objetivos específicos.....	03
III. Revisión de literatura	04
3.1 Morfología de <i>R. radiobacter</i>	04
3.1.1 Plásmido Ti.....	05
3.1.1.1 Región T o DNA T.....	06
3.1.1.2 Región vir.....	06
3.1.1.3 Catabolismo de opinas.....	08
3.2 Mecanismo de transferencia del plásmido Ti	08
3.2.1 Interacción bacteria planta	09
3.2.2 Reconocimiento de <i>R. radiobacter</i> a la célula huésped.....	10
3.2.3 Transferencia e integración del DNA – T.....	10
3.3 <i>R. radiobacter</i> desarmado.....	12
3.4 Transformación de <i>R. radiobacter</i> por el método congelación – descongelación.....	13

3.5	Vectores binarios.....	14
3.5.1	Estructura de los vectores binarios.....	15
3.6	Vector pCAMBIA 1301.....	16
3.7	<i>Cotesia rubecula</i>	17
3.7.1	Polydnavirus.....	20
3.7.1.1	Genes de polydnavirus.....	22
3.7.1.1.1	Gen CrV1.....	23
IV.	Métodos y materiales.....	24
4.1	Transformación de <i>E. coli</i> Dh5 α con vector pCAMBIA-CrV1.....	25
4.2	Extracción del vector – pCAMBIA – CrV1	25
4.3	Electroforesis del DNA plasmídico.....	27
4.4	Amplificación de DNA plasmídico por PCR con cebadores (NCOCRF – bsterR).....	27
4.5	Cultivo y amplificación de <i>R. radiobacter</i>	31
4.6	Preparación de cepas de <i>R. radiobacter</i> quimiocompetentes mediante Cloruro de Calcio (CaCl ₂).....	32
4.7	Transformación de <i>R. radiobacter</i> con el DNA plasmídico con el vector pCAMBIA – CrV1 por el método congelación / descongelación.....	32
4.8	Obtención de colonias de <i>R. radiobacter</i> transformadas y comprobación de mediante PCR.....	33
V.	Resultados.....	38
5.1	Obtención de DNA plasmídico.....	38
5.2	Obtención de colonias transformadas de <i>R. radiobacter</i> con DNA plasmídico con el fragmento CrV1	40

5.3 Productos de PCR de <i>R. radiobacter</i> transformadas con el fragmento CrV1.....	41
5.4 Productos de la selección de cepas transformadas puras.....	43
VI. Discusión.....	
VII. Conclusión.....	50
VIII. Bibliografía.....	51

índice de figuras

Figura 1. Enfermedad de la agalla de la corona causada por <i>R. radiobacter</i> (Tzotzos et al., 2009).....	02
Figura 2. Morfología de <i>R. radiobacter</i> (Kreuzer & Massey, 2014).....	04
Figura 3. Plásmido Ti de <i>R. radiobacter</i> y sus componentes (Oliver et al., 2011).....	05
Figura 4. Región <i>vir</i> de <i>R. radiobacter</i> y sus genes principales (Montesinos et al., 2003).....	07
Figura 5. Unión de <i>R. radiobacter</i> a la célula huésped (Montesinos et al., 2003).....	09
Figura 6. Estructura del plásmido Ti desarmado de <i>R. radiobacter</i> (Bevitori, 2014).....	13
Figura 7. Estructura del sistema de un vector binario (Petri, 2005).....	16
Figura 8. Componentes principales del vector pCAMBIA 1301 (Snapgene).....	17
Figura 9. Ciclo de vida de <i>Cotesia rubecula</i> y etapa donde intervienen los polydnavirus (Strand & Burke, 2012).....	19
Figura 10. Mecanismo de introducción de polydnavirus en huésped de avispa parasitoide (Roossinck, 2011).....	21
Figura 11. Esquema del proceso de metodología para obtención de cepas transformadas de <i>R. radiobacter</i>	24
Figura 12. Región de reconocimiento en la secuencia de los cebadores NCOCRF – bstcrR en el vector pCAMBIA – CrV1.....	30
Figura 13. Región de reconocimiento en la secuencia de los cebadores PBINNOST - 986-1005CC en el vector pCAMBIA – CrV1.....	31

Figura 14. Región de reconocimiento en la secuencia de los cebadores 62-84PCAM – 396-74Cr en el vector pCAMBIA – CrV1.....	34
Figura 15. Región de reconocimiento en la secuencia de los cebadores GUSF - GUSR en el vector pCAMBIA 1301.....	35
Figura 16. Extracción del plásmido pCAMBIA – Crv1 de <i>E. coli</i>	38
Figura 17. Gel de electroforesis de los productos de PCR usando cebadores NCOCRf y bstcrR.....	39
Figura 18. Colonias de <i>R. radiobacter</i> transformadas con DNA plasmídico con fragmento CrV1.....	40
Figura 19. Gel de electroforesis con productos de PCR de colonias de <i>R. radiobacter</i> transformadas utilizando cebadores 62-84PCAM – 39674CR.....	41
Figura 20. Gel de electroforesis con productos de PCR de colonias de <i>R. radiobacter</i> transformadas utilizando cebadores GusF – GusR.....	42
Figura 21. Segunda comprobación de cepas de <i>R. radiobacter</i> con cebadores 62-84PCAM – 39674CR y los cebadores GusF y GusR.....	43

índice de tablas

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados durante el estudio.....	28
Tabla 2. Programa de termociclador utilizado para PCR.....	28
Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR.....	29

Resumen

R. radiobacter es una bacteria que ha tenido un gran impacto la modificación genética de plantas, dado su mecanismo para realizar la transferencia de genes entre especies, por lo que se han buscado alternativas más viables, más rentables, más rápidas y con mejor eficiencia para realizar la integración de genes de interés. El presente trabajo se realizó mediante el método de congelación – descongelación para realizar la incorporación del vector pCAMBIA1301 – CrV1 en cepas quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α y posteriormente la transferencia de su DNA plasmídico a una cepa quimiocompetente de *R. radiobacter* para obtener una clona que contenga el gen CrV1 y mediante el mecanismo que utiliza esta bacteria poder introducir este gen de interés en células indiferenciadas *in vitro* de cultivos de crucíferas. CrV1 es un gen inmunosupresor proveniente de un polydnavirus *Cotesia rubecula* que es un endoparasoide que es control biológico del parasitoide *Pieris rapae* que ataca a cultivos de crucíferas. De la transformación de *R. radiobacter* se obtuvieron 32 cepas las cuales se les realizo su comprobación mediante PCR con cebadores específicos del fragmento de interés, así como con los cebadores específicos para pCAMBIA 1301, de estos productos se realizó una selección de las cuatro cepas más puras y se realizó una segunda comprobación por medio de PCR, donde se logró determinar el éxito de la transformación. Se obtuvo un resultado positivo con la amplificación del fragmento de interés con los cebadores específicos de este, así como una estabilidad en los controles negativos. Las cepas seleccionadas se crecieron en medio YEB con los antibióticos kanamicina y rifampicina para después pasar a su preservación en glicerol al 50% para su posterior uso.

Palabras clave:

Rhizobium radiobacter que contiene el vector pCAMBIA – CrV1

I. Introducción

Rhizobium radiobacter (*R. radiobacter*) anteriormente *Agrobacterium tumefaciens* (Tiwari & Beriha, 2015) es una bacteria fitopatógena que se encuentra en el suelo, está invade e infecta a la mayoría de las plantas dicotiledóneas (Rahman et al., 2023), se ha descubierto que el mecanismo de infección se lleva a cabo mediante heridas que son producidas de manera natural en las plantas, produciendo de esta manera una enfermedad llamada "agalla de la corona" (Hwang et al., 2017).

Esta bacteria se introduce a partir de células muertas originadas en la herida e infecta las células vivas introduciendo un segmento de su DNA (el plásmido Ti), al ingresar este DNA utiliza la maquinaria de la célula vegetal para producir compuestos que sirven para la reproducción de *R. radiobacter*, así como la generación descontrolada de células para llevar a cabo la protección de la bacteria (Kreuzer & Massey, 2014).

Entre estos compuestos se encuentran las fitohormonas que permiten modificaciones en los haces vasculares (floema y xilema) proporcionando un flujo constante y abundante de agua, así como un aumento de la producción de auxinas y citocinas esenciales para la agalla (Jiménez, 2022).

La enfermedad tumoral conocida como agalla de la corona era desconocida hasta en 1897, cuando Fridiano Cavara trabajó con una enfermedad causante de tumores en las vides de los jardines botánicos de Nápoles que son proliferaciones cancerosas en el tejido del tallo. Entre sus trabajos se describe su logro más grande al aislar a la bacteria causante de esta enfermedad (Ferrín Suárez, 2020).

Esta enfermedad afecta a más de 100 especies de plantas, el nombre de agalla de corona se caracteriza por crecimientos parecidos a los tumores que se forman en las coronas de las plantas (Joy & Hudelson, 2005). Se sabe que *R. radiobacter* infecta principalmente plantas dicotiledóneas, solo algunas pocas monocotiledóneas y solo en algunas ocasiones puede llegar a infectar a plantas gimnospermas (Shah, 2013).

R. radiobacter logra producir esta enfermedad a través de una transferencia de material genético, este proceso se lleva a cabo mediante la entrega de DNA – T proveniente de las células bacterianas y transferido a una planta huésped que es llevado a cabo por un sistema de secreción bacteriana de tipo IV (T4SS) (Hwang et al., 2017)

Investigaciones han revelado la existencia de genes bacterianos y vegetales que son responsables de la formación de los tumores. *R. radiobacter* lleva a cabo la transformación genética en las plantas en presencia de dos componentes genéticos microbianos esenciales que se encuentran localizado en el plásmido Ti bacteriano (Hwang et al., 2017)



Figura 1. Enfermedad de la agalla de la corona causada por *R. radiobacter* (Tzotzos et al., 2009).

II. Objetivos

2.1 Objetivos generales

- Transferir el gen CrV1 a clonas de *R. radiobacter* para utilizar su mecanismo de transferencia de genes y provocar la modificación genética de plantas.

2.2 Objetivos específicos

- Obtener una clona de *R. radiobacter* transformada que contenga el fragmento CrV1.
- Realizar la verificación de las clonas de *R. radiobacter*.

III. Revisión de literatura

3.1 Morfología de *R. radiobacter*

Rhizobium radiobacter es una bacteria Gram negativa, con forma de bastón que está rodeada de una pequeña cantidad de flagelos (Ashraf et al., 2012), alargada y mide de 0.6 μM de ancho por 1.5 – 3 μM de largo, no forma esporas, son móviles al tener un flagelo polar o subpolar, o de dos a seis flagelos peritricos. Estos flagelos pueden tener una longitud de hasta cuatro o cinco veces la célula bacteriana, las células pueden estar solas o agrupadas y tienen cápsula (López, 1991)

R. radiobacter se diferencia de otras bacterias que solo contienen un cromosoma, ya que este contiene dos cromosomas (Shah, 2013), un cromosoma bacteriano circular (2.8 Mb) y un cromosoma lineal (2.1 Mb) (Ren et al., 2022), además, contiene dos grandes plásmidos (450 y 195 kb) (Shah, 2013), en donde se incluye el plásmido Ti que es el responsable de iniciar el proceso de infección, así como el movimiento del DNA al núcleo de la célula (Jiménez, 2022).

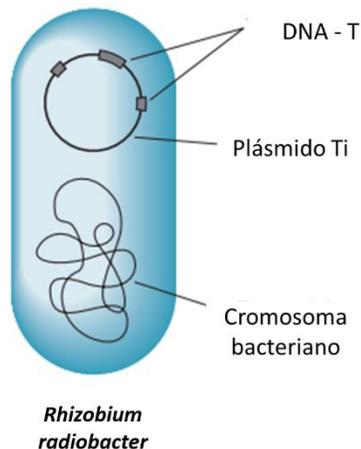


Figura 2. Morfología de *R. radiobacter* (Kreuzer & Massey, 2014).

3.1.1 Plásmido Ti

El plásmido Ti está compuesto por una molécula circular de doble cadena cerrada la cual contiene genes que confieren la patogenicidad (Jiménez, 2022) y este tiene un tamaño aproximado de 160 – 240 kb, dentro del cual se localiza el DNA-T con un tamaño aproximado de 15 – 30 kb, además de una región del gen de virulencia (*vir*) que son responsables de la generación de los tumores durante la infección (Rahman et al., 2023) siendo estos, dos de los tres de los componentes necesarios dentro del plásmido Ti para llevar a cabo la transformación de la célula vegetal, siendo el tercer componente tres loci de virulencia que se encuentra en el cromosoma (*havA*, *chvB* y *pscA*) (Montesinos et al., 2003). También dentro de este plásmido se encuentran genes implicados en la detección de quorum, de conjugación del plásmido Ti (loci *tra* y *trb*) (Matthysse, 2006), así como la región *rep* que es necesaria para la replicación del plásmido Ti y el catabolismo de las opinas (Montesinos et al., 2003).

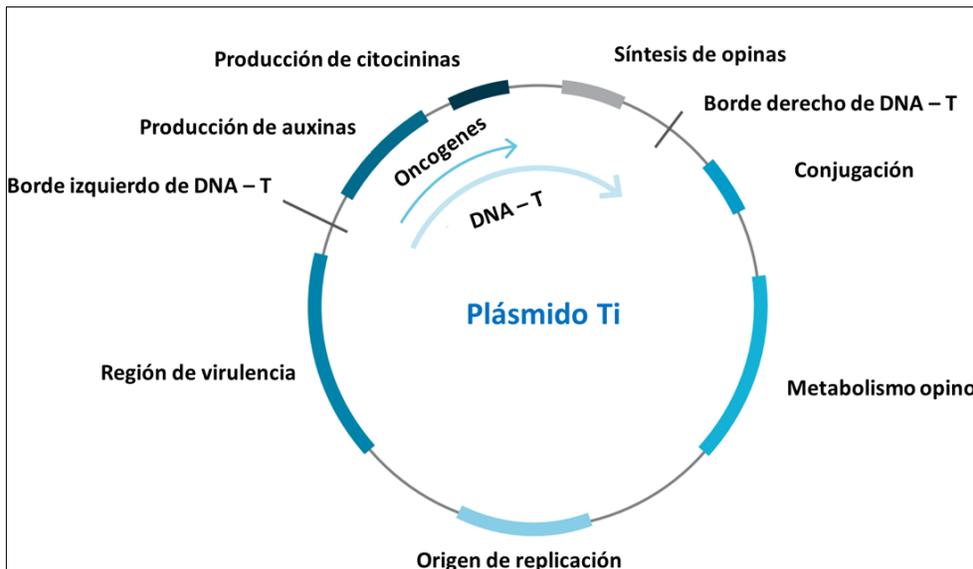


Figura 3. Plásmido Ti de *R. radiobacter* y sus componentes (Oliver et al., 2011).

3.1.1.1 Región T o DNA-T

El DNA – T es transferido a la célula huésped para su expresión dando así origen a la generación de tumores (Matthysse, 2006). El DNA – T está compuesto por bordes especializados, un borde derecho y un borde izquierdo de 25 pb aproximadamente de largo, secuencias directamente repetidas (Shah, 2013).

Además, contiene tres genes de los cuales dos se denomina oncogenes que son encargados de producir mitógenos (auxinas y citoquininas), que son los encargados de llevar a cabo la producción acelerada del crecimiento y división celular dando origen así a los tumores y un tercer gen llamado opine (aminoácidos raros) que son genes que produce octopina, nopalina, agropina, succinamopina que son usados como carbono y nitrógeno para *Rhizobium* (Rahman et al., 2023)

El tamaño del DNA – T varía de tamaño según el tipo de plásmido y solo los bordes que lo delimitan son reconocidos durante el proceso de transferencia (Rodríguez et al., 2012).

3.1.1.2 Región vir

La región de virulencia se localiza al lado izquierdo del segmento de DNA-T, esta región contiene genes que son los encargados de llevar a cabo el proceso de infección por lo que se consideran esenciales para llevar a cabo la transferencia de genes (Kreuzer & Massey, 2014), dentro de sus funciones principales se encuentra la detección de compuestos fenólicos, en el procesamiento del DNA – T en el plásmido Ti, así como la secreción del DNA – T y proteínas vir, además de eventos dentro de la célula huésped para la transferencia y la integración del DNA – T en el genoma del huésped (Rodríguez et al., 2012).

La región de virulencia (*vir*), está constituido por un operón con ocho genes principales *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH*, que es regulado por una secuencia promotora de 12 pb en donde se une específicamente la proteína VirG fosforilada (Milena et al., 2005).

El gen *virA* sintetiza una proteína que actúa como sensor ambiental, que se encarga de la detección de pH ácidos (5 – 5.5), temperatura, monosacáridos, así como de compuestos fenólicos, mientras que *virB* contiene 11 genes, que son esenciales para llevar a cabo la tumorogénesis así como la síntesis de proteínas presentes en la membrana interna o externa y que son responsables de la salida de la cadena – T de la célula bacteriana y la entrada a la célula vegetal, excepto *virB1*. El gen *virC* codifica las proteínas VirC1 y VirC2 que son necesarias para la transferencia del DNA-T, mientras que el operón *virD* codifica proteínas requeridas para llevar a cabo el corte de las secuencias del borde de DNA – T. El gen *virE* codifica dos proteínas (VirE1 y VirE2), donde VirE1 es la encargada del transporte de la proteína VirE2 de *Rhizobium* a la célula vegetal, el operón *virG* es el encargado de codificar un producto que es el activador de la transcripción de otros genes *vir* y estos genes *vir* son regulados por las proteínas VirA, VirG, así como todo el proceso de infección (Montesinos et al., 2003).



Figura 4. Región *vir* de *R. radiobacter* y sus genes principales (Montesinos et al., 2003).

3.1.1.3 Catabolismo de opinas

El plásmido Ti posee una región que confieren a los tumores un metabolismo nitrogenado particular por compuestos específicos de bajo peso molecular llamados opinas que son productos de la condensación de ácidos orgánico y aminoácidos (disacáridos) y que son utilizados como fuente de carbono y nitrógeno o fósforo (Montesinos et al., 2003), dentro de las cuales se pueden encontrar las octopinas, nopalinas, agropinas, nopalinas entre otras, que sirven como fuente de carbono y nitrógeno para el desarrollo de *R. radiobacter* por lo que se consideran de gran importancia, ya que juegan un papel ecológico, promoviendo un ambiente altamente específico para *R. radiobacter* que es altamente tóxico para bacterias oportunistas, además de favorecer la expresión de factores de virulencia y una mejor comunicación bacteriana (Jiménez, 2022).

3.2 Mecanismo de transferencia del plásmido Ti

R. radiobacter tiene una capacidad de movilidad a través de la película del agua en el suelo por unas estructuras llamadas "flagelos" (Weir & Dalzell, 2020). El mecanismo de transformación comienza cuando *R. radiobacter* detecta compuestos fenólicos que son producidas por heridas producidas en las plantas (Ferrín Suárez, 2020), dentro de los que se puede encontrar acetosiringona que son reconocidos por *R. radiobacter* que, al llegar al sitio de la herida, este se adhiere y transfiere su DNA – T (Shah, 2013).

3.2.1 Interacción bacteria – planta

R. radiobacter utiliza los compuestos fenólicos generados en la herida de la planta como moléculas de señal que al ser detectadas y migran a través de un gradiente de concentración (Montesinos et al., 2003).

Al llegar al sitio de la herida se une a ella mediante fibrillas de celulosa que sintetiza para permitir que más bacterias queden atrapadas en la superficie de la herida (Shah, 2013). Además, dos proteínas, una proteína similar a la vitronectina y una proteína de unión a ricoadhesina, se han propuesto como responsables de esta unión, aunque aún no se ha demostrado por análisis genéticos, además de genes cromosómicos de virulencia *chvA*, *chvB*, *psvA* que también están implicados en esta unión (Montesinos et al., 2003).

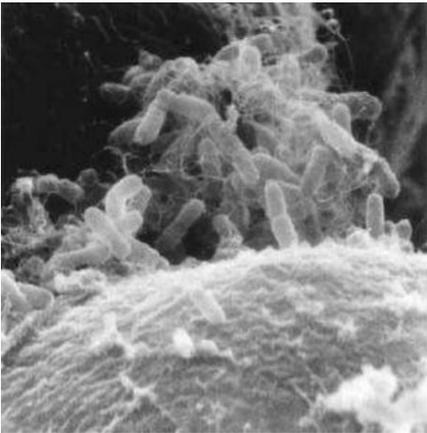


Figura 5. Unión de *R. radiobacter* a la célula huésped (Montesinos et al., 2003).

3.2.2 Reconocimiento de *R. radiobacter* a la célula huésped

Al llegar a la célula huésped *R. radiobacter* activa los genes *vir* que se encuentran en el plásmido Ti, este proceso comienza con la proteína *VirA* que le transfiere un fosfato a la proteína *VirG* que se encuentra en el citoplasma y esta promueve la activación de las demás proteínas de virulencia formando de esta manera el sistema de secreción tipo IV (Jiménez, 2022).

Se ha reportado que existen azúcares (glucosa y galactosa) que funcionan como inductores, estos azúcares son detectados por una proteína *ChvE* que es sintetizada por un gen proveniente del cromosoma de *Rhizobium*. Con la ayuda de estos azúcares los genes *vir* pueden ser expresados a concentraciones más bajas de compuestos fenólicos (Lee Lan Ying & Gelvin Stanton B., 2008).

3.2.3 Transferencia e integración del DNA-T

Una vez que los genes *vir* empiezan a transcribirse inicia la síntesis de la cadena – T, que son reconocidas por proteínas codificadas en el operón *virD* que reconoce las secuencias terminales que delimitan el DNA – T (Montesinos et al., 2003). Las proteínas *VirD1* tiene actividad endonucleasa que se encarga cortar el DNA – T del plásmido Ti en el extremo 5´, mientras la proteína *VirD2* corta en el extremo 3´ formando así una molécula de DNA de una sola hebra (Tapia E, 2014).

Después la proteína *VirD2* se une a la cadena – T a través de un residuo de tirosina al extremo 5´ de cada cadena rota. La fuerte unión que tienen la proteína *VirD2* hacia la cadena – T le confiere una polaridad que asegura que el extremo 5´ entre primero al núcleo de la célula huésped (Montesinos et al., 2003).

La unión de la proteína VirD2 a la cadena T se denomina "complejo de transferencia" (Milena et al., 2005). Este proceso se lleva a cabo mediante el pilus que está formado por proteínas VirB (VirB1 a VirB11) y VirD4. Durante el proceso de transferencia también se transportan proteínas como VirE2, VirE3, VirE5, VirF que se encargan de brindarle protección al contra las nucleasas vegetales (Shah, 2013).

Para poder introducir el fragmento de DNA – T, *Rhizobium* tiene que romper la barrera de la pared celular para lo cual utiliza proteínas de virulencia llamadas VirB1 a VirB11 y VirD4 que le permiten introducir el DNA-T a través de la pared celular de la planta (Weir & Dalzell, 2020).

Según estudios, se menciona que las proteínas VirD4 y VirE2 contienen secuencias de localización nuclear (NLS), las cuales están implicadas en el transporte del DNA – T al núcleo (Hwang et al., 2017). La proteína VirF, una vez dentro de la célula vegetal junto con el complejo T proteolizan a VirE2 y, de esta manera se elimina VirE2 del complejo T, lo que permite que la integración del DNA-T sea más fácil (Shah, 2013).

Una vez dentro del núcleo de la célula vegetal, el DNA-T se integra al DNA vegetal mediante rupturas, que al ser reparadas integran el DNA-T. El DNA vegetal se ve modificado genéticamente al tener el fragmento de DNA de *Rhizobium* (Weir & Dalzell, 2020). Una vez integrado el DNA – T este es expresado por la célula vegetal, provocando de esta manera que los niveles de hormonas vegetales aumenten, causando una división celular descontrolada que da como resultado la formación de tumores (Lee Chil Woo et al., 2009).

Se ha reportado que las plantas han desarrollado mecanismos de protección para *Rhizobium*, entre ellos se encuentra los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), los cuales provocan un estallido de reacciones que termina con la muerte celular programada de la planta (Lee Chil Woo et al., 2009). Otro mecanismo reportado es la activación de enzimas para romper el DNA – T antes de su llegada al núcleo de la célula vegetal (Weir & Dalzell, 2020).

3.3 *R. radiobacter* desarmado

Para la obtención de una cepa de *R. radiobacter* que no cause la enfermedad de la agalla de la corona se tuvo que eliminar los genes (oncogenes), que son los responsables de la producción de los tumores. Esto sin afectar los genes vir y reemplazando de esta manera el DNA-T por un gen de interés que se desee transferir a una planta (Kreuzer & Massey, 2014), además de eliminar los genes OPS responsables de la síntesis de opinas que se encuentran en la región del DNA – T. Para llevar a cabo este proceso se debe introducir a una cepa de *R. radiobacter* el plásmido foráneo con regiones homólogas al DNA – T y un gen de resistencia a antibióticos. Al llevarse a cabo el proceso de recombinación entre el plásmido foráneo y el plásmido Ti se elimina el DNA – T y se introduce al plásmido Ti el gen que contiene la resistencia a antibióticos que permitirá la identificación de la nueva cepa de *Rhizobium* desarmada (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012).

Durante este proceso se conservan las secuencias importantes para integrar el DNA-T (Eckardt, 2006) que delimitan los sitios de origen y terminación de la transferencia del DNA-T (Van Montagu & Zambryski, 2017). Se sabe que los genes que participan en la síntesis de opinas y auxinas no son necesarias para la transferencia del DNA – T (Milena et al., 2005).

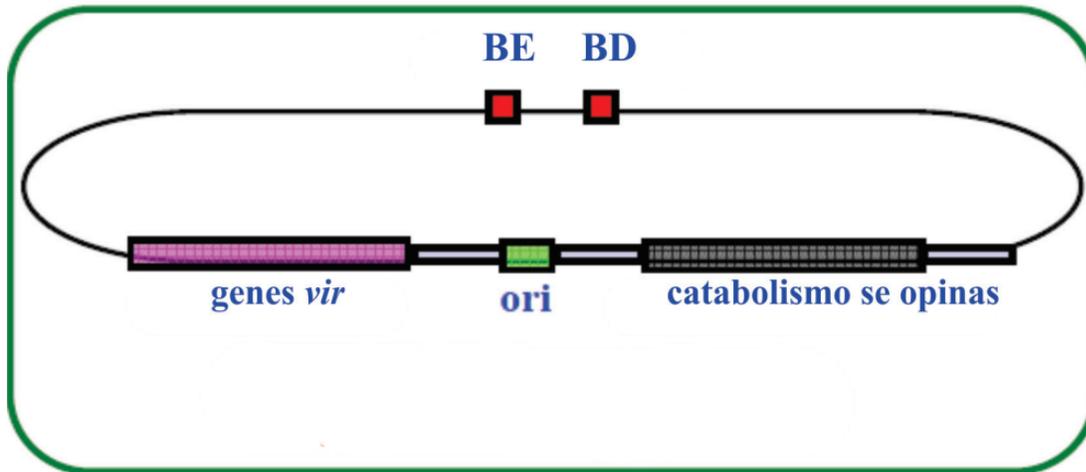


Figura 6. Estructura del plásmido Ti desarmado de *R. radiobacter* (Bevitori, 2014).

3.4 Transformación de *R. radiobacter* por el método congelación – descongelación

Para llevar a cabo la introducción de DNA plasmídico exógeno en otras células se han utilizado muchos métodos, dentro de los cuales destaca los procesos químicos porque son más fáciles de llevar a cabo, eso sin contar su rentabilidad (Singh et al., 2010). Autores como Mandel e Higa entre otros en 1970 describieron que este método utiliza una difusión pasiva que genera lesiones en la pared y membrana permitiendo así de esta manera al DNA ingresar a la célula (Holsters et al., 1978).

Este método se ha utilizado como una forma de alterar las células que es provocado por el crecimiento de cristales de hielo durante el proceso de congelación (Tian et al., 2010). La obtención de células competentes mediante cloruro de calcio (CaCl_2), seguido de un choque térmico, ambos pasos son importantes para poder facilitar la adsorción del DNA dentro del citoplasma de la célula (García Cárdenas et al., 2019), que implica la modificación química de la membrana celular, seguida de la absorción física del DNA extraño (Benny et al., 2022).

Se estima que la eficiencia de transformación por este método es entre 10² y 10³ transformantes por Pg de DNA. Dentro de las ventajas de este método es que no es necesario un equipo especializado (Wise et al., 2006).

3.5 Vectores binarios

En los primeros intentos por introducir genes en el DNA – T implican manipulaciones genéticas complicadas debido al tamaño de los plásmidos Ti, por sus bajas copias en *Rhizobium*, los difíciles procesos para aislar y la imposible replicación en *E. coli* (Lee Lan Ying & Gelvin Stanton B., 2008)

En 1980 se llevaron a cabo investigaciones para el desarrollo de vectores que permitieran llevar a cabo la transformación de plantas superiores, se logró eliminar el DNA-T de tipo salvaje que es causante del desarrollo de los tumores y que inhibe la regeneración de las plantas, dando lugar a cepas de *Rhizobium* desarmadas (Komari et al., 2006a).

Esta investigación dio a conocer que las regiones de virulencia (*vir*) y de DNA – T de los plásmidos Ti se pueden dividir en dos replicones separados, este sistema se denominó “sistema binario de T-DNA” (Lee Lan Ying & Gelvin Stanton B., 2008), en donde uno de los replicones contiene el DNA-T, mientras que el otro contiene los genes virales (Komari et al., 2006).

Este diseño permite separar la región de DNA-T en un plásmido más pequeño de los genes de virulencia y de esta manera obtener un plásmido Ti avirulento. Este vector puede replicarse tanto en *E. coli* como en *R. radiobacter* o tener dos replicones donde uno sea para *E. coli* y el otro para *R. radiobacter* (Lee et al., 2012).

Este sistema está completamente activo cuando las funciones *vir* y el DNA – T se encuentran ubicados en replicones compatibles separados en *Rhizobium* (An et al., 1989).

3.5.1 Estructura de los vectores binarios

Un vector binario está compuesto por un DNA-T que está delimitado por secuencias fronterizas como el borde derecho (RB) y el borde izquierdo (LB), contiene múltiples sitios de clonación (Komori et al., 2007a), así como un gen marcador seleccionable para plantas que les confieren resistencia a antibióticos, en plantas dicotiledóneas se ha utilizado con mayor frecuencia la kanamicina, también el vector binario contiene un gen informador y otros genes de interés (Komori et al., 2007b).

Los RB y LB son secuencias repetidas de 25 pb, al llevarse a cabo el proceso de transferencia las endonucleasas VirD1/VirD2 llevan los cortes en la 3era y 4ta base de esta manera durante este proceso el DNA-T se encuentra limitado por los nucleótidos 4-25 del LB, mientras que del RB se encuentran los nucleótidos 1-3 (Lee Lan Ying & Gelvin Stanton B., 2008), por lo que son considerados como los únicos elementos *cis* esenciales para llevar a cabo la transferencia del DNA – T, además cuentan con sitios de clonación (MCS) que son componentes genéticos que normalmente se clonan en los vectores binarios, así como un gen marcador de selección para transformación de plantas que debe expresarse en los callos de las células para facilitar la transformación (Komari et al., 2006b).

La columna vertebral del vector tiene sitios de replicación en plásmidos tanto de *E. coli* como de *R. radiobacter*, genes marcadores para la selección de bacterias (Komori et al., 2007a), funciones para la movilización de plásmidos entre bacterias y otros compuestos accesorios (Komori et al., 2007b).

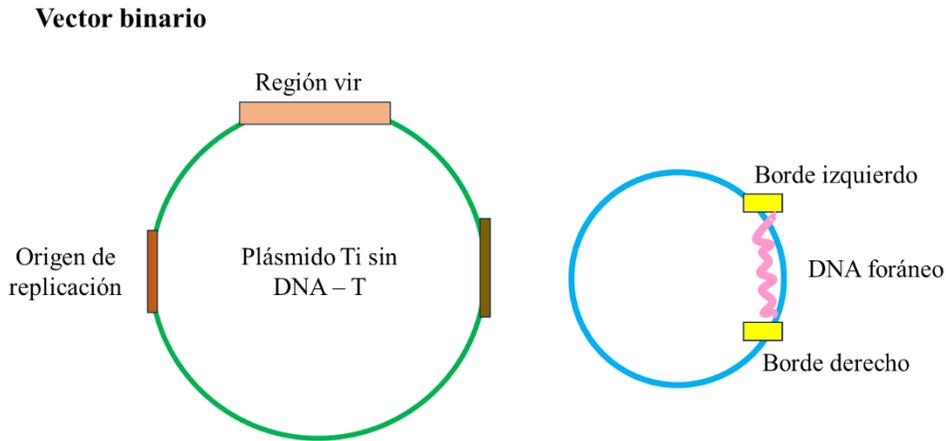


Figura 7. Estructura del sistema de un vector binario (Petri, 2005).

3.6 Vector pCAMBIA 1301

La transformación en plantas se realiza mediante la transferencia directa de DNA, por lo que se ha buscado vectores que sean más eficientes, la generación de un número mayor de copias, así como un mejor rendimiento de DNA y un mejor tamaño. Por lo que se han desarrollado una serie de vectores pCAMBIA derivados de los vectores pPZP para mejorar estos problemas. El vector pCAMBIA se ha utilizado para mejorar la transformación genética mediada por *Rhizobium*.

Entre las ventajas de la utilización de vectores pCAMBIA se pueden encontrar un alto número de copias en *E. coli* lo que permite un mejor rendimiento en la extracción de DNA plasmídico, así como que contiene un replicón pVS1 que le permite tener una mejor estabilidad en *Rhizobium*, un tamaño pequeño, que tiene un marcador de selección de resistencia bacteriana y de plantas correspondiente al antibiótico Kanamicina (Kan) (Leclercq et al., 2015).

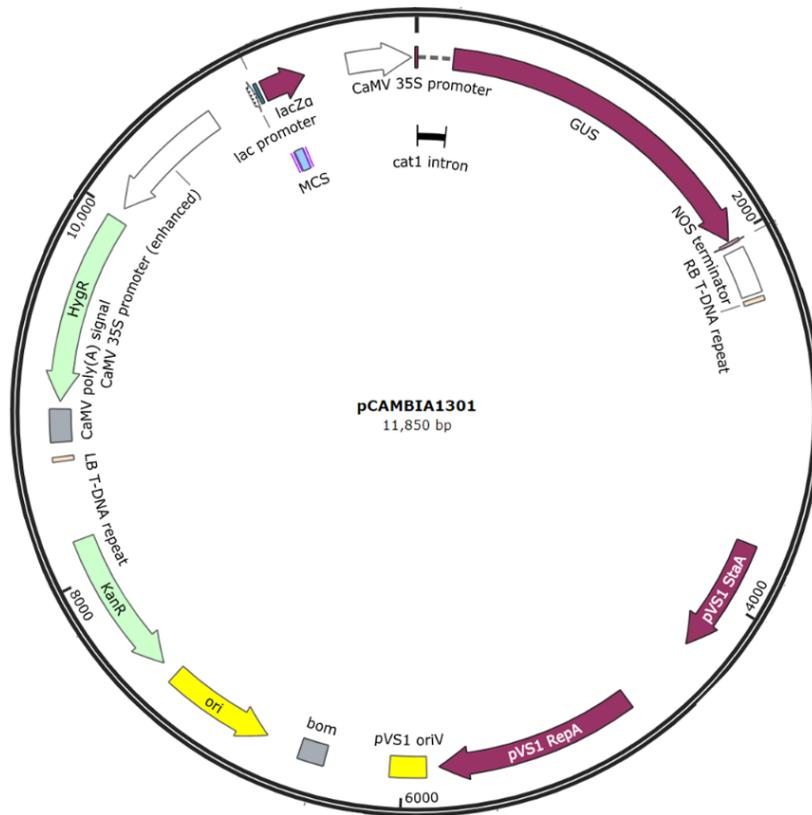


Figura 8. Componentes principales del vector pCambia 1301 (Snapgene)

3.7 *Cotesia rubecula*

Las avispas parasitoides se diferencian de otros insectos en que se pueden desarrollar dentro o fuera de otros artrópodos, existen grupos de avispas que son parasitoides idiobiontes que ataca al huésped y este queda paralizado por la hembra antes de la oviposición o los koinobiontes que atacan al huésped, se alimentan y crecen durante las primeras etapas del parasitismo (Harvey et al., 2016). Las avispas del género *Cotesia* son endoparasitoides que han sido usados para el control biológico de otros insectos. Este proceso lo lleva a cabo la avispa hembra que coloca sus huevecillos dentro de orugas y estas al llevar a su etapa de larva se alimentan del huésped (Gauthier et al., 2021).

Estos endoparásitos han desarrollado mecanismos que les ha permitido protegerse del sistema inmunológico del huésped y de esta manera lograr sobrevivir y desarrollarse dentro del huésped. Los mecanismos que se han reportado se mencionan la “regulación activa local” que se considera una estrategia pasiva en la cual los huevecillos del endoparásitoide es recubierto por componentes protectores, mientras que las estrategias activas se basan en una infección materna que se lleva a cabo durante la introducción de los huevos dentro del huésped.

Dentro de estos factores están los venenos, polydnavirus (PDV), partículas similares a virus (VLP) y proteínas ováricas, cada uno de estos factores dependerá directamente de la especie del parasitoide (Teng et al., 2016).

El endoparásitoide *Cotesia glomerata* y *Cotesia rubecula* son avispas cuyo origen radica en Europa, son consideradas como control biológico de *Pieris rapae*, sin embargo *C. glomerata* ataca principalmente a *Pieris brassicae* y solo en unas ocasiones a *P. rapae*, siendo de esta manera considerado así a *C. rubecula* como el principal control biológico de *P. rapae* (Vyas et al., 2020).

C. glomerata ataca a las larvas de *P. rapae* durante el quinto estadio cuando el daño es mayor debido a la alimentación de la larva, a diferencia de *C. rubecula* que ataca a esta larva durante el primer y segundo estadio, matándola en el cuarto estadio cuando el daño por la alimentación de la larva es menor (HerliHy et al., 2012).

Una vez llevado a cabo el proceso de parasitación los genes del bracovirus *Cotesia rubecula* (CrBV) se expresan en la larva del huésped *P. rapae* en un tiempo prolongado de 4 a 12 horas dando lugar a la producción de proteínas para desactivar el sistema inmune del huésped (Glatz et al., 2003).

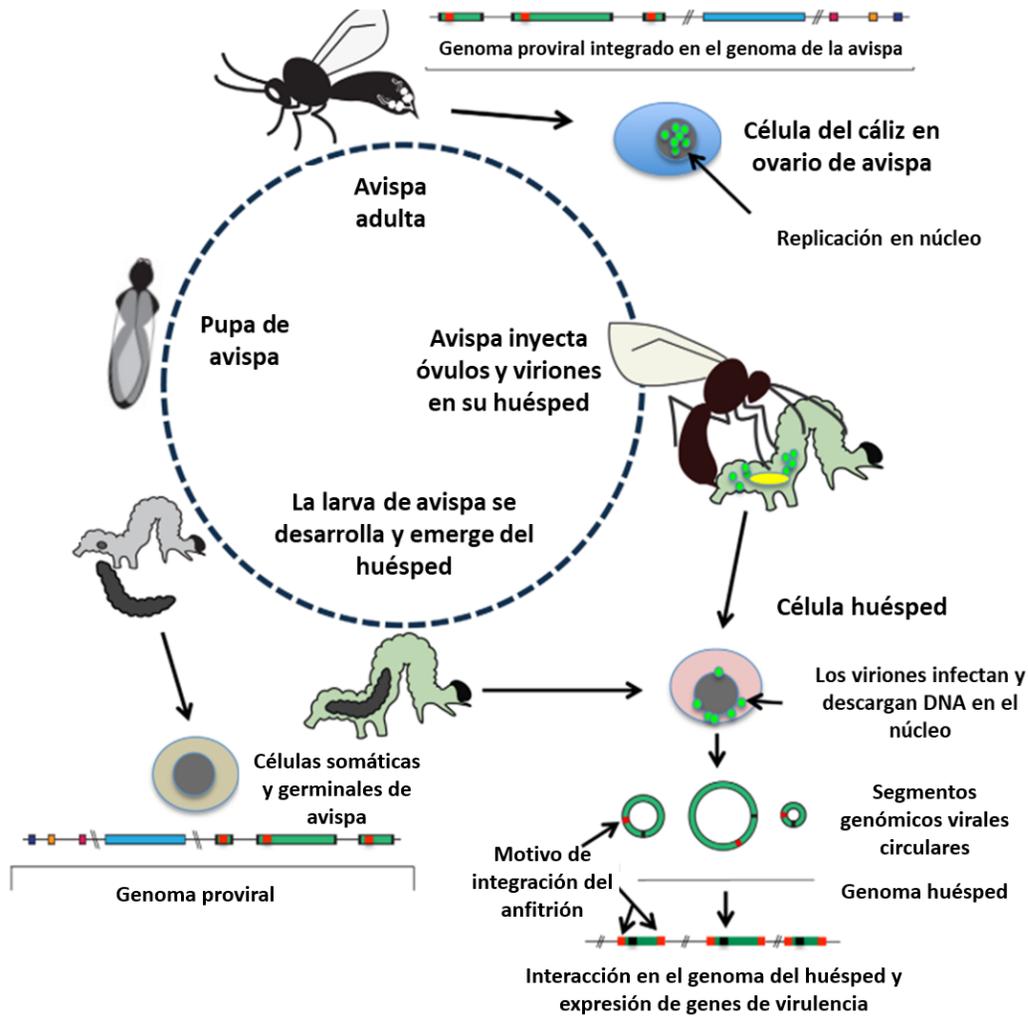


Figura 9. Ciclo de vida de *Cotesia rubecula* y etapa donde intervienen los polydnavirus (Strand & Burke, 2012).

3.7.1 Polydnavirus

Los insectos huéspedes responden a objetos extraños formando una cápsula en su superficie de múltiples capas de hemocitos, por lo que los endoparasitoides han desarrollado mecanismos evolutivos que permiten evitar o suprimir esta respuesta de encapsulamiento, entre los cuales están factores maternos como los genes de polydnavirus (PDV) (Asgari, 2006), estos genes se consideran una evolución importante ya que aseguran la supervivencia de las larvas del endoparásitoide (Glatz et al., 2003).

Estos PDV viven en asociación con avispas parasitoides, que son insectos que viven libremente cuando son adultos y en la etapa larvaria (polillas y mariposas) ponen sus huevos dentro o fuera de otros insectos (Strand & Burke, 2012).

Los PDV fueron descubiertos entre los años 1960 y 1970 cuando se analizan los tractos reproductivos de unas especies de insectos llamadas avispas parasitoides y solo son producidos por avispas que pertenecen a las superfamilias Ichneumonidae y estas a su vez se subdividen en dos familias, *Braconidae* e *Ichneumonidae*, los PDV producidos por estas dos familias son morfológicamente diferentes entre sí.

Fueron reconocidos como PDV porque estos se replican en las células del cáliz de las avispas, morfológicamente parecen virus, empaquetan ácido nucleico, son infecciosos y contienen genes que se transcriben después de la infección de los huéspedes (Strand & Burke, 2015).

Los PDV se han reconocido como un grupo de virus de DNA bicatenario (DNAbs), estos se encuentran en el cromosoma de la avispa como un provirus y se transmite de generación en generación de forma vertical. Su genoma está constituido por segmentos circulares de DNAbc (Kumar & Kim, 2014).

La segmentación suele ser externa, pueden llegar a tener hasta 28 segmentos de DNA con un tamaño del genoma de aproximadamente 250 kb por lo que se hace una comparación con los virus de ARN que de igual manera se encuentra segmentado, pero en una menor cantidad, con lo que se cree que los PDV tuvieron que pasar por muchos procesos evolutivos que les permitió llegar a una segmentación de su genoma viral (Webb & Cui, 1998).

Los PDV se inyectan en el hemocele de un huésped durante la oviposición junto con el huevo del parasitoide como se muestra en la **figura 10**, así como otras secreciones proteicas maternas (Glatz et al., 2004a), sin embargo, estos no se replican en las células huéspedes ya que el DNA empaquetado no contiene genes relacionados con su replicación (Asgari, 2006).

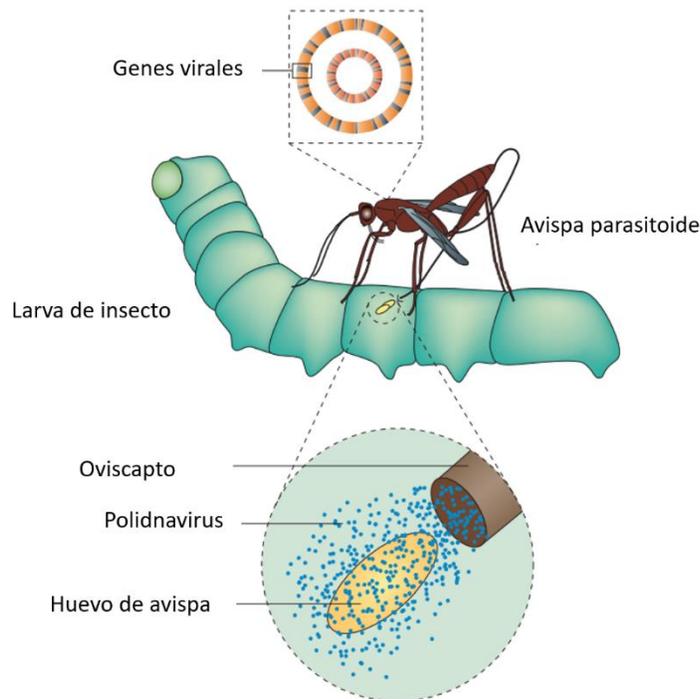


Figura 10. Mecanismo de introducción de polydnavirus en huésped de avispa parasitoide (Roossinck, 2011).

También se introduce un veneno de la glándula venenosa que provoca alteraciones fisiológicas completas que es un factor beneficioso para aquellos endoparasitoides que carecen de PDV, el cual permite protegerse del sistema inmunológico (Teng et al., 2016). Además, este veneno está asociado a la parálisis, así como a la detención del desarrollo del huésped (Asgari, 2006).

Estos PDV ingresan a células del hemocito y células grasas del huésped, las transcripciones del virus se detectan durante las primeras horas de la parasitación. El bracovirus de *C. rubecula* se ha destacado por generar cuatro productos genéticos que están relacionados con la inactivación reversible del sistema inmunológico celular (Glatz et al., 2004a).

3.7.1.1 Genes de polydnavirus

Se han reportado la proteína tirosina fosfatasa (PTP) que pertenece a una familia de genes de Bracovirus que provocan la desfosforilación de las proteínas dianas ocasionando una interrupción de los ciclos de quinasa/fosfatasa que participan en múltiples procesos en el desarrollo y la inmunidad del huésped. Entre otras está las proteínas CpBV – ELP1 que es codificada por el bracovirus *Cotesia vestalis* (CvBV) que suprime las poblaciones de hemocitos ((Ye et al., 2018).

Entre otros genes que se han reportado están los genes de virulencia que participan en la desactivación del sistema inmunológico del huésped dentro de los cuales se encuentran los genes Glc, Ank de BV e IV, los genes Egf y el gen BV15 β que está implicada en el crecimiento del anfitrión ((Strand & Burke, 2015).

Se han logrado encontrar otros genes específicos de polydnavirus del género *Cotesia*, dentro de los que se pueden encontrar *EPI*, *histona viral H4* y *CrVI* (Kumar & Kim, 2014).

El gen CrV1 es un gen encapsulado que se expresa como una transcripción única en los hemocitos del huésped, este es secretado por las células infectadas al suero y al interactuar con la superficie de los hemocitos que provoca la despolimerización de los componentes estructurales de actina citoplasmática (Glatz et al., 2004a).

3.7.1.1.1 Gen *CrVI*

Según estudios se ha determinado que el bracovirus de *Cotesia rubecula* (CrBV) solo genera cuatro productos genéticos en la larva huésped, encontrándose al gen *CrVI* como el principal que se expresa en el huésped (Wei et al., 2016), que es el responsable de codificar una glicoproteína que permite inactivar los hemocitos del huésped y de esta manera se impide el encapsulamiento del óvulo del parasitoide (Glatz et al., 2003).

CrvI es un gen encapsulado que se expresa como una transcripción única (Glatz et al., 2004b) y una vez que esta proteína ingresa, desestabiliza el citoesqueleto del huésped, dentro de lo que se sabe de la proteína CrV1 es que es incubado en la hemolinfa y absorbido por los hemocitos, pero esta proteína no es absorbida en ausencia del plasma hemolinfa (Asgari & Schmidt, 2002). También se sabe que no existe un receptor para CrV1 en los hemocitos, sino que es necesario formar un complejo con un factor plasmático (Schmidt et al., 2005).

IV. Métodos y materiales

En el desarrollo de este trabajo se llevaron a cabo procedimientos para obtener clonas de *Rhizobium radiobacter* transformadas con un vector binario que acarrea el gen *CrV1* del polidnavirus de *C. rubecula*, el procedimiento general para este fin, esta esquematizados en la **figura 11**).

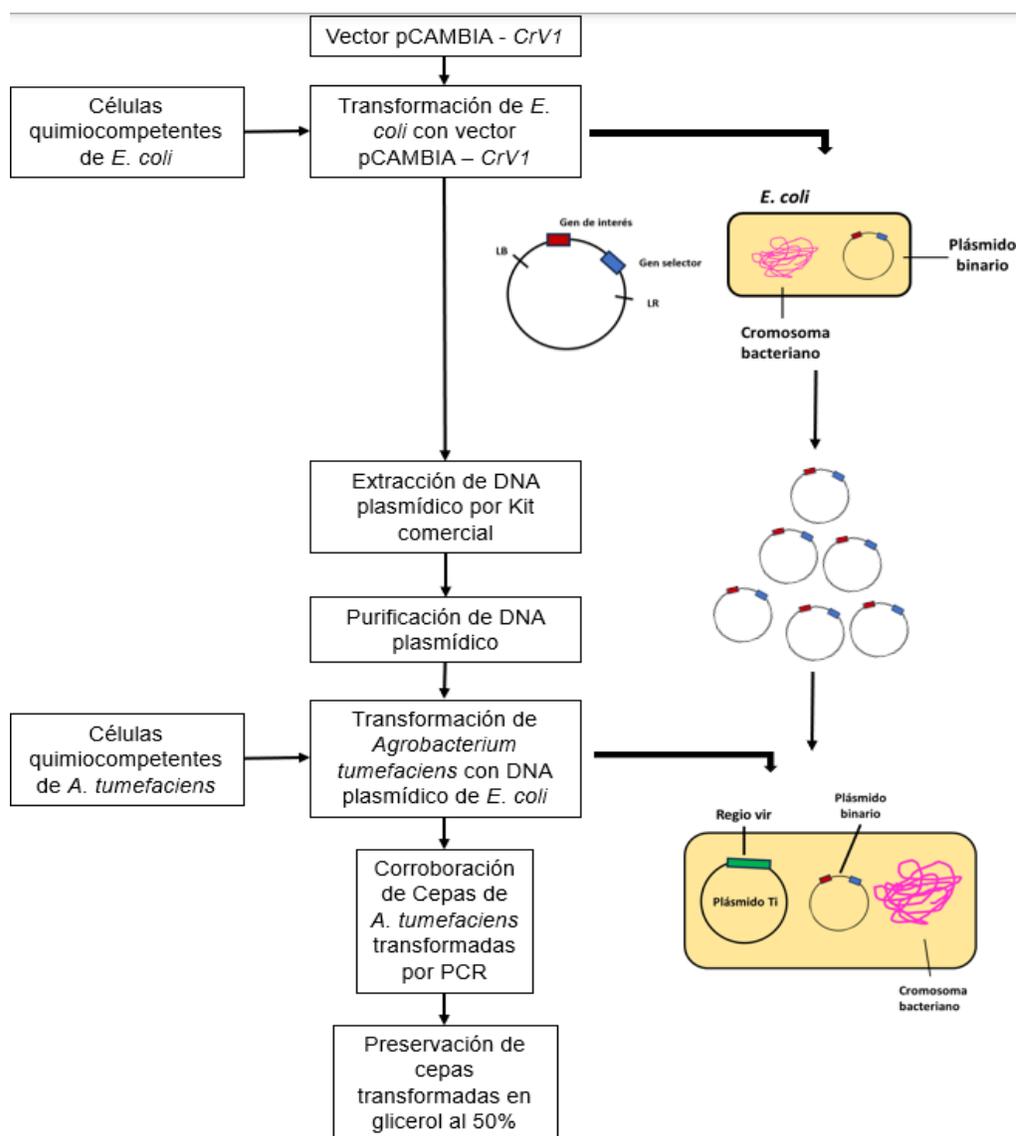


Figura 11. Esquema general metodológico para la obtención de cepas transformadas de *R. radiobacter*.

4.1 Transformación de *E. coli* Dh5α con vector pCAMBIA-CrV1

El vector pCAMBIA – CrV1, previamente construido, se usó para transformar la cepa quimio-competente de *E. coli* Dh5α por el método choque térmico. Se comenzó tomando dos microtubos de 1.5 mL previamente congelados, al primer microtubo se le adicionó 100 ng del vector pCAMBIA – CrV1 y 100 µL de células competentes de *E. coli*. A un segundo microtubo se le adicionó 1 µL del agua ultrapura estéril y 100 µL de células competentes de *E. coli*, que sirvió como control negativo.

Se colocaron ambos microtubos en hielo por 30 minutos, después se realizó un choque térmico a 42 °C por 30 segundos, pasado esto se colocaron nuevamente en hielo por 5 minutos y se le adicionó 1 mL de medio de cultivo LB líquido (caldo de lisogenia) a cada uno de los tubos. Se dejó incubar las células a 37°C y 200 rpm (revoluciones por minuto) durante dos horas.

Una vez culminado el tiempo de incubación se sembraron las células transformadas en cajas Petri con medio agar-LB (12.5gr /L- 25 gr/L) adicionadas con el antibiótico kanamicina (50 µg /mL) y se incubaron a 37°C por 12 horas.

4.2 Extracción del vector – pCAMBIA – CrV1

Las colonias que resultaron de la transformación se inocularon en 5 mL de medio LB líquido (25 gr/L) con kanamicina (g/mL), se incubaron a 37 °C y 180 rpm por 12 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se pasó a realizar la extracción del DNA plasmídico mediante el estuche comercial de purificación de DNA plasmídico Wizard Plus SV Minipreps (Promega, USA).

Se comenzó transfiriendo el medio con el crecimiento bacteriano a un tubo de 5 mL, se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm para descartar el sobrenadante y se secó el tubo invirtiendo sobre un papel secante para eliminar el exceso del medio. Se añadieron 250 μ L de la solución de resuspensión celular al tubo de 5 mL y, se resuspendió completamente el sedimento celular mediante agitación vertical y se transfirió a un tubo de microtubo estéril de 1.5 mL.

Se agregaron 250 μ L de la solución de lisis celular y se mezcló invirtiendo el microtubo 4 veces, se incubó hasta que la resuspensión de células se aclaró (cinco minutos aproximadamente) a temperatura ambiente, después se añadieron 10 μ L de la solución de proteasas alcalina y se mezcló invirtiendo el microtubo nuevamente 4 veces y se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 350 μ L de solución de neutralización y se mezcló inmediatamente invirtiendo el microtubo 4 veces.

Se centrifugó el lisado bacteriano a 13000 rpm en una centrifugadora durante 10 minutos a temperatura ambiente, se prepararon unidades de purificación de DNA plasmídico donde se insertó una columna de centrifugación en un tubo de recolección de 2 ml.

Una vez llevada a cabo la centrifugación se transfirió el lisado aclarado (aproximadamente 850 μ L) a la columna, se evitó alterar o transferir el precipitado blanco con el sobrenadante y posteriormente el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 13000 rpm en una microcentrífuga durante 1 min a temperatura ambiente. Se retiró la columna del microtubo de recolección y se desechó el flujo del tubo de recolección, se volvió a insertar la columna en el tubo de recolección, se agregaron 750 μ l de la solución de lavado de columna, previamente diluida con etanol al 95% a la columna de centrífuga, se volvió a centrifugar a 13000 rpm en una centrifuga durante 1 min a temperatura ambiente.

Se retiró la columna y se desechó el filtrado, se repitió el procedimiento de lavado con 250 μ L de solución para posteriormente volver a centrifugar a máxima velocidad durante dos minutos a temperatura ambiente. Finalmente se transfirió la columna de centrífuga a un microtubo nuevo y estéril de 1.5 mL y se hidrató el DNA del plasmídico agregando 100 μ L de agua libre de nucleasas a la columna de centrífuga. Se centrifugó a máxima velocidad durante un minuto a temperatura ambiente en una microcentrífuga. Se retiró el microtubo de 1.5 mL y se desechó la columna de centrifugación y se guardó el DNA plasmídico purificado a -20°C .

4.3 Electroforesis del DNA plasmídico

Para comprobar el éxito de la extracción del DNA plasmídico, se realizó una electroforesis, donde se cargó la muestra de DNA plasmídico del paso anterior en un gel de agarosa al 1% y se visualizó en un fotodocumentador AxygenTM.

El gel se colocó en una cámara de electroforesis donde se sumergió en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1 mM, pH 8+/-0,2), se tomó 4 μ l de cada reacción y se homogenizó con 2.4 μ l de amortiguador de carga (5x Buffer + Diamond Nuclei Acid Dye, ambos de PromegaTM USA), que posteriormente se colocó en el gel de agarosa.

4.4 Amplificación de DNA plasmídico por PCR con cebadores (NCOCRF – bstcrR) y (PBINNOST – 986-1005CC)

El fragmento CrV1 se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores NCOCRF – bstcrR, al igual que los cebadores PBINNOST – 986-1005CC (**Tablas 1**) para lo cual se utilizó un termociclador Axygen® MaxyGene II donde se utilizaron las T_m (62°C) y (51°C) respectivamente.

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados durante el estudio.

Cebadores	Secuencia	T_m (°C)
NCOCRf	5' ATACCATGGATGTCACCTCGTCAAAGTGC 3'	63°C
BStcrR	5' ATAGGTCACCTCAGATGCTACATATAGGGA 3'	61°C
62-84Pcamv	5'GTCACCTTTATTGTGAAGATAGT 3'	51°C
396-74CR	5'TCCACTGGATAATTCACATAATA 3'	49°C
GUSF	5'TCGTCCGTCCTGTAGAAA 3'	52°C
GUSR	5' TTCACCGAAGTTCATGCC 3'	55°C

Tabla 2. Programa de termociclador utilizado para PCR

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	5 min	1
94 °C	30 s	35
T _m de Cebadores	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	90 s	1
4 °C	∞	

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR

Volumen de reacción para 25 μ L		
Componentes	Volumen	Concentración final
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12 μ L	1X
Cebador forward, 10 μ M	0.25 – 2.5 μ L	0.1 – 1.0 μ M
Cebador reverse 10 μ M	0.25 – 2.5 μ L	0.1 – 1.0 μ M
DNA	1 – 5 μ L	<250ng
Agua libre de nucleasas hasta	25 μ L	N.A.

Primero se realizaron tres reacciones de PCR con los cebadores NCOCRF – bstcrR (**Tabla 1**), para lo cual se hizo mezcla de reacción con los componentes de reacción (**Tabla 3**) sin adicionar el DNA.

Después se tomaron tres microtubos de PCR a los cuales se le añadió 1 μ L de DNA donde el primer microtubo se le colocó el plásmido pCAMBIA – CrV1, a un segundo microtubo un 1 μ L del vector pCAMBIA 1301 y a un tercer microtubo 1 μ L por agua ultrapura estéril en lugar de DNA. A cada tubo se le adicionó la mezcla de reacción para obtener un volumen total de 10 μ L.

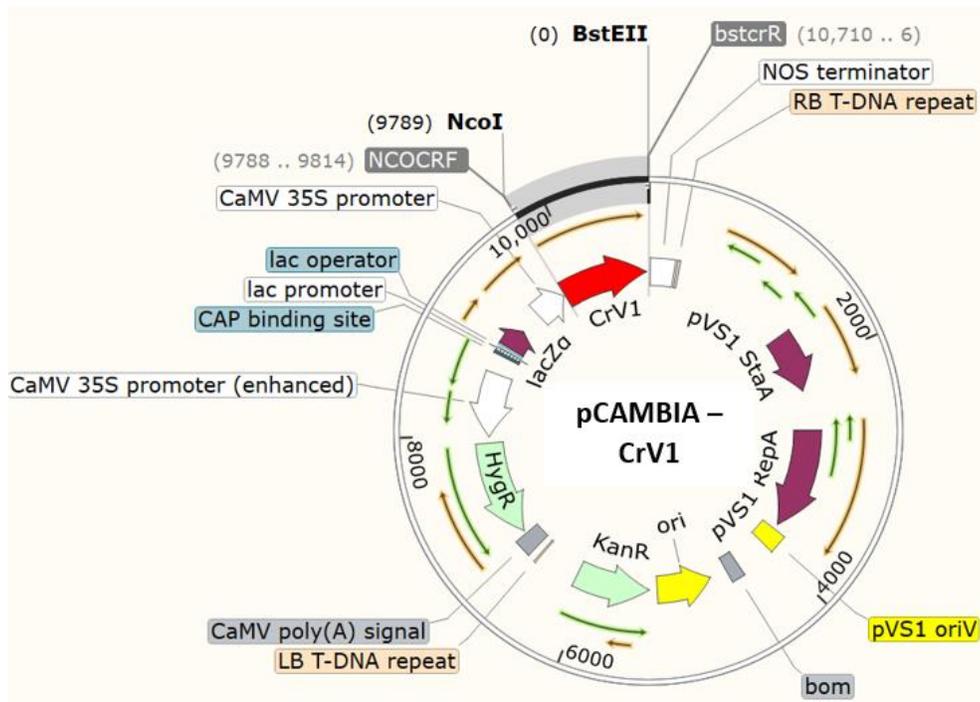


Figura 12. Región de reconocimiento en la secuencia de los cebadores NCOCRF – bstcrR en el vector pCAMBIA – CrV1.

Se realizó una segunda PCR, con las mismas reacciones de 10 μ L, pero usando los cebadores PBINNOST - 986-1005CC mostrados en la **Tabla 1**.

Para comprobar el éxito de amplificación del DNA plasmídico con los cebadores, se realizó una electroforesis, donde se cargaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% y se visualizó en un fotodocumentador AxygenTM.

4.5 Cultivo y amplificación de *R. radiobacter*

Se inoculó *R. radiobacter* en 2 mL en medio de cultivo YEB (16.24 gr /L), al cual se le adicionó el antibiótico rifampicina (50 µg/ mL) y se dejaron crecer las células durante toda la noche a una temperatura entre 25 – 28 °C con agitación (220 – 250 rpm).

4.6 Preparación de cepas de *R. radiobacter* quimiocompetentes mediante Cloruro de Calcio (CaCl₂)

Se tomaron los 2 mL de cultivo inoculado para inocular 50 mL del mismo medio en un matraz de 250 mL hasta lograr hasta que la DO600 del cultivo esté entre 0 y 1,5.

Se centrifugaron las células a 10 000 g durante 10 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 5 mL de CaCl₂ mM frío y se repitió la centrifugación.

Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de CaCl₂ mM frío y se prepararon alícuotas de 100 µL de la solución celular en microtubos de 1.5 mL y se guardaron a – 80 °C.

4.7 Transformación de *R. radiobacter* con el DNA plasmídico con el vector pCAMBIA

– CrVI por el método de congelación / descongelación.

Se utilizó el DNA plasmídico que fue extraído de *E. coli* el cual contenía el vector pCAMBIA – CrVI para llevar a cabo la transformación de la cepa quimio competente de *R. radiobacter*.

Para ello se tomaron tres microtubos de 1.5 mL, al primer tubo se le adicionó 1 µL del vector pCAMBIA – CrVI y 100 µL de células quimiocompetentes previamente preparadas de *R. radiobacter*, se tomó un segundo microtubo de 1.5 mL y se le adicionó 1 µL del agua

ultrapura estéril y 100 μ L de células competentes de *R. radiobacter*. A un tercer microtubo de 1.5 mL se le adicionó 1 μ L del vector pCAMBIA - CcV1 y 100 μ L de células competentes de *R. radiobacter*, estos últimos tubos de reacción sirvieron como controles negativos para determinar el éxito de la transformación.

Una vez preparados los microtubos de reacción se colocaron siempre en hielo, pasando posteriormente por un choque térmico en nitrógeno líquido por cinco minutos, para posteriormente pasar por un proceso de descongelación durante 10 minutos a temperatura ambiente, una vez descongeladas las muestras se adicionó a cada microtubo 1 mL de medio YEB y se incubó de entre 25 a 28°C durante un periodo de tiempo de 2 a 4 horas con agitación.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron los microtubos en una microcentrífuga a 2500 rpm durante 10 min, se desechó 600 μ L de medio y se resuspendieron las células nuevamente y estas se sembraron sobre placas Petri con medio agar-YEB (15 gr/L-16.24gr /L) que contenían los antibióticos kanamicina (50 mg/ mL) y rifampicina (50 mg/ mL) y se dejó crecer a una temperatura de entre 25 a 28°C por 48 horas.

4.8 Obtención de colonias de *R. radiobacter* transformadas y comprobación de mediante PCR.

Se obtuvieron 32 cepas de *R. radiobacter* transformadas y se tomaron para ser diluidas en microtubos de 1.5 mL, donde se le había adicionado previamente 10 µL de agua ultrapura estéril para ser resuspendidas. Una vez resuspendidas las cepas se les realizo una amplificación por PCR con los cebadores 62-84PCAM – 396-74Cr, así como con los cebadores GusF – GusR (**Tabla 1**), para su comprobación en reacciones de 10 µL.

Primero se realizaron 40 ciclos de reacción de 10 µL en microtubos de PCR con los cebadores 62-84PCAM – 396-74Cr, para lo cual se hizo una mezcla de reacción con los componentes de reacción sin adicionar la cepa transformada (**Tabla 3**).

Se realizo una PCR para cada una de las cepas transformadas, así como para determinados controles negativos. Entre los controles negativos se utilizó el vector pCAMBIA 1301, es decir sin el gen CrV1 y agua ultrapura estéril.

Para esta reacción de PCR se utilizó el programa mostrado en la **Tabla 2** donde se utilizó una Tm de **50 °C**.

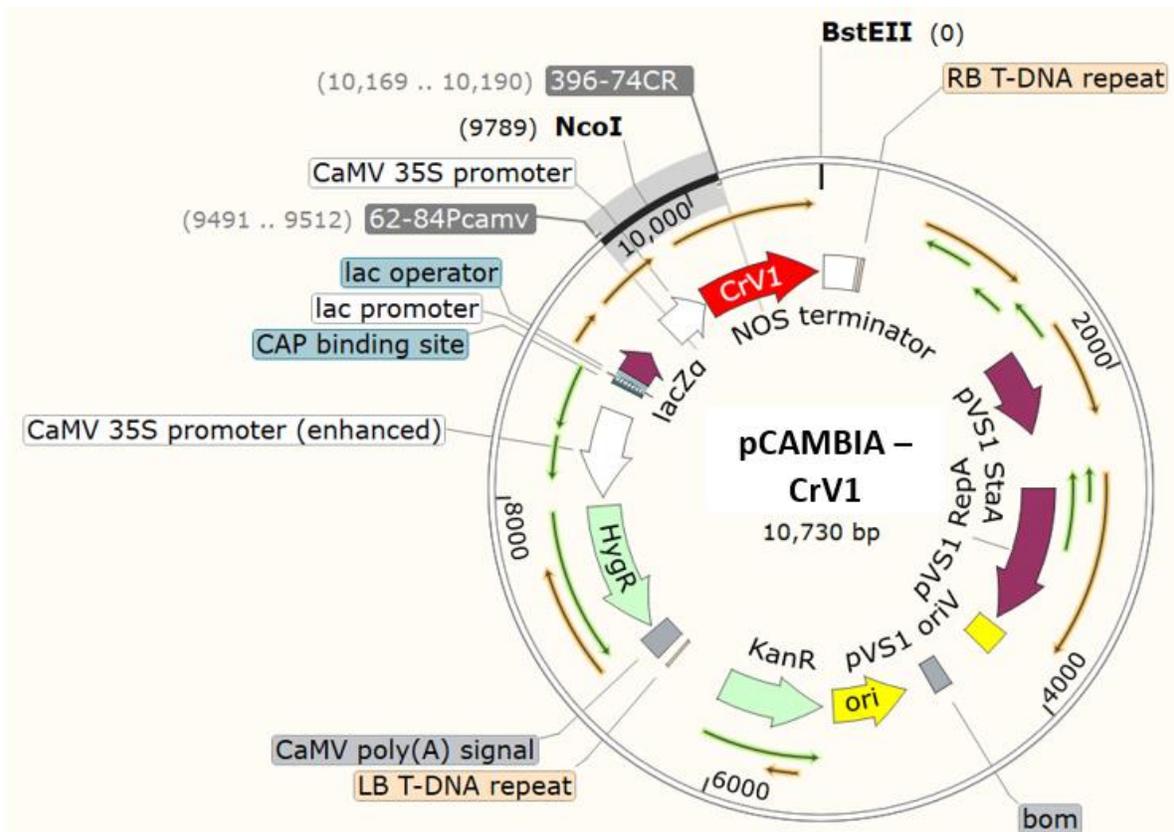


Figura 14. Región de reconocimiento en la secuencia de los cebadores 62-84PCAM – 396-74Cr en el vector pCAMBIA – CrV1.

Siguiendo la misma metodología anterior se realizó una segunda PCR con los cebadores GusF – GusR, donde de igual manera se realizaron 40 ciclos de reacción, donde se incluían controles positivos y negativos. Como controles negativos se encontraba *R. radiobacter* transformado con el vector NLPC y el agua ultrapura estéril, así como *R. radiobacter* nativo como control positivo.

Para esta reacción de PCR se el programa mostrado en la **Tabla 2** donde se utilizó una T_m de **53 °C**.

Transcurrido el tiempo de incubación se tomó de cada uno de ellos 1 μ L de cultivo que fue colocado en un microtubo de 1.5 mL y se resuspendió en 199 μ L de agua ultrapura estéril (1:200 μ L).

Después se realizó nuevamente dos PCR con los juegos de cebadores 62-84PCAM – 396-74Cr y GusF – GusR (**Tabla 1**).

Primero se realizaron una mezcla de los componentes de PCR con los cebadores 62-84PCAM – 396-74Cr (**Tabla 1**) para 6 reacciones de PCR de 10 μ L usando los cebadores, entre las reacciones se incluyeron dos controles negativos dentro de los cuales se encontraron *R. radiobacter* nativo y agua ultrapura estéril, donde se usó el programa de PCR con una Tm de **50 °C**.

De igual manera se realizó otra mezcla de los componentes de PCR (**Tabla 3**) para 6 reacciones de 10 μ L usando los cebadores GusF y GusR (**Tabla 1**), donde se incluyó un control positivo *R. radiobacter* nativo, así como un control negativo que fue el agua ultrapura estéril, donde se utilizó el programa de PCR mostrado en la **Tabla 2** donde se usó una Tm de **53 °C**.

Los productos obtenidos de las reacciones de la PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% para su comprobación y se visualizó en un fotodocumentador AxygenTM.

El gel se colocó en una cámara de electroforesis donde se sumergió en Amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1 mM, pH 8+/-0,2), se tomó 4 μ l de cada reacción y se homogenizo con 2.4 μ l de amortiguador de carga.

V. Resultados

5.1 Obtención de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico (**figura 16**), permitió la obtención del vector pCAMBIA – CrV1, el plásmido obtenido fue utilizado como sustrato para realizar PCR con los cebadores específicos del gen CrV1, NCOCRf y bsterR permitió su amplificación. Como resultado de la PCR se demostró que efectivamente tanto el vector contiene el fragmento CrV1, como la extracción fue exitosa.

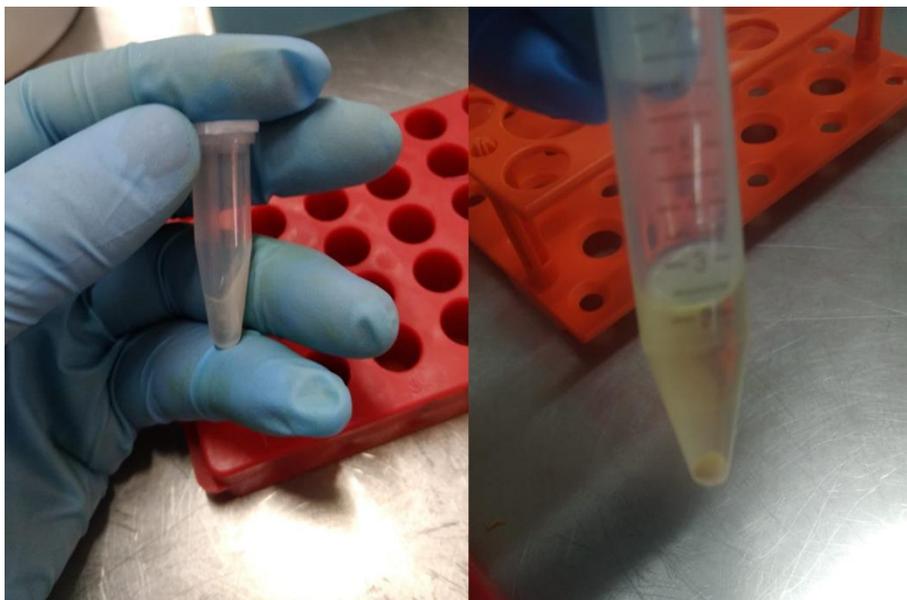


Figura 16. Extracción del plásmido pCAMBIA – CrV1 de *E. coli*.

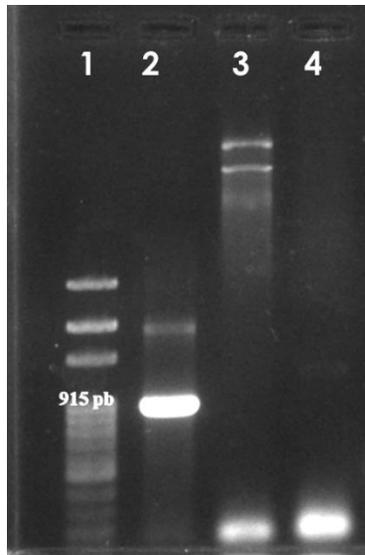


Figura 17. Gel de electroforesis de los productos de PCR usando cebadores NCOCRf – bstcrR.

Como se muestra en la **Figura 17**, en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular de 1Kb (Mn), en el carril 2 se encuentra el fragmento CrV1 que se amplificó con los cebadores NCOCRf y bstcrR, mientras en el carril 3 es el control negativo donde se cargó el producto de PCR utilizando el vector pCAMBIA 1301 como ADN blanco, así como en el carril 4 agua ultrapura estéril que fueron usados como controles negativos de la PCR.

5.2 Obtención de colonias transformadas de *R. radiobacter* con DNA plasmídico con el fragmento CrV1

La transformación de *R. radiobacter* por método congelación-descongelación se logró determinar mediante su crecimiento en medio de cultivo agar-YEB, sobre placas Petri que contuvieron los antibióticos kanamicina y rifampicina, donde se obtuvieron 32 colonias como se muestra en la **Figura 18**, donde se puede observar en las placas a, b, c, d, mientras que la placa e se logra observar el control negativo, que demuestra que *R. radiobacter* contiene el vector pCAMBIA – Crv1.

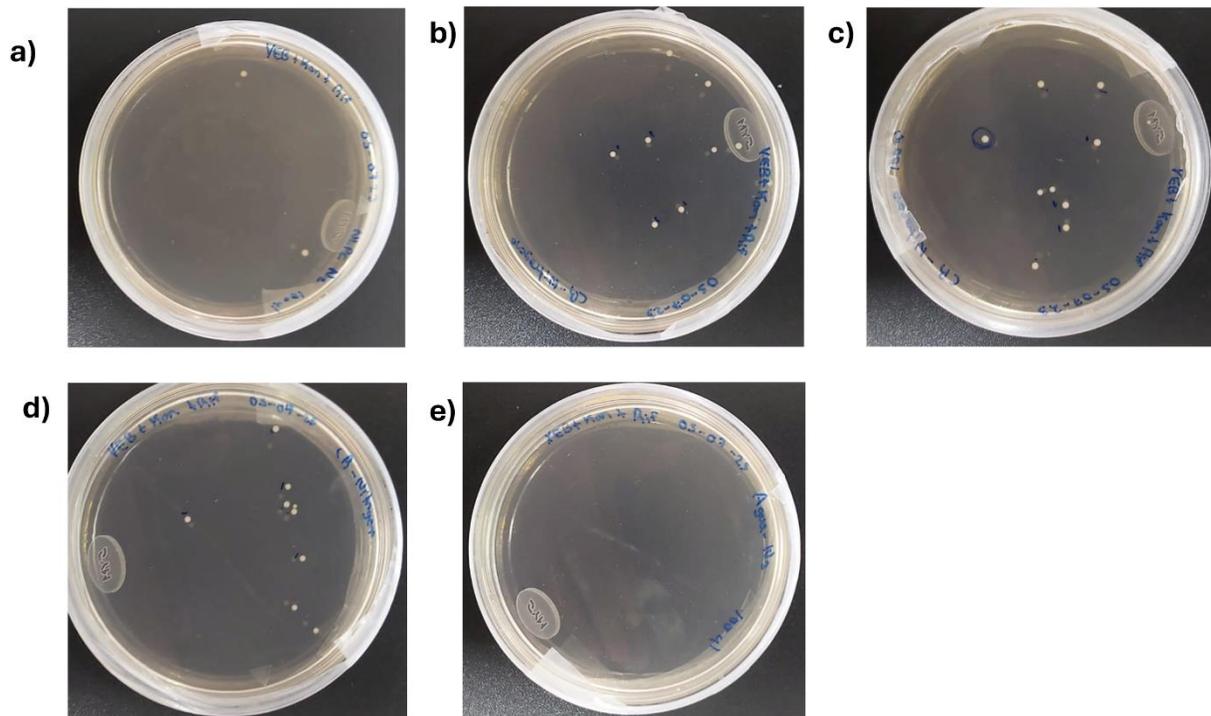


Figura 18. Colonias de *R. radiobacter* transformadas con DNA plasmídico con fragmento CrV1.

5.3 Productos de PCR de *R. radiobacter* transformadas con el fragmento CrV1

De las colonias resultantes de *R. radiobacter* transformadas, se realizó PCR utilizando los cebadores 62-84PCAM – 39674CR (**Figura 14**), donde se logró determinar la amplificación en todas las colonias, que se corroboró mediante un gel de agarosa como se muestra en la **Figura 19**.

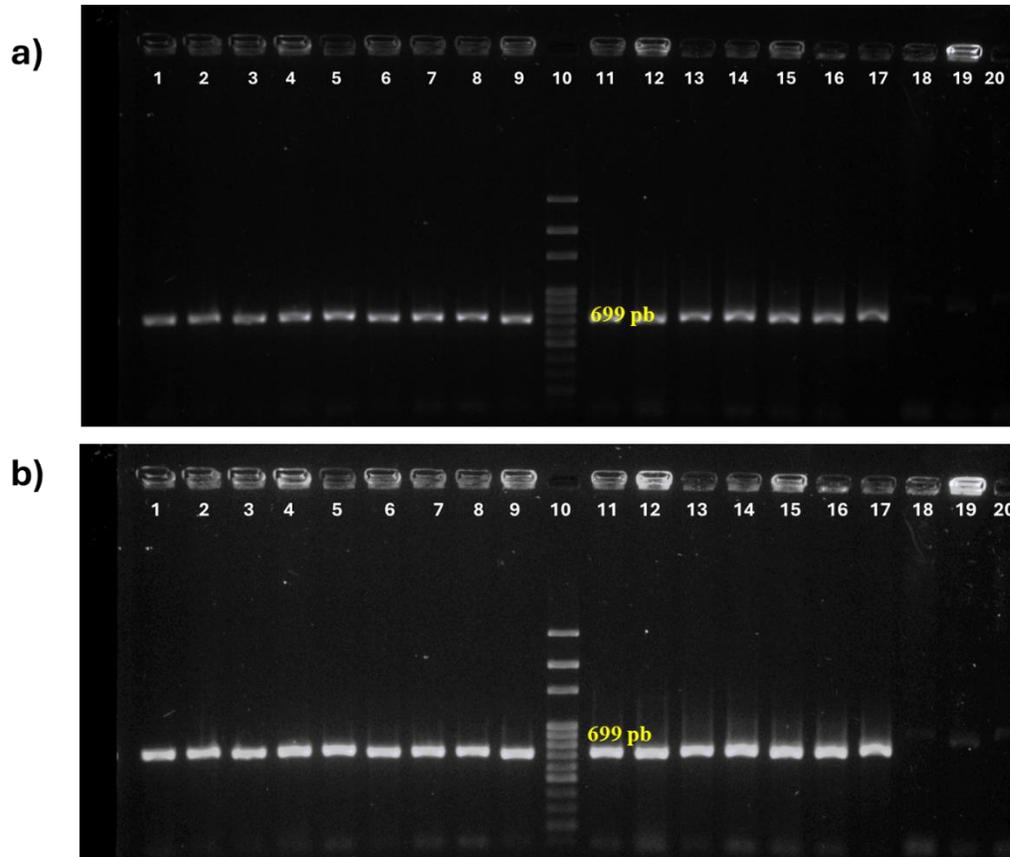


Figura 19. Gel de electroforesis con productos de PCR de colonias de *R. radiobacter* transformadas utilizando cebadores 62-84PCAM – 396-74CR.

En los geles se logra observar del carril 1 al 9 y del carril 10 al 16 el resultado de las cepas transformadas que logran su amplificación con los cebadores 62-84PCAM – 396-74CR, así como los controles negativos que se encuentran en el carril 18 donde se encontraba la cepa de *R. radiobacter* transformada con el vector pCAMBIA 1301, en el carril 19 *R. radiobacter* y en el carril 20 el agua ultrapura estéril, mientras que el carril 10 se encontraba el marcador molecular.

De la segunda PCR de las colonias transformadas de *R. radiobacter* utilizando los cebadores GusF y GusR como se muestra en la **Figura 20**.

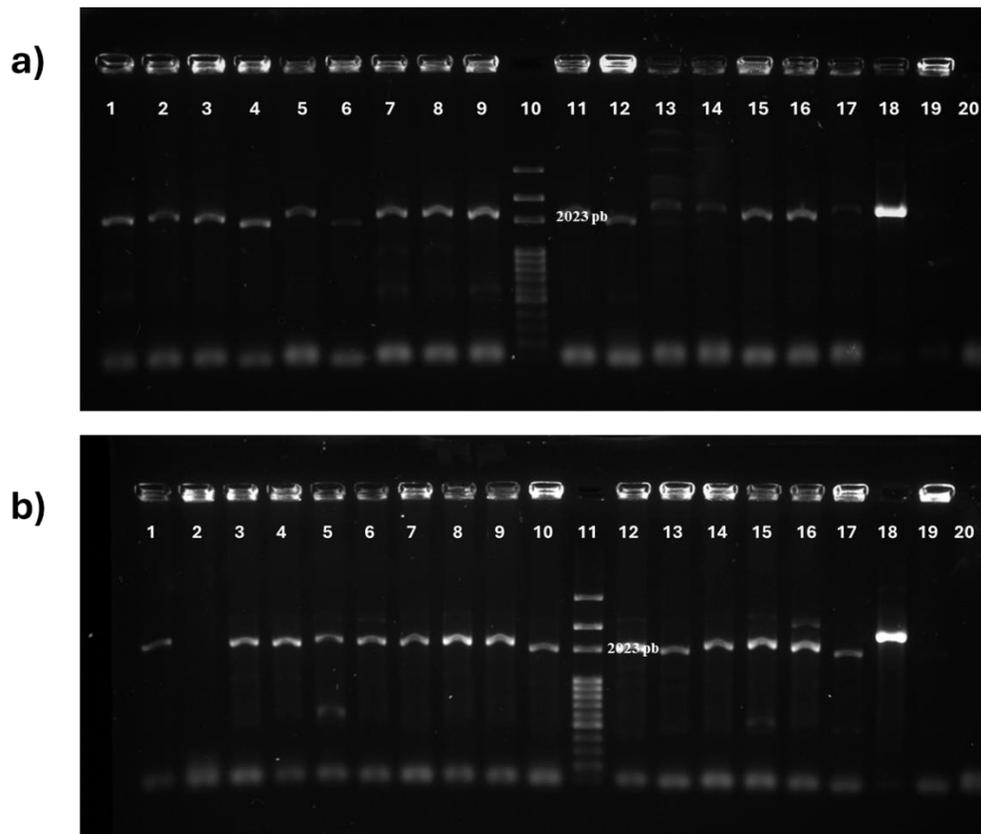


Figura 20. Gel de electroforesis con productos de PCR de colonias de *R. radiobacter* transformadas utilizando cebadores GusF – GusR.

En los geles se logra determinar las 32 cepas transformadas de *R. radiobacter* donde se logra observar del carril 1 al 10 y del carril 12 al 16, así como el control positivo que se encuentran en el carril 18 donde se encontraba la cepa de *R. radiobacter* transformada con el vector pCAMBIA1301 que logro su amplificación con los cebadores GurF y GusR.

Mientras que los controles negativos se encontraron en el carril 19 donde se usó *R. radiobacter* y en el carril 20 el agua ultrapura estéril, mientras que el carril 11 se encontraba el marcador molecular en ambos geles.

5.4 Productos de la selección de cepas transformadas puras.

De las colonias del paso anterior, se seleccionó la numero 2 del segundo gel, la cual amplifica con los cebadores 62-84PCAM – 396-74 CR, pero no con los cebadores GusF – GusR. Dicha colonia fue suspendida en agua ultrapura y sembrada en una placa de agar-YEB (15 gr/L- 16.24gr /L) + rifampicina (50 mg/ mL) + kanamicina (50 mg/ mL)

Se realizo la selección de las cuatro cepas transformadas de *R. radiobacter* con el vector pCAMBIA – CrV1 las cuales fueron más puras. Una vez llevada a cabo la selección de las cepas de *R. radiobacter* puras se realizó una PCR con los mismos cebadores 62-84PCAM – 39674CR y los cebadores GusF y GusR. Los productos se cargaron en un gel de agarosa como se muestra en la **Figura 21**.

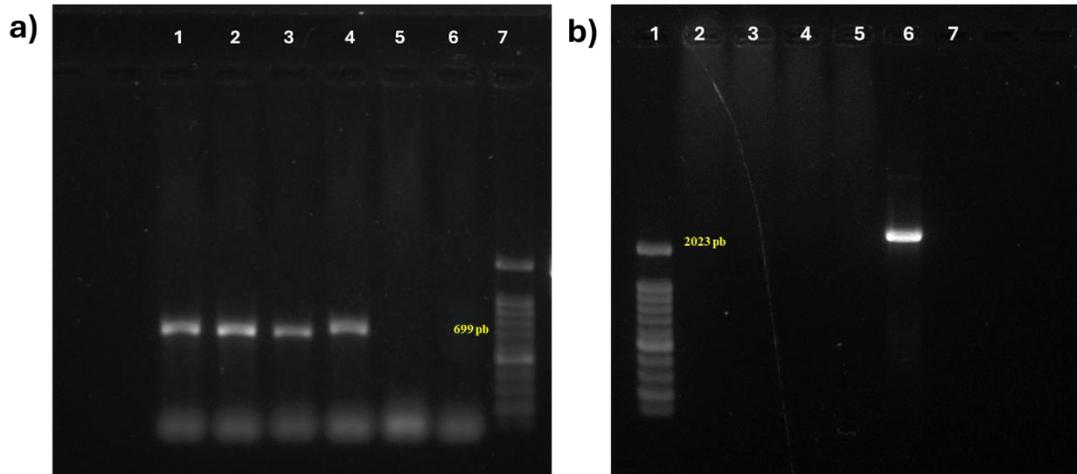


Figura 21. Segunda comprobación de cepas de *R. radiobacter* con cebadores 62-84PCAM – 396-74CR y los cebadores GusF y GusR.

Se puede observar en la **Figura 21a** donde se utilizaron los cebadores 62-84PCAM – 396-74CR la amplificación de las cepas seleccionadas las cual su tamaño es de 699 pb que se encontraban en los carriles 1 al 4, así como sus respectivos controles negativos entre los cuales estuvo *R. radiobacter* transformado con el vector pCAMBIA 1301 que se encontró en el carril 5 el vector pCAMBIA 1301 y agua ultrapura estéril en el carril 6 así como el marcador molecular que se encontraba en el carril 7.

En la **figura 21b** se logró determinar la amplificación del control positivo del gen Gus, el cual fue *R. radiobacter* transformada con el vector nativo pCAMBIA1310 que se encontraba en el carril 6 con un tamaño de 2023 pb, mientras las cepas transformadas con el vector pCAMBIA – CrV1 que se encontraban en los carriles del 2 al 5 salieron negativas, al igual que la reacción del carril 7 en el cual se encontraba la reacción del agua ultrapura estéril.

Dado estos resultados se puede decir que estas cuatro colonias están transformadas de manera exitosa. Así como que el pCAMBIA – CrV1 se transfirió de manera eficiente y se encontraba estable dentro de *R. radiobacter*.

VI. Discusión

Durante la elaboración de este proyecto se logró transformar *R. radiobacter* con el vector pCAMBIA – CrV1. Para lo cual primero se realizó la clonación de CrV1 en un vector binario (pCAMBIA1301) y después una transformación en *E. coli* para la amplificación del vector y prosiguiendo de una transformación en *R. radiobacter* (G. Jyothishwaran, 2007), este procedimiento se realizó mediante el método de congelación – descongelación.

Aunque se sabe que existen otros métodos de transformación como el apareamiento triparental, la electroporación (Benny et al., 2022), así como la conjugación (Morton & Fuqua, 2012).

En el método de apareamiento triparental se necesita utilizar dos cepas de *E. coli* (Benny et al., 2022), donde la primera cepa porta un plásmido conjugativo (autotransmisible) que codifica proteínas que son utilizadas como puente de apareamiento y la transferencia de sí mismo o de otro plásmido a las células receptoras.

Mientras que la segunda cepa (cepa donante) que transporta (plásmido movilizable) los genes de interés para *R. radiobacter* (Wise et al., 2006). Sin embargo, este método necesita al menos de cinco a seis días para lograr la transformación, así como se limita a cepas que contienen el gen Mob (Mazzola et al., 2007).

Otro método es la electroporación, que utiliza un campo eléctrico que le permite aumentar la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, absorbiendo así el DNA (Kámán-Tóth et al., 2018).

Sin embargo, su recuperación de las transformantes depende de la capacidad que tiene la membrana para volver a ensamblarse, así como de las células al sobrevivir al choque que a su vez va a depender de la relación de la intensidad del campo eléctrico y de su duración del pulso (Wise et al., 2006).

La eficiencia de transformación por este método depende del tamaño del plásmido, dado que plásmidos muy grandes disminuyen dicha transformación (Wise et al., 2006), también se han reportado poca confiabilidad de transformación por este método en cepas particulares de *R. radiobacter* (McCormac et al., 1998), además de que requiere un equipo costoso y la alta densidad es uno de los factores limitantes, siendo el método congelación – descongelación el más conveniente y menos costosa a diferencia de los otros métodos (Benny et al., 2022).

Otras de sus desventajas es la regeneración de la planta y la tendencia al insertar copias múltiples del transgén en el genoma de la planta (Silva, 2012), sin mencionar que este método solo puede ser aplicable en protoplastos lo que provoca tener que llevar a cabo cultivo de tejidos muy laboriosos (Lyselle R., 2017).

La conjugación es un método más complicado y laborioso que la electroporación, pero dentro de sus ventajas esta su eficiencia para introducir DNA plasmídicos que deben mantenerse o para el uso de plásmidos muy grandes (Morton & Fuqua, 2012), este método requiere del contacto físico entre el receptor y el donante que contiene el plásmido conjugativo (Gómez Arias et al., 2018).

Por lo cual durante este experimento se realizó en base al método congelación y descongelación por ser un método que logra superar a la electroporación, al apareamiento tridimensional y la conjugación por ser más rápido, económico al no ser necesario un equipo especializado. Además de contar con este método se definieron puntos de apoyo que permitió asegurar la comprobación de la transformación.

El primer punto que se utilizó durante este experimento para determinar el éxito de la transformación se determinó a través de marcadores de selección (genes seleccionables) que contenía el vector que nos permiten reconocer las células de *E. coli* y *R. radiobacter* que fueron transformadas (genes de resistencia a antibióticos).

Estos genes marcadores de selección son generalmente de origen microbiano que codifican proteínas que permiten su crecimiento celular en presencia de antibióticos o herbicidas (Pilar Carbonero, 1997).

El vector pCAMBIA – CrV1 contiene el gene de resistencia a Kanamicina. Una vez que se llevó a cabo su integración en el DNA plasmídico en *E. coli* le confirió esta propiedad y al pasarlo a un medio de crecimiento con este antibiótico, permitió su crecimiento y a su vez la selección de las células transformadas que contenían el fragmento, que posteriormente sirvió para realizar su transformación en *R. radiobacter* la cual contiene genes de resistencia a Rifampicina, obteniendo una cepa transformada con resistencia a ambos antibióticos.

Que finalmente al someterse a un medio de cultivo con ambos antibióticos se logró determinar que efectivamente eran cepas de *R. radiobacter* con el vector pCAMBIA – CrV1 el cual contenía el fragmento de interés.

El segundo punto para la comprobación de la transformación fue a través de pruebas moleculares como fue la PCR donde se utilizaron cebadores específicos del fragmento CrV1 que permitieron flanquear y comprobar por medio de geles de agarosa y posteriormente observar en el fotodocumentador.

El tercer punto con el que se verificó el éxito de la transformación tanto en *E. coli* como en *R. radiobacter* fue el uso de controles positivos y negativos que fueron utilizados durante todo el experimento que fueron puntos de apoyo para determinar el éxito de la transformación. Donde los controles negativos indican que no existe contaminación y los controles positivos son productos conocidos o productos que se espera que suceda que se sabe que va a suceder dándole las condiciones necesarias.

Estos controles se introdujeron durante el crecimiento de las células transformadas de *E. coli* y *R. radiobacter* en medios nutritivos en placas Petri, así como también en las reacciones de PCR donde se logró amplificar las regiones de interés y determinar las cepas puras que lograron tener el vector pCAMBIA – CrV1.

Estos controles son de gran importancia ya que si existiera una variable durante el experimento los controles se verían afectados, así como que la transformación y de esta manera se corrobora antes de seguir a un siguiente punto.

Dentro de lo esperado con la transformación en *R. radiobacter* es obtener una cepa que contenga el vector pCAMBIA – CrV1, el cual contiene el gen CrV1 del polidnavirus de *C. rubecula*, que el cual se espera que mediante el mecanismo de transformación, esta bacteria logre su transferencia a células indiferenciadas (callo) del cultivos de crucíferas para después lograr generar una planta genéticamente modificada que logre contrarrestar el ataque de

P. rapae que como se ha mencionado es un parasito de este cultivo y tiene un gran efecto perjudicial en este cultivo.

El uso de estas alternativas ha sido explotado usando polidnavirus para inducir la mortalidad, así como el control biológico de plagas y de esta manera generar plantas genéticamente modificadas que puedan expresar moléculas que son toxicas para los insectos que puedan ser usadas como biopesticida permitiendo reducir las pérdidas agrícolas, así como el uso de pesticidas químicas usadas en campos reduciendo la contaminación ambiental.

Este organismo con genes de polidnavirus finalmente deberá ser aprobado como control de insectos plaga en diferentes ambientes para evaluar los efectos adversos, así como su riesgo ambiental (Rodríguez Pérez, 2000).

VII. Conclusión

Se logro generar clonas de *R. radiobacter* las cuales contienen el gen CrV1 que es un polydnavirus proveniente de *C. rubecula*, el cual por medio del uso del principio de un vector binario se incorporó al vector pCAMBIA1301 y a través del método congelación – descongelación, se logró su incorporación de este vector en una cepa quimiocompetentes de *E. coli*, seguido de su incorporación en una cepa quiomiocompetente de *R. radiobacter*, las cuales se les realizo su comprobación mediante PCR donde se usaron los cebadores NCOCRF, bstcrR y 62-84Pcamv, 396-74CR respectivamente, obteniendo las amplificaciones esperadas y determinando la presencia de nuestro gen de interés.

Así como también se realizó su comprobación usando los cebadores GusF, GusR para determinaron que las cepas obtenidas durante el ensayo fueran puras y no existiera riesgo de patogenicidad y evitar problemas futuros que pudieran afectar otros estudios.

Una vez obtenidas estas clonas obtenidas se preservaron para sus estudios posteriores, donde podrán ser utilizadas para generar plantas genéticamente modificadas mediante el cultivo *in vitro* de células indiferenciadas y lograr generar una planta que logre combatir al parasito *P. rapae* que es una plaga de importancia en el cultivo de las crucíferas.

El uso de vectores binarios para la incorporación de genes de interés, así como para la transformación genética en plantas es una alternativa más amigable que contribuye a reducir el impacto que tienen los herbicidas y plaguicidas en el medio ambiente, de esta manera lograr el combate de plagas de importancia económica.

VIII. Bibliografía

- An, G., Ebert, P. R., Mitra, A., & Ha, S. B. (1989). Binary vectors. *Plant Molecular Biology Manual*, 29–47. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9_3
- Asgari, S. (2006). Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: Their role in host-parasite interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 61(3), 146–156. <https://doi.org/10.1002/ARCH.20109>
- Ashraf, M., Ahmad, M. S. A., Öztürk, M., & Aksoy, A. (2012). Crop production for agricultural improvement. In *Crop Production for Agricultural Improvement* (Vol. 9789400741164). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4116-4>
- Benny, A., Alex, S., Soni, K. B., Anith, K. N., Kiran, A. G., & Viji, M. M. (2022). Improved transformation of *Agrobacterium* assisted by silver nanoparticle. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 103(3), 311–317. <https://doi.org/10.5114/BTA.2022.118673>
- Bevitori, R. (2014). *Documentos 300 Transformação genética de arroz (Oryza sativa L.) mediada por Agrobacterium tumefaciens: conceitos básicos e protocolo Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Arroz e Feijão Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. www.embrapa.br/arroz-e-feijao
- Díaz Granados, C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49–61. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Eckardt, N. A. (2006). A Genomic Analysis of Tumor Development and Source-Sink Relationships in *Agrobacterium*-Induced Crown Gall Disease in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18(12), 3350. <https://doi.org/10.1105/TPC.107.050294>
- Ferrín Suárez, X. (2020). *Agrobacterium tumefaciens: descubrimiento, ciclo de vida,*.
- G. Jyothishwaran, D. K. T. S. S. M. S. P. K. R. and C. J. (2007). *A modified freeze–thaw method for efficient transformation of Agrobacterium tumefaciens on JSTOR*. <https://www.jstor.org/stable/24099118>
- García Cárdenas, S. Y., Ruvalcaba Hidrogo, D. G., Alvarado González, C. C., Góme Fierro, M. G., Juárez Acosta, Ó. E., Espinoza Duarte, M. R., & Espino Solís, G. P. (2019). Comparación de la eficiencia de transformación entre diferentes cepas de *E. coli*. *Tecnociencia Chihuahua*, 13(2), 112–120. <https://vocero.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/434/375>
- Gauthier, J., Boulain, H., van Vugt, J. J. F. A., Baudry, L., Persyn, E., Aury, J. M., Noel, B., Breteau, A., Legeai, F., Warris, S., Chebbi, M. A., Dubreuil, G., Duvic, B., Kremer, N., Gayral, P., Musset, K., Josse, T., Bigot, D., Bressac, C., ... Drezen, J. M. (2021). Chromosomal scale assembly of parasitic wasp genome reveals symbiotic virus colonization. *Communications Biology* 2021 4:1, 4(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01623-8>

- 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*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 19743–19750. <https://doi.org/10.1074/JBC.M301396200>
- Glatz, R., Schmidt, O., & Asgari, S. (2004a). Isolation and characterization of a *Cotesia rubecula* bracovirus gene expressed in the lepidopteran *Pieris rapae*. *Journal of General Virology*, 85(10), 2873–2882. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.80307-0/CITE/REFWORKS>
- Glatz, R., Schmidt, O., & Asgari, S. (2004b). Isolation and characterization of a *Cotesia rubecula* bracovirus gene expressed in the lepidopteran *Pieris rapae*. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 10), 2873–2882. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.80307-0>
- 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
- Harvey, J. A., Fei, M., Lammers, M., Kos, M., Zhu, F., Heinen, R., Poelman, E. H., & Gols, R. (2016). Development of a solitary koinobiont hyperparasitoid in different instars of its primary and secondary hosts. *Journal of Insect Physiology*, 90, 36–42. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2016.05.006>
- Herlihy, M. V., Van Driessche, G., Abney, M., Brodeur, J., Delaney, D., Fleischer, J., Gruner, D., Harmon, J. P., Heimpel, G., Kuchar, P., Maund, M., Shelton, M., Seaman, J., Skinner, M., & Yeargan, V. (2012). *DISTRIBUTION OF COTESIA RUBECULA (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) AND ITS DISPLACEMENT OF COTESIA GLOMERATA IN EASTERN NORTH AMERICA*.
- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., & Schell, J. (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *MGG Molecular & General Genetics*, 163(2), 181–187. <https://doi.org/10.1007/BF00267408/METRICS>
- 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>
- Jiménez, E. S. (2022). *CONTROL BIOLÓGICO DE Agrobacterium tumefaciens MEDIADO POR BACTERIAS NATIVAS EN LA AGALLA DE LA CORONA CAMPUS MONTECILLO POSTGRADO DE FITOSANIDAD FITOPATOLOGÍA*.
- Joy, A., & Hudelson, B. (2005). *Crown Gall*. <https://pddc.wisc.edu>.
- Kámán-Tóth, E., Pogány, M., Dankó, T., Szatmári, Á., & Bozsó, Z. (2018). A simplified and efficient *Agrobacterium tumefaciens* electroporation method. *3 Biotech*, 8(3), 148. <https://doi.org/10.1007/S13205-018-1171-9>

- Komari, T., Takakura, Y., Ueki, J., Kato, N., Ishida, Y., & Hiei, Y. (2006a). Binary vectors and super-binary vectors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 343, 15–41. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:15>
- Komari, T., Takakura, Y., Ueki, J., Kato, N., Ishida, Y., & Hiei, Y. (2006b). Binary vectors and super-binary vectors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 343, 15–41. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:15>
- Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J., & Komari, T. (2007a). Current Status of Binary Vectors and Superbinary Vectors. *Plant Physiology*, 145(4), 1155–1160. <https://doi.org/10.1104/PP.107.105734>
- Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J., & Komari, T. (2007b). Current status of binary vectors and superbinary vectors. In *Plant Physiology* (Vol. 145, Issue 4, pp. 1155–1160). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.107.105734>
- Kreuzer, H., & Massey, A. (2014). Gene Transfer in Plants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Biology and Biotechnology*, 329–333. <https://doi.org/10.1128/9781555816100.CH22>
- Kumar, S., & Kim, Y. (2014). Point mutagenesis reveals that a coiled-coil motif of CrV1 is required for entry to hemocytes to suppress cellular immune responses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 177, 27–34. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2014.07.017>
- Leclercq, J., Szabolcs, T., Martin, F., & Montoro, P. (2015). Development of a new pCAMBIA binary vector using Gateway® technology. *Plasmid*, 81, 50–54. <https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2015.07.003>
- Lee Chil Woo, Eftova Marina, Engelmann Julia C, Kramell Robert, Wasternack, C., Ludwig-Müller, J., Hedrich, R., & Deeken, R. (2009). *Agrobacterium tumefaciens* Promotes Tumor Induction by Modulating Pathogen Defense in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21(9), 2948. <https://doi.org/10.1105/TPC.108.064576>
- Lee Lan Ying, & Gelvin Stanton B. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325–332. <https://doi.org/10.1104/PP.107.113001>
- Lee, S., Su, G., Lasserre, E., Aghazadeh, M. A., & Murai, N. (2012). Small high-yielding binary Ti vectors pLSU with co-directional replicons for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of higher plants. *Plant Science*, 187, 49–58. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2012.01.012>
- López, M. (1991). *Capítulo 11 Género Agrobacterium*.
- Lyselle R. (2017). *Optimización de la transformación genética vía Agrobacterium tumefaciens (Smith y Townsend) Conn en Phaseolus vulgaris L.*
- Matthysse, A. G. (2006). The Genus *Agrobacterium*. *The Prokaryotes*, 91–114. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_5

- Mazzola, L., Paull, R., Wolfe, J., Hebert, P., Sinkula, M., Luther, W., Kippen, H., Laskin, D., Yang, L., Watts, D. J. ; B. R., Pradeep, T., & Limbach, L. K. (2007). A modified freeze-thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*, 93(6), 517–521.
- McCormac, A. C., Elliott, M. C., & Chen, D. F. (1998). A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 9(2), 155–159. <https://doi.org/10.1007/BF02760816/METRICS>
- Milena, A., Fonseca, V., Rafael, ;, Isaza, A., & Kafuri, L. A. (2005). “INGENIERÍA GENÉTICA NATURAL APLICADA.”
- Montesinos, - D Emilio, Manuel Pérez, S.-D., Jaime, A.-D., Dabrio, C., Xavier, - D, Leandro, N.-D., García, P., Milagros López, D., Beatriz, D., Jesús, L. D., De Publicacions, S., & Llop Pérez, P. (2003). *CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PÉRDIDA DEL PODER PATÓGENO EN AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*.
- Morton, E. R., & Fuqua, C. (2012). Unit 3D.2 Genetic Manipulation of *Agrobacterium*. *Current Protocols in Microbiology, CHAPTER(SUPPL.25)*, Unit. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.MC03D02S25>
- Oliver, B., Zephaniah, D., Alessandra, S., Kakoli, G., & Andrea, S. (2011). *Theoretical Foundations of Transformation in Plant Cells*. <https://www.researchgate.net/publication/319253190>
- Petri, C. (2005). *Transformación genética del albaricoquero (Prunus armeniaca L.), mediada por Agrobacterium, y regeneración de plantas transformadas*. <https://www.researchgate.net/publication/27337129>
- Pilar Carbonero. (1997). *PLANTAS TRANSGENICAS*.
- Rahman, S. U., Khan, M. O., Ullah, R., Ahmad, F., & Raza, G. (2023). *Agrobacterium-Mediated Transformation for the Development of Transgenic Crops; Present and Future Prospects. Molecular Biotechnology*, 1–17. <https://doi.org/10.1007/S12033-023-00826-8/METRICS>
- Ren, Z., Liao, Q., Karaboja, X., Barton, I. S., Schantz, E. G., Mejia-Santana, A., Fuqua, C., & Wang, X. (2022). Conformation and dynamic interactions of the multipartite genome in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(6). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2115854119/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Rodríguez, L., Para, R. M., El, O., De Especialista, T., Biotecnología, E. N., Asesor, A., Yaneth, L., & Mejía, L. (2012). *ACERCAMIENTO AL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE Agrobacterium tumefaciens*.
- Rodríguez Pérez, M. A. (2000). *Proyectos de la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional*.
- Roossinck, M. J. (2011). The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology* 2011 9:2, 9(2), 99–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2491>

- Schmidt, O., Glatz, R. V., Asgari, S., & Roberts, H. L. S. (2005). Are insect immune suppressors driving cellular uptake reactions? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 60(4), 153–158. <https://doi.org/10.1002/ARCH.20111>
- Shah, J. M. (2013). *Glimpses of a Century-Old Story*.
- Silva, R. E. (2012). Theoretical Foundations of Transformation in Plant Cells. *Journal de Ciencia e Ingeniería*, 4(1), 17–26.
- Singh, M., Yadav, A., Ma, X., & Amoah, E. (2010). Plasmid DNA Transformation in Escherichia Coli: Effect of Heat Shock Temperature, Duration, and Cold Incubation of CaCl₂ Treated Cells. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6, 561–568. <http://www.ripublication.com/ijbb.htm>
- Strand, M. R., & Burke, G. R. (2012). Polydnviruses as Symbionts and Gene Delivery Systems. *PLOS Pathogens*, 8(7), e1002757. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002757>
- Strand, M. R., & Burke, G. R. (2015). Polydnviruses: From discovery to current insights. *Virology*, 479–480, 393–402. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2015.01.018>
- Tapia E. (2014). *EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS PRINCIPALES FACTORES QUE AFECTAN LA TRANSFORMACIÓN DE CALLO DE CRISANTEMO POR MEDIO DE AGROBACTERIUM*.
- Teng, Z. W., Xu, G., Gan, S. Y., Chen, X., Fang, Q., & Ye, G. Y. (2016). Effects of the endoparasitoid *Cotesia chilonis* (Hymenoptera: Braconidae) parasitism, venom, and calyx fluid on cellular and humoral immunity of its host *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae. *Journal of Insect Physiology*, 85, 46–56. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2015.11.014>
- Tian, Y., Yue, T., Yuan, Y., & Lo, M. (2010). *Effects of Cell Lysis Treatments on the Yield of Coenzyme Q10 Following Agrobacterium tumefaciens Fermentation*. <https://doi.org/10.1177/1082013210366788>
- Tiwari, S., & Beriha, S. S. (2015). Primary bacteremia caused by *Rhizobium radiobacter* in neonate: A rare case report. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(10), DD01–DD02. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/15101.6598>
- Tzotzos, G. T., Head, G. P., & Hull, R. (2009). Setting the Context: Agriculture and Genetic Modification. *Genetically Modified Plants*, 1–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374106-6.00001-1>
- Van Montagu, M., & Zambryski, P. (2017). *Agrobacterium and Ti Plasmids*. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06024-6>
- Vyas, D. K., Paul, R. L., Gates, M. W., Kubik, T., Harvey, J. A., Kondratieff, B. C., & Ode, P. J. (2020). Shared enemies exert differential mortality on two competing parasitic wasps. *Basic and Applied Ecology*, 47, 107–119. <https://doi.org/10.1016/J.BAAE.2020.04.007>

- Webb, B. A., & Cui, L. (1998). Relationships between polydnavirus genomes and viral gene expression. *Journal of Insect Physiology*, *44*(9), 785–793. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00011-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00011-0)
- Wei, L., Perez-Rodriguez, M. A., & Rodriguez-Perez, M. A. (2016). Effect of recombinant baculovirus expressing CrV1 protein from *Cotesia rubecula* bracovirus against *Pieris rapae* in insecticidal toxicity. *Entomological Research*, *46*(3), 179–184. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12160>
- Weir, R. T., & Dalzell, J. J. (2020). *Agrobacterium*: Soil Microbe, Plant Pathogen, and Natural Genetic Engineer. *Frontiers for Young Minds*, *8*. <https://doi.org/10.3389/FRYM.2020.00064>
- Wise, A. A., Liu, Z., & Binns, A. N. (2006). Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *343*, 43–53. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:43/COVER>
- Ye, X. qian, Shi, M., Huang, J. hua, & Chen, X. xin. (2018). Parasitoid polydnaviruses and immune interaction with secondary hosts. *Developmental & Comparative Immunology*, *83*, 124–129. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2018.01.007>